

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE
PROGRAMA DE MESTRADO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE

ELISA REGINA DE SOUZA WOLFF

**ESTUDO *IN VIVO* DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE SUBSTÂNCIAS
BIOATIVAS DE *Pleurotus ostreatus* DSM 1833**

JOINVILLE
2007

ELISA REGINA DE SOUZA WOLFF

**ESTUDO *IN VIVO* DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE SUBSTÂNCIAS
BIOATIVAS DE *Pleurotus ostreatus* DSM 1833**

Dissertação de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, na Universidade da Região de Joinville. Orientadora: Prof^a Dr^a Sandra Aparecida Furlan. Co-orientador Prof. Dr. Mauro de Souza Leite Pinho.

JOINVILLE
2007

Termo de Aprovação

ESTUDO *IN VIVO* DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE POLISSACARÍDEOS
SINTETIZADOS POR *Pleurotus ostreatus* DSM 1833

por

Elisa Regina de Souza Wolff

Dissertação julgada para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente,
área de concentração (Biotecnologia) e aprovada em sua forma final pelo Programa
de Mestrado em saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville.

Profª Drª Sandra Aparecida Furlan
Orientadora (UNIVILLE)

Profª Drª Mônica Lopes Gonçalves
Coordenadora do Programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente

Banca examinadora:

Profª Drª Sandra Aparecida Furlan
Orientadora (UNIVILLE)

Profª Drª Elisabeth Wisbeck
(UNIVILLE)

Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol
Prof. Dr. Jamil Assreuy
(membros externos)

Joinville, agosto de 2007

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a meu esposo Diego Rafael Wolff, e minha sobrinha Eduarda Grassi Corrêa pela compreensão, dedicação, amor e carinho demonstrados nos momentos em que me fiz esposa, tia, companheira e amiga ausente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, pois se não fosse a vontade DELE em minha vida nada disso teria sido realizado e a todos que contribuíram para a elaboração desse trabalho, em especial à minha orientadora Profª Sandra Furlan e ao Prof. Mauro Pinho, co-orientador.

À Profª Márcia Silveira ao Prof. Theodoro, à acadêmica Nicole Dalonso, e aos colaboradores dos laboratórios da UNIVILLE Michele, Leslie e Elizabete. Agradeço também a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, colaboraram para a realização deste trabalho: o corpo docente do Mestrado em Saúde e Meio Ambiente, os colegas de classe, e as secretárias Maria Patrícia e Sandrinha.

Agradeço à Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE, que através da Área de Pesquisa, concedeu suporte técnico e financeiro para a realização deste trabalho.

À Profª Elisabeth Wisbeck, agradeço imensamente pelos conselhos, sugestões e contribuições fornecidas para enriquecer este trabalho e por ter aceito participar da Comissão Examinadora deste trabalho.

Aos professores Carlos Ricardo Soccol e Jamil Assreuy por terem aceitado avaliar este trabalho e participar da Comissão Examinadora.

A meu esposo Diego pelo companheirismo e incansável apoio durante todo o tempo da realização deste trabalho.

Aos meus pais Manoel e Olívia, pelo incentivo, a minha família pelo apoio, todo o meu amor.

A Helio e Shirley Krambeck pelo amor e apoio durante todo o tempo para a realização deste trabalho.

Finalmente, agradeço ao Senhor nosso Deus que dirige nossas vidas e que permitiu que este trabalho fosse concluído.

RESUMO

O câncer é a segunda causa de morte no mundo ocidental, ultrapassado apenas pelas doenças cardiovasculares, sendo atualmente a segunda causa de morte por doença no Brasil. O câncer surge de uma única célula que sofre mutação e multiplica-se por mitose, sendo que as células descendentes acumulam outras mutações até darem origem à célula cancerígena. A grande incidência de câncer em todo mundo faz com que aumentem as pesquisas na busca de terapias, mais seguras e eficazes, para prevenção e combate da doença. Como principais modalidades de tratamento para o câncer, tem-se a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. No entanto estes tratamentos utilizam agentes que interferem nos mecanismos de sobrevivência, proliferação e migração celular, gerando toxicidade e reações adversas. Novas terapias alternativas e menos agressivas vêm sendo estudadas, como a potencialidade do uso de polissacarídeos de origem fúngica. Alguns fungos, como os do gênero *Pleurotus*, têm a capacidade de sintetizar β -glucanos, polissacarídeos considerados os principais responsáveis pelas propriedades terapêuticas dos cogumelos dentre as quais, a atividade antitumoral. O presente trabalho teve por objetivo investigar a atividade antitumoral de polissacarídeos sintetizados por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 cultivado tanto em meio sólido como em meio líquido. As células tumorais utilizadas nos testes foram o tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) e o Sarcoma 180 (S180). Foram avaliados *in vivo* a capacidade antitumoral de: corpos frutíferos de *Pleurotus ostreatus* misturados à ração de alimentação de camundongos (ração/CF); polissacarídeos extraídos dos corpos frutíferos *in natura* de *Pleurotus ostreatus* (FPI), administrados em camundongos por via intraperitoneal e intragástrica; caldo de cultivo *in natura* de *Pleurotus ostreatus* (CCIN), administrados em camundongos por via intraperitoneal e intragástrica e; polissacarídeos extraídos do caldo de cultivo *in natura* de *Pleurotus ostreatus* (ECC) administrados em camundongos por via intraperitoneal. O tratamento dos animais teve início 24 horas após o implante tumoral e foi conduzindo durante 6 dias em todos os testes, com exceção do tratamento com corpos frutíferos *in natura*, que durou 15 dias. Após este período, os animais foram sacrificados, sendo analisado o volume de líquido ascítico e o número de células tumorais na cavidade peritoneal. Os resultados revelaram que o tratamento dos animais por via intragástrica (FPI, CCIN e ECC) não se mostrou eficaz. Maior inibição do crescimento do Tumor Ascítico de Ehrlich – TAE (76%) foi obtido pela administração da substância ECC (Extrato de Caldo de Cultivo) nos animais por via intraperitoneal, enquanto que a substância CCIN (Caldo de Cultivo *in natura*), também administrado por via intraperitoneal, mostrou-se mais efetiva sobre o sarcoma 180 – S180, com 86% de inibição tumoral. A alimentação dos animais com CF (Corpos Frutíferos) de *Pleurotus ostreatus* misturados à ração também apresentaram resultados promissores, promovendo 51% de inibição do TAE e 63% de inibição do S180.

Palavras-chave: *Pleurotus ostreatus*, câncer, administração intraperitoneal, administração intragástrica, Tumor Ascítico de Ehrlich, Sarcoma 180.

ABSTRACT

Cancer is the second highest cause of death in the western world, surpassed only by cardiovascular diseases, currently the second highest cause of death by illness in Brazil. Cancer appears from a single cell undergoing mutation and multiplies through mitosis, with descendent cells accumulating other mutations until eventually forming into a cancerous tissue. The high incidence of cancer worldwide has led to increased research into safer and more efficient therapies for preventing and the disease. The main treatment modalities for cancer are surgery, radiotherapy and chemotherapy. However, these treatments rely on agents that interfere with cell survival, proliferation and migratory mechanisms, generating toxicity and unfavorable reactions. New alternative and less aggressive therapies are being studied for the potential use of polysaccharides originating from fungi. Some fungi, such as the *Pleurotus* genus, are able to synthesize β -glucan, polysaccharides considered primarily responsible for the therapeutic properties of mushrooms, among which is included antitumoral activity. The objective of this study is to investigate the antitumoral activity of polysaccharides synthesized through *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 in either solid or liquid medium. The tumoral cells used in tests were the Ehrlich Ascitic tumor (TAE) and the Sarcoma 180 (S180). An *in vivo* evaluation was conducted to ascertain the antitumoral capacities of: *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies *in natura* mixed with dry mouse food (dry food/CFIN); polysaccharides extracted from *Pleurotus ostreatus* (FPI) fruiting bodies *in natura*, administered to mice, intraperitoneally and intragastrically; *Pleurotus ostreatus* (CCIN) culture broth *in natura*, administered to mice, intraperitoneally and intragastrically and; polysaccharides extracted from *Pleurotus ostreatus* (ECC) culture broth *in natura*, administered to mice, intraperitoneally and intragastrically. The animal treatment was begun 24 hours following tumor implantation and was conducted during a 6 day period in all tests, with the exception of the fruiting bodies *in natura* treatment, which lasted for 15 days. After this period, the animals were sacrificed, and the ascitic liquid volume and the number of tumoral cells in the peritoneal cavity were analyzed. The results revealed that the animals treated intragastrically (FPI,CCIN and ECC) did not develop effectively. Greater Ehrlich Ascitic Tumor TAE growth inhibition (76%) was obtained through the intraperitoneal administration of ECC (Culture Broth Extract) substance to animals, while CCIN (Culture Broth *in natura*) substance, also administered intraperitoneally, showed to be more effective on sarcoma 180 – S180, with 86% tumoral inhibition. The feeding of animals with *Pleurotus ostreatus* CFIN (Fruiting Body *in natura*) mixed with dry food also presented promising results, promoting 51% TAE inhibition and 63% S180 inhibition.

Key words: Pleurotus ostreatus, cancer, intraperitoneal administration, intragastric administration, Ehrlich Ascitic Tumor, Sarcoma 180.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Câmara de cultivo com pacotes de substrato colonizados pelo micélio fúngico em fase de indução dos primórdios.....	36
FIGURA 2	Câmara de cultivo com pacotes em fase de frutificação.....	36
FIGURA 3	Agitador contendo frascos Erlenmeyer para cultivo submerso de <i>Pleurotus ostreatus</i>	39
FIGURA 4	Esquema de extração e administração das substâncias ração/corpo frutífero (ração/CF), fração polissacarídeo - I (FPI), caldo de cultivo <i>in natura</i> (CCIN) e extrato de caldo de cultivo (ECC), para avaliação da atividade antitumoral por via oral, via intraperitoneal (<i>ip</i>) e via intragástrica (<i>ig</i>) em animais inoculados com células tumorais de Sarcoma 180 (S180) e Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE).....	41
FIGURA 5	Variação da massa corporal (g) dos animais em função do tempo para o tratamento do TAE por alimentação com ração/corpo frutífero (ração/CF).....	48
FIGURA 6	Variação da massa corporal (g) dos animais (média dos 3 sub-grupos experimentais) em função do tempo para o tratamento do TAE por via <i>ip</i> , utilizando extrato do corpo frutífero <i>in natura</i> (FPI).....	49
FIGURA 7	Variação da massa corporal (g) dos animais (média dos 3 sub-grupos experimentais) em função do tempo para o tratamento do TAE por via <i>ig</i> , utilizando extrato do corpo frutífero <i>in natura</i> (FPI).....	50
FIGURA 8	Variação da massa corporal (g) dos animais (média dos 3 sub-grupos experimentais) em função do tempo para o tratamento de TAE por via <i>ip</i> utilizando caldo de cultivo <i>in natura</i> (CCIN).....	52
FIGURA 9	Variação da massa corporal (g) dos animais (média dos 3 sub-grupos experimentais) em função do tempo para o tratamento de TAE por via <i>ig</i> utilizando caldo de cultivo <i>in natura</i> (CCIN).....	52
FIGURA 10	Variação da massa corporal (g) dos animais (média dos 3 sub-grupos experimentais) em função do tempo para o tratamento do TAE por via <i>ip</i> utilizando extrato de caldo de cultivo (ECC).....	54
FIGURA 11	Variação da massa corporal (g) dos animais em função do tempo para o tratamento do S180 por alimentação com ração/corpo frutífero (ração/CF).....	56
FIGURA 12	Variação da massa corporal (g) dos animais (média dos 3 sub-grupos experimentais) em função do tempo para o tratamento do S180 por via <i>ip</i> , utilizando extrato do corpo frutífero <i>in natura</i> (FPI).....	57
FIGURA 13	Variação da massa corporal (g) dos animais (média dos 3 sub-grupos experimentais) em função do tempo para o tratamento do S180 por via <i>ig</i> , utilizando extrato do corpo frutífero <i>in natura</i> (FPI).....	58

FIGURA 14	Varição da massa corporal (g) dos animais (média dos 3 sub-grupos experimentais) em função do tempo para o tratamento do S180 por via <i>ip</i> , utilizando caldo de cultivo <i>in natura</i> (CCIN)60
FIGURA 15	Varição da massa corporal (g) dos animais (média dos 3 sub-grupos experimentais) em função do tempo para o experimento com S180 por via <i>ig</i> , utilizando caldo de cultivo <i>in natura</i> (CCIN)60
FIGURA 16	Varição da massa corporal (g) dos animais (média dos 3 sub-grupos experimentais) em função do tempo para o tratamento de S180 por via <i>ip</i> utilizando extrato de caldo de cultivo (ECC)62
FIGURA 17	Células tumorais na câmara de Neubauer dos grupos controle substância (A), controle tumor (B) e grupo experimental (C).....65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Composição química dos corpos frutíferos de <i>Pleurotus ostreatus</i> DSM 1833 cultivado em palha de bananeira.....	36
TABELA 2	Ganho da massa corporal (g), volume de líquido ascítico no peritônio (mL) e número de células tumorais no líquido ascítico ($\times 10^6$ cel/mL) em experimento com TAE e tratamento (via oral) com ração/corpo frutífero (ração/CF)	47
TABELA 3	Ganho da massa corporal (g), volume de líquido ascítico no peritônio (mL) e número de células tumorais no líquido ascítico ($\times 10^6$ cel/mL) em experimento com TAE e tratamento (via intraperitoneal e via intragástrica) com extrato do corpo frutífero in natura (FPI)	49
TABELA 4	Ganho da massa corporal (g), volume de líquido ascítico no peritônio (mL) e número de células tumorais no líquido ascítico ($\times 10^6$ cel/mL) em experimento com TAE e tratamento (via intraperitoneal e via intragástrica) com caldo de cultivo in natura (CCIN)	51
TABELA 5	Ganho da massa corporal (g), volume de líquido ascítico no peritônio (mL) e número de células tumorais no líquido ascítico ($\times 10^6$ cel/mL) em experimento com TAE e tratamento (via intraperitoneal) com extrato de caldo de cultivo (ECC).....	53
TABELA 6	Ganho da massa corporal (g), volume de líquido ascítico no peritônio (mL) e número de células tumorais no líquido ascítico ($\times 10^6$ cel/mL) em experimento com S180 e tratamento (via oral) com ração/corpo frutífero (ração/CF)	55
TABELA 7	Ganho da massa corporal (g), volume de líquido ascítico no peritônio (mL) e número de células tumorais no líquido ascítico ($\times 10^6$ cel/mL) em experimento com S180 e tratamento (via intraperitoneal e via intragástrica) com extrato de corpo frutífero in natura (FPI)	57
TABELA 8	Ganho da massa corporal (g), volume de líquido ascítico no peritônio (mL) e número de células tumorais no líquido ascítico ($\times 10^6$ cel/mL) em experimento com S180 e tratamento (via intraperitoneal e via intragástrica) com caldo de cultivo in natura (CCIN)	59
TABELA 9	Ganho da massa corporal (g), volume de líquido ascítico no peritônio (mL) e número de células tumorais no líquido ascítico ($\times 10^6$ cel/mL) em experimento com S180 e tratamento (via intraperitoneal) com extrato de caldo de cultivo (ECC).....	61
TABELA 10	Percentual médio e mínimo de inibição dos tumores (TAE e S180) pelas substâncias CF administrada por via oral e FPI, CCIN e ECC, administrada por via intraperitoneal	66

LISTA DE ABREVIATURAS

BCG – Bacilo de Calmette-Guérin (vacina contra tuberculose)

CCIN – Caldo de Cultivo *in natura*

CF – Corpo Frutífero

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ECC – Extrato do Caldo de Cultivo

FPI – Fração de polissacarídeos – I

ig – Intragástrica

INCA – Instituto Nacional do Câncer

ip – Intraperitoneal

LiP – Lignina peroxidase

MnP – Manganês peroxidase

PBS – Solução salina tamponada com fosfato a 0,01M e pH entre 7,4 e 7,6

POL – Meio de cultivo indicado para a produção de exopolissacarídeos

S180 – Tumor sarcoma 180

TAE – Tumor ascítico de Ehrlich

TDA – Trigo – Dextrose – Agar

TECPAR – Instituto de Tecnologia do Paraná

DSM – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Neoplasias	16
2.1.1 Classificação e morfologia	17
2.1.2 O câncer no Brasil e no mundo.....	20
2.1.3 Terapêutica.....	21
2.1.4 Modelos tumorais para estudo <i>in vivo</i>	23
2.2 Fungos da classe dos basidiomicetos.....	24
2.2.1 Aplicação dos basidiomicetos	25
2.2.2 Fungos do gênero <i>Pleurotus</i>	28
2.3 Polissacarídeos	30
2.3.1 β -glucanos	30
2.3.1.1 β -glucanos de fungos do gênero <i>Pleurotus</i>	31
3 METODOLOGIA	34
3.1 Microrganismo e manutenção	34
3.2 Animais e manutenção	34
3.3 Células tumorais e manutenção.....	34
3.4 Indução tumoral.....	35
3.5 Corpos frutíferos de <i>Pleurotus ostreatus</i>	35
3.5.1 Obtenção dos corpos frutíferos	35
3.5.2 Experimento com corpo frutífero (CF).....	37
3.5.2.1 Preparo do corpo frutífero	37
3.5.2.2 Tratamento com corpo frutífero.....	37
3.5.3 Experimento com extrato obtido dos corpos frutíferos <i>in natura</i> (FPI)	37
3.5.3.1 Extração dos polissacarídeos dos corpos frutíferos <i>in natura</i>	37
3.5.3.2 Tratamento com extrato obtido dos corpos frutíferos <i>in natura</i>	38
3.6 Caldo de cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i>	38
3.6.1 Obtenção caldo de cultivo	38
3.6.2 Experimento com caldo de cultivo <i>in natura</i> (CCIN)	39
3.6.2.1 Preparo do caldo de cultivo <i>in natura</i>	39
3.6.2.2 Tratamento com caldo de cultivo <i>in natura</i>	39

3.6.3 Experimento com extrato de caldo de cultivo (ECC)	40
3.6.3.1 Extração dos polissacarídeos do caldo de cultivo	40
3.6.3.2 Tratamento com extrato de caldo de cultivo	40
3.7 Planejamento dos experimentos	40
3.7.1 Composição dos grupos para a realização dos experimentos	41
3.7.1.1 Grupos tratados por via oral (alimentação).....	42
3.7.1.2 Grupos tratados por via intraperitoneal (<i>ip</i>).....	42
3.7.1.3 Grupos tratados por via intragástrica (<i>ig</i>).....	43
3.8 Métodos analíticos.....	44
3.8.1 Determinação do número de células tumorais.....	44
3.8.2 Avaliação da massa corporal dos animais.....	44
3.8.3 Determinação do volume do líquido ascítico	44
3.8.4 Análise da concentração de polissacarídeos.....	45
3.8.4.1 No caldo de cultivo <i>in natura</i> (CCIN).....	45
3.8.4.2 Nas frações FPI e ECC	45
3.8.5 Análise estatística.....	45
4 RESULTADOS	47
4.1 Estudo da capacidade antitumoral de <i>Pleurotus ostreatus</i> sobre Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE).....	47
4.1.1 Tratamento com corpo frutífero (CF).....	47
4.1.2 Tratamento com extrato de corpo frutífero <i>in natura</i> (FPI)	48
4.1.3 Tratamento com caldo de cultivo <i>in natura</i> (CCIN).....	51
4.1.4 Tratamento com extrato de caldo de cultivo (ECC)	53
4.2 Estudo da capacidade antitumoral de <i>Pleurotus ostreatus</i> sobre Sarcoma 180 (S180)	55
4.2.1 Tratamento com corpo frutífero (CF).....	55
4.2.2 Tratamento com extrato de corpo frutífero <i>in natura</i> (FPI)	56
4.2.3 Tratamento com caldo de cultivo <i>in natura</i> (CCIN).....	59
4.2.4 Tratamento com extrato de caldo de cultivo (ECC)	61
5 DISCUSSÕES	63
5.1 Variação da massa corporal.....	63
5.2 Variação do volume de líquido ascítico.....	64
5.3 Variação do número de células tumorais.....	64
6 CONCLUSÕES	69
7 PERSPECTIVAS.....	70
REFERÊNCIAS	71
ANEXOS	86

INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda causa de morte no mundo ocidental, ultrapassado apenas pelas doenças cardiovasculares, sendo atualmente a segunda causa de morte por doença no Brasil (ALMEIDA, 2004).

As causas do câncer ainda não estão definidas claramente, mas evidências levam a crer que os fatores externos ambientais tenham importante papel. Todo câncer é originado por modificações dos genes, que podem ser herdadas ou adquiridas ao longo da vida do indivíduo, em genes que controlam a divisão celular (ALMEIDA, 2004).

A quimioterapia e a radioterapia são tratamentos adjuvantes que utilizam agentes químicos e físicos, isolados ou em combinação, com o objetivo de tratar os tumores malignos, constituindo as formas mais usadas hoje em dia para o combate ou prevenção da recorrência do câncer. O ataque indiscriminado promovido pelas drogas antineoplásicas às células de rápida proliferação, cancerosas ou normais, produz os indesejáveis efeitos colaterais ou tóxicos, que geralmente não são bem aceitos pelos pacientes (BONASSA, 2001).

Alguns fungos, como os do gênero *Pleurotus*, têm a capacidade de sintetizar β -glucanos, polissacarídeos considerados os principais responsáveis pelas propriedades terapêuticas dos cogumelos dentre as quais, a atividade antitumoral (MANZI e PIZZOFERRATO, 2000).

Diversos trabalhos têm reportado técnicas de cultivo de fungos do gênero *Pleurotus* tanto em meio líquido (ROSADO *et al.*, 2003; MAZIERO *et al.*, 1999), como em suporte sólido (BONATI *et al.*, 2004; SALMONES *et al.*, 2005), enquanto outros têm concentrado esforços no desenvolvimento de métodos de extração dos polissacarídeos produzidos por estes fungos (MIZUNO *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2004a). Já alguns autores (ZHUANG *et al.*, 1993; ZHANG *et al.*, 1994; MIZUNO, 1999) têm se dedicado a avaliar *in vivo* a capacidade antitumoral desses polissacarídeos naturais.

Este trabalho teve como objetivo geral investigar *in vivo* a capacidade antitumoral de polissacarídeos produzidos por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833

cultivado tanto em meio sólido como em meio líquido.

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Avaliar *in vivo* a capacidade antitumoral de corpos frutíferos de *Pleurotus ostreatus in natura*, misturados à ração de alimentação de camundongos;

- Avaliar *in vivo* a capacidade antitumoral do caldo de cultivo de *Pleurotus ostreatus in natura*, administrado em camundongos por via intraperitoneal e intragástrica;

- Avaliar *in vivo* a capacidade antitumoral de polissacarídeos extraídos dos corpos frutíferos e do caldo de cultivo de *Pleurotus ostreatus*, administrado em camundongos por via intraperitoneal e intragástrica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neoplasias

As neoplasias são estudadas pelo ramo da patologia chamada oncologia, do grego “oycos”, que significa volume, tumor (COTRAN *et al.*, 2000). São proliferações de clones celulares atípicos, sem causa aparente, de crescimento excessivo, progressivo e ilimitado, incoordenado e autônomo ainda que se nutra a custa do organismo, numa relação tipicamente parasitária (BRASILEIRO FILHO, 1998).

De acordo com a literatura (MONTENEGRO e FRANCO, 1999; COTRAN *et al.*, 2000), a definição mais aceita de neoplasia é a do patologista inglês Rupert Willis: “Neoplasia é uma massa anormal de tecido cujo crescimento excede e não está coordenado ao crescimento dos tecidos normais e que persiste mesmo cessada a causa que o provocou”.

As neoplasias possuem dois componentes básicos: (1) células neoplásicas proliferantes, que constituem o parênquima, e (2) o estroma de suporte, constituído de tecido conjuntivo e vasos sanguíneos. As células parenquimatosas representam o componente proliferante das neoplasias, sendo que o crescimento e a evolução destas dependem diretamente de seu estroma. É necessário um suprimento sanguíneo adequado para que o estroma e seu tecido conjuntivo forneçam o arcabouço para o parênquima (COTRAN *et al.*, 2000).

Na prática, a neoplasia é essencialmente uma doença de células, caracterizada por um desvio nos mecanismos de controle dos processos de proliferação e diferenciação celular (SALMON *et al.*, 2003). Na maioria dos casos as neoplasias caracterizam-se por mutações genéticas herdadas ou adquiridas pela ação de agentes ambientais, químicos, hormonais, radioativos e virais, denominados carcinógenos (COTRAN *et al.*, 2000). Originam-se da ativação anormal dos genes que controlam o crescimento celular (LOURO, 2000). Embora algumas formas de neoplasias sejam hereditárias, são causadas por erros intrínsecos na replicação do DNA ou induzida por exposição à carcinógenos. Uma única lesão genética em geral não é suficiente para induzir transformação neoplásica de uma célula.

O fenótipo maligno só é adquirido após várias (5 a 10) mutações geralmente desenvolvendo-se durante muitos anos. As neoplasias são mais comuns em tecidos que apresentam renovação rápida, especialmente aqueles expostos a carcinógenos ambientais e cuja proliferação é regulada por hormônios (BRAUNWALD *et al.*, 2001). Sendo assim, os neurônios maduros e os miócitos cardíacos não produzem tumores.. A neoplasia pode expressar graus variáveis de diferenciação, desde estruturas relativamente maduras que imitam os tecidos normais até um conjunto de células tão primitivas a ponto de não ser possível identificar a célula de origem (RUBIN e FARBER, 2002).

2.1.1 Classificação e morfologia

As neoplasias são classificadas em duas grandes categorias: benignas e malignas (ROBBINS *et al.*, 1992; MONTENEGRO e FRANCO, 1999). Neoplasias malignas são chamadas de câncer, para distingui-las das benignas (JUNQUEIRA, 2005).

Embora as características macroscópicas sejam importantes é necessário enfatizar que somente através da histologia é possível diferenciar de maneira segura neoplasias benignas de neoplasias malignas (MONTENEGRO e FRANCO, 1999). A diferenciação refere-se ao grau de semelhança entre as células parenquimatosas e as células normais, comparáveis tanto em nível morfológico quanto em nível funcional.

As células das neoplasias benignas assemelham às células normais maduras do tecido de origem da neoplasia. As células das neoplasias malignas podem ser diferenciadas ou indiferenciadas em relação às células normais. Quando indiferenciadas são denominadas anaplásicas (COTRAN *et al.*, 2000).

As neoplasias benignas são essencialmente bem delimitadas, crescem geralmente de forma esférica e não invadem os tecidos ao seu redor, enquanto as neoplasias malignas apresentam como sua mais importante propriedade a capacidade de invasão de tecidos vizinhos. Esse processo de invasão e alastramento, denominado metástase, pode avançar até atingir o sistema circulatório, permitindo que as células malignas ganhem vias de disseminação (por exemplo, vasos sangüíneos) e atinjam outros sítios, distantes do local original, e

neles iniciem novas colônias de células neoplásicas (BERGERS *et al.*, 1999; BRASILEIRO FILHO, *et al.*, 2000).

Na neoplasia benigna, as células permanecem localizadas, prejudicando apenas o órgão onde se originou e os tecidos vizinhos, que podem ser comprimidos. Assim, as neoplasias benignas geralmente são curadas pela cirurgia. Já o tratamento cirúrgico das neoplasias malignas só é eficaz se realizado antes das metástases (BRASILEIRO FILHO, 1998; JUNQUEIRA, 2005).

Metástases são neoplasias secundárias, que crescem separadamente da neoplasia primária. Originam-se de células que se destacaram da neoplasia primária e foram transportadas para outros locais. O transporte pode ser feito através dos vasos linfáticos ou sanguíneos, ou ainda, pelos fluidos existentes nas cavidades naturais (MONTENEGRO e FRANCO, 1999). O poder de invasão local depende de propriedades intrínsecas da própria célula e da natureza dos componentes teciduais. Até atingir uma via de disseminação, as células malignas precisam atravessar a matriz extracelular, que tem dois componentes básicos, a membrana basal e o conjuntivo intersticial. De acordo com a constituição bioquímica e a resistência mecânica desses elementos, as células penetram neles com maior ou menor facilidade. Vasos linfáticos e veias, em função de sua parede mais fina e da escassez de fibras elásticas, são facilmente penetráveis (BRASILEIRO FILHO *et al.*, 1993).

Os cânceres matam justamente em conseqüência da invasão destrutiva de órgãos normais por extensão direta e disseminação para locais distantes através do sangue, linfa ou superfícies serosas (BENNETT e PLUM, 2001).

As neoplasias benignas apesar de não apresentarem, em geral, grandes problemas para seus portadores, têm grande interesse prático por sua freqüência e pelas conseqüências que podem gerar. Essas neoplasias crescem lentamente e não há qualquer infiltração ou destruição ativa do tecido circundante e tão pouco disseminação a locais distantes, ou seja, nenhuma metástase. Raramente colocam em risco a vida do indivíduo, mas podem fazê-lo em conseqüência de secreção de hormônios ou de uma localização crítica (CHANDRASOMA e TAYLOR, 1993). O crescimento lento da neoplasia permite o desenvolvimento adequado de vasos sanguíneos, assegurando boa nutrição das células. Desse modo, degenerações, necroses e hemorragias são pouco comuns. Não compromete a nutrição do hospedeiro (a ação espoliativa é discreta ou ausente) e nem produz substâncias que

podem produzir anemia ou caquexia (BRASILEIRO FILHO, 1998). Entretanto, a localização de um tumor benigno pode ter uma influência importante no prognóstico. Uma neoplasia benigna do tronco cerebral, por exemplo, pode levar à morte rápida em função de sua localização (LOWE e STEVENS, 1998).

No outro extremo estão as neoplasias malignas ou cânceres, nas quais as células mostram alterações bioquímicas, morfológicas e funcionais variadas que lhes conferem propriedades importantes. A taxa de multiplicação das células malignas é elevada, a neoplasia usualmente tem crescimento rápido. O mesmo não acontece com o estroma e os vasos sanguíneos, que se desenvolvem mais lentamente, resultando em degenerações, hemorragias e ulcerações freqüentes (BRASILEIRO FILHO *et al.*, 1994).

De acordo com Fauci *et al.* (1998) e Tannock e Hill (1998), o câncer pode ser definido como uma exceção à interação coordenada entre células e órgãos, onde a célula cancerígena compete pela sobrevivência usando a mutabilidade e a seleção natural para tirar vantagem das células normais, recapitulando a evolução. Nestes tipos de neoplasias indiferenciadas em que há polimorfismo, os núcleos são muito volumosos e a relação núcleo-citoplasma é aumentada, pelo fato de que os núcleos tumorais contêm quantidades anômalas de DNA (MONTENEGRO e FRANCO, 1999). Em razão da perda da diferenciação celular, as células neoplásicas malignas perdem também a capacidade de formarem tecidos normais (BRASILEIRO FILHO *et al.*, 2000).

Outro elemento importante na avaliação dos neoplasmas são as mitoses. Nos tumores bem diferenciados as mitoses são pouco freqüentes e quando ocorrem são normais. Já nos tumores indiferenciados, as mitoses são muito freqüentes e entre elas se observam mitoses anômalas (MONTENEGRO e FRANCO, 1999).

Segundo Brasileiro Filho (1998) existem alguns tipos modulares de neoplasias: o tipo vegetante, que é encontrado em neoplasias benignas e neoplasias malignas que crescem na superfície (pele ou mucosas); o tipo infiltrante que é praticamente exclusivo das neoplasias malignas; e o tipo ulcerado, que se refere às ulcerações precoces, quase exclusivos de neoplasias malignas.

Como as células cancerígenas são, em geral, mais volumosas do que as correspondentes normais, devido ao aumento tanto do núcleo quanto do citoplasma e se multiplicam em grande quantidade, têm o citoplasma basófilo, devido à riqueza em ribossomos (JUNQUEIRA, 2005). Um aspecto importante é o pleomorfismo,

responsável pelas variações da forma e tamanho das células e dos núcleos em diferentes regiões do tumor. Há variações no tamanho dos nucléolos, surgindo cromocentros formando grandes alterações da forma nuclear. Com frequência, a cromatina é irregular, mais compacta e hipercondensada; outras vezes a cromatina é frouxa e os núcleos são vesiculosos ou hipocromáticos (BRASILEIRO FILHO *et al.*, 1994).

2.1.2 O câncer no Brasil e no mundo

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer INCA (2007, apud MORAES, 1997), as estimativas para o ano de 2006 apontavam para a ocorrência de 472.050 casos novos de câncer no Brasil, dos quais 234.570 para o sexo masculino e 237.480 para sexo feminino. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele não melanoma, seriam os de próstata e pulmão no sexo masculino e mama e colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da dimensão observada no mundo.

A distribuição dos casos novos de câncer segundo localização primária é bem heterogênea entre estados e capitais do país. As regiões Sul e Sudeste apresentam as maiores taxas, enquanto que as regiões Norte e Nordeste mostram taxas menores. As taxas da região Centro-Oeste apresentam um padrão intermediário (INCA, 2007).

O câncer de pele (neoplasia maligna cutânea) é o mais comum de todos os tipos de câncer. Existem basicamente dois tipos de câncer de pele: o não-melanoma, que é o mais comum e raramente pode causar a morte do paciente, e o melanoma, que é o mais raro, mas é responsável por três em cada quatro mortes por câncer de pele (ZELMANOWICZ, 2007). O número de novos casos de câncer de pele não melanoma estimados para o Brasil em 2006 é de 55.480 casos em homens e de 61.160 casos em mulheres. Este tipo de câncer é o mais incidente em homens em todas as regiões do Brasil, com um risco estimado de 89/100.000 na região Sul, 70/100.00 na região Sudeste, 52/100.000 na região Centro-Oeste, 44/100.000 na região Nordeste e 30/100.000 na região Norte. Nas mulheres é o mais frequente nas regiões Sul (93/100.000), Centro-Oeste (73/100.000), Nordeste (50/100.000) e Norte

(32/100.000), enquanto que, na região Sudeste (69/100.000) o mesmo é o segundo mais freqüente (INCA 2007).

A incidência, distribuição geográfica e comportamento de tipos específicos de câncer estão relacionados a múltiplos fatores, como sexo, idade, raça, predisposição genética e exposição a carcinógenos ambientais (KATZUNG, 2003; ALMEIDA, 2004). De todos os casos, 80% a 90% dos cânceres estão associados a fatores ambientais (ALMEIDA, 2004). Vale salientar ainda que a incidência de doença neoplásica aumenta com a idade e, a maior longevidade alcançada hoje em dia, necessariamente aumenta a população sob risco de desenvolvimento da doença (RUBIN e FARBER, 2002).

2.1.3 Terapêutica

Existem quatro modalidades terapêuticas principais para o câncer (cirurgia, radioterapia (RT), terapia clínica e terapia biológica), sendo que a cirurgia é a mais definitiva, quando o tumor é localizado em condições anatômicas favoráveis. Em pequenos tumores sólidos, por exemplo, a cirurgia costuma ser definitiva e curativa, não causando efeitos colaterais indevidos (BENETTI e PLUM, 2001).

A cirurgia foi a primeira modalidade de tratamento empregada com êxito no combate ao câncer, depois do desenvolvimento da anestesia com éter na década de 1840 e continua sendo, até os dias atuais, a principal modalidade de tratamento dentro da oncologia para a maioria dos tumores sólidos (FAUCI *et al.*, 1998).

A radioterapia é utilizada para a destruição de células através da radiação ionizante e a quimioterapia emprega compostos químicos, chamados quimioterápicos antineoplásicos, no tratamento das neoplasias. A quimioterapia pode ser utilizada em combinações com a cirurgia e com a radioterapia, com finalidade paliativa ou curativa (ALMEIDA, 2004).

A radioterapia é empregada localmente e seu êxito depende da diferença inerente na radiosensibilidade entre o tumor e os tecidos normais adjacentes. Idealmente, a radioterapia deve destruir o tecido canceroso, ao mesmo tempo em que causa mínima destruição das estruturas normais circunjacentes. Como a radioterapia é um meio de transmitir energia aos tecidos, em última análise, resulta em lesão biológica. Está associada tanto a efeitos tóxicos agudos como a seqüelas

em longo prazo. Reações agudas ocorrem durante ou logo após a terapia, e representam a interrupção da repopulação de tecidos em rápida divisão. Ocorre sintoma sistêmico como a fadiga e reações cutâneas locais, que variam desde o eritema até a descamação úmida. A toxicidade gastrointestinal, acompanhada de náuseas, vômitos, disfagia ou diarreia, está associada ao tratamento do abdome ou pélvis. A radioterapia é comprovadamente mutagênica, carcinogênica e teratogênica e está associada a um aumento do risco de ocorrência de leucemias e tumores sólidos secundários (FAUCI *et al.*, 1998).

Na terapia clínica a quimioterapia consiste na administração de drogas químicas, quer seja via oral, venosa, intrarterial, cavitária ou intramuscular, que atuam interferindo diretamente no ciclo celular, bloqueando uma seqüência metabólica e com isso impedindo a divisão ou amadurecimento celular, levando a célula conseqüentemente à morte. A duração do tratamento depende basicamente de seu objetivo e da tolerância do paciente (FAUCI *et al.*, 1998).

Uma modalidade recentemente empregada como terapia primária ou adjuvante é o uso de agentes quimioterápicos como mitomicina C e 5-fluoracil, sendo úteis na doença difusa, além de evitarem as complicações associadas à intervenção operatória. Outros tratamentos adjuvantes, tais como crioterapia e radiação, têm sido empregados na tentativa de reduzir a reincidência pós-ressecção cirúrgica (GIACONI, 2003).

Tratamento neoadjuvante ou inicial é aplicado para reduzir o tumor, de modo a possibilitar ou facilitar a cirurgia. Pode ser útil para reduzir a área a ser operada, preservando a função ou o órgão e tem uma duração pré-definida, mas a resposta do tumor à quimioterapia é acompanhada de tratamento cirúrgico, pois se for insatisfatória, o planejamento terá de ser revisto. Dependendo do tipo de droga utilizada, o número de ciclos também poderá ser limitado, já que algumas medicações podem levar a efeitos tóxicos a partir de determinada dose. Assim, antes que isso ocorra, o tratamento deverá ser suspenso ou trocado. Nesse caso, a troca do tratamento não significa uma resposta inadequada (RIEGER, 2000).

A imunoterapia ativa ou terapia biológica, consiste na aplicação de agentes hospedeiros com origem no tumor, que são concebidos para criar uma resposta imune capaz de retardar ou eliminar o crescimento tumoral. Pode ser específica, se a imunização for efetuada com células do tumor ou extratos de células tumorais simples ou em vacinas, como por exemplo, o uso de anticorpos monoclonais. Pode

ser não específica quando existe uma tentativa de melhorar a imunidade através do uso de adjuvantes como os extratos bacterianos (RIEGER, 2000; BENJAMIN *et al.*, 2002). A terapia biológica emprega substâncias como interferon, interleucina-2, interleucina-4, fatores de crescimento hematopoiéticos (filgrastima), fator de necrose tumoral e vacinas bacterianas vivas BCG (ALMEIDA, 2004).

No entanto, os antineoplásicos utilizados no tratamento do câncer são agentes que interferem nos mecanismos de sobrevivência, proliferação e migração celular. O processo de descoberta e desenvolvimento desses fármacos modificou-se, significativamente, com o avanço dos conhecimentos da biologia molecular e celular (FUCHS *et al.*, 2004).

Para Katzung (2003), os fármacos ideais contra o câncer devem erradicar as células cancerosas sem prejudicar os tecidos normais. Infelizmente não existem, no momento, agentes disponíveis que satisfaçam esse critério e, o uso clínico dessas drogas, exige que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade na procura de um índice terapêutico favorável. A mesma constatação é feita por Almeida (2004), que afirma não existirem drogas antineoplásicas específicas para as células tumorais, uma vez que atacam as células normais do organismo, gerando graves toxicidades e reações adversas. Estas reações ocorrem em caráter de maior ou menor gravidade, precoce ou tardia, aguda ou crônica, cumulativa ou irreversível.

Na busca de terapias alternativas e menos agressivas, a potencialidade do uso de polissacarídeos de origem fúngica tem sido investigada nos últimos anos (MIZUNO, 1999; NOSÁLOVÁ *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2004b).

2.1.4 Modelos tumorais para estudo *in vivo*

Para a investigação e testes de novos fármacos é necessária a utilização de modelos experimentais em animais. Um modelo muito empregado nesta linha antitumorais de investigação é o tumor de Ehrlich em camundongo, que tem a capacidade de crescimento em suspensão no líquido ascítico e em tecido celular subcutâneo. Após a sua implantação na cavidade peritoneal em camundongos sadios, há formação de líquido ascítico tumoral (SAAD-HOSSNE *et al.*, 2004). O tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) derivou de um adenocarcinoma mamário espontâneo (PAGNO *et al.*, 2006).

O Sarcoma 180 (S180), também conhecido como Tumor de Crocker, cresce rapidamente em 90% dos animais inoculados (ASSEF *et al.*, 2002). Esse tumor ocorre em forma líquida na cavidade abdominal de camundongos, apresentando-se distendido a partir do sexto dia de desenvolvimento do tumor e sobrevivendo aproximadamente 15 dias (ARAUJO e BRANDEBURGO, 1995).

2.2 Fungos da classe dos basidiomicetos

Fungos são eucariotos, ou seja, organismos cujas células possuem um núcleo definido, que contém o material genético da célula (DNA), circundado por um envelope especial chamado de membrana nuclear (TORTORA *et al.*, 2003).

Desde a antigüidade, fungos vêm sendo usados para o preparo de alimentos e compostos com uso medicinal, fazendo parte da vida do homem há milhões de anos (LORENZEN e ANKE, 1998). Segundo Rajarathnam *et al.* (1998), existem cerca de 2000 espécies de cogumelos comestíveis identificadas, sendo que destas, 80 foram cultivadas experimentalmente e apenas cerca de 22 são comercializadas. Embora diversas culturas utilizem os cogumelos como alimento e medicamento, Chang (1996) relata que o uso de cogumelos como alimento funcional foi iniciado na China, aproximadamente 100 aC. Algumas espécies de cogumelos têm sido utilizadas para modular o sistema imunológico, baixar a pressão sanguínea e a concentração de lipídios no sangue, inibirem o desenvolvimento de tumores e inflamações e como agentes antimicrobianos (WASSER e WEIS, 1999).

Nos fungos filamentosos, cada filamento cresce, principalmente, na extremidade, por extensão de uma célula terminal. Um único filamento é chamado hifa. As hifas geralmente crescem juntas, através da superfície e formam ramificações compactas, que coletivamente são chamadas de micélio, e que podem ser vistas facilmente sem uso de microscópio. Alguns fungos filamentosos são capazes de formar esporos sexuais (MADIGAN, *et al.*, 2004).

Os basidiomicetos constituem os cogumelos propriamente ditos, alguns comestíveis, outros agentes de micetismo ou de doenças de plantas como as chamadas “ferrugens” e “carvões” (LACAZ *et al.*, 2002). Em geral, possuem um micélio bem desenvolvido, formado por hifas septadas, cujas paredes contém quitina. Os septos são perfurados, em locais onde a parede celular é espessada em

forma de barril, no centro do qual existe uma perfuração coberta por uma capa membranosa, o parentosoma. Nos basidiomicetos, esporos haplóides produzem somente pequenas hifas haplóides. Quando estas são fecundadas, um micélio dicariótico é produzido e desenvolve-se para constituir a estrutura somática do fungo. Essas hifas dicarióticas podem produzir, por via assexual, esporos dicarióticos que se desenvolvem novamente em um micélio dicariótico. Entretanto, em qualquer um dos casos, os núcleos pareados das células se unem e formam zigotos, dividindo-se meioticamente para produzir basidiosporos, que contém núcleo haplóide (MICHEREFF, 2003).

Basidiomicetos habitam as mais variadas zonas climáticas, do ártico às úmidas florestas tropicais. Os corpos frutíferos podem ser colhidos de substratos como folhas, madeira, estrume ou solo. O aparato enzimático confere aos basidiomicetos a capacidade de degradar substratos lignocelulósicos como resíduos agrícolas (palha de arroz, de trigo e de outros cereais) e resíduos agro-industriais (resíduos de algodão e de soja, bagaço de cana-de-açúcar etc.) além de serragens de madeira, evitando que se transformem em problemas ambientais (MATHEUS e OKINO, 1998).

Culturas do micélio são geralmente derivadas dos esporos ou pedaços de tecido que germinam e crescem em meio sólido ou líquido. Segundo Lorenzen e Anke (1998), o meio de cultivo pode ser constituído de extrato de levedura, extrato de malte e glicose, que é o composto central tanto para a produção de metabólitos primários quanto de metabólitos secundários.

2.2.1 Aplicações dos Basidiomicetos

Cogumelos medicinais têm sido consagrados na história no uso das tradicionais terapias orientais. Frações extraídas a quente de cogumelos medicinais foram usadas como medicamento no extremo oriente, onde se originou o conhecimento e a aplicação destes. Estudos atribuem as propriedades medicinais dos cogumelos aos polissacarídeos, em particular β -glucanos, polissacarídeos-proteínas e proteínas (LULL, *et al.*, 2005).

Grande parte dos processos biotecnológicos utilizando fungos da classe dos basidiomicetos baseiam-se nos seus produtos metabólicos, como enzimas e

polissacarídeos. A importância do aparato enzimático dos basidiomicetos está diretamente relacionada com a bioconversão de resíduos lignocelulósicos tanto para a produção de alimento (cultivo de cogumelos comestíveis), quanto para a produção de polissacarídeos que podem ser utilizados, principalmente, nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas (MATHEUS e OKINO, 1998). Da mesma forma, este complexo enzimático lignocelulolítico de diversas espécies de basidiomicetos tem levado grupos de pesquisa a estudar sua capacidade de biodegradação de poluentes (DURAN e ESPOSITO, 1998; MATHEUS e OKINO, 1998).

Nos últimos anos, os estudos de degradação de xenobióticos por fungos da classe dos basidiomicetos têm-se intensificado. A capacidade dos basidiomicetos em degradar compostos xenobióticos deve-se a semelhança entre as estruturas da molécula de lignina e as moléculas de alguns compostos orgânicos sintéticos, principalmente os compostos aromáticos (MATHEUS e OKINO, 1998).

Segundo Putzke e Putzke (2003), entre as qualidades dos cogumelos como alimento pode-se destacar: a diminuição do nível de colesterol no sangue; a capacidade antitumoral da letinina encontrada em *Lentinus edodes* e *Pleurotus ostreatus*; a presença de aminoácidos, de minerais como cálcio, potássio, iodo e fósforo e de vitaminas como riboflavina, tiamina, ácido ascórbico e os pertencentes ao complexo B.

De uma maneira geral os cogumelos comestíveis contém entre 85 e 95% de água em sua composição e quando desidratados para comercialização apresentam um peso que equivale a 5-20% do seu peso fresco inicial. Na composição do peso seco, os carboidratos estão presentes em maior concentração (60%), seguida das proteínas (25%) e dos lipídeos (5%), sendo o restante considerado como cinzas (10%), incluindo diversos minerais (SANTOS, 2000).

Um grande número de compostos derivados dos basidiomicetos, componentes celulares e/ou metabólitos, tem mostrado efeito sobre o sistema imune e podem ser utilizados para tratar diversos estágios e tipos de tumores (WASSER e WEIS, 1999).

Várias propriedades fisiológicas têm sido influenciadas pelos efeitos farmacológicos dos cogumelos, tais como biorregulação (ativação imunológica), manutenção de homeostase, regulação do biorritmo, prevenção de doenças como câncer, derrame cerebral e doenças cardíacas (WASSER e WEIS, 1999). Segundo

esses autores, substâncias originárias de cogumelos foram isoladas e identificadas demonstrando atividade antitumoral, cardiovascular, antiviral, antibactericida e antiparasitária.

Diversos basidiomicetos, como *Schizophyllum commune*, *Lentinus edodes* e *Coriolus versicolor* apresentam atividade antitumoral devido a presença de polissacarídeos, que foram isolados, e são comercialmente conhecidos como Schizophylan, Lentinan e PKS, respectivamente (OOI e LIU, 2000).

A maioria das pesquisas sobre efeitos antitumorais de cogumelos foi conduzida no Japão. Um estudo realizado com polissacarídeos antitumorais das espécies *Lentinus edodes* e *Grifola frondosa*, utilizando imunoensaios (ELISA), sugeriram que a estocagem em baixas temperaturas dos corpos frutíferos, foi mais efetiva tanto na manutenção dos cogumelos, como na concentração dos polissacarídeos com atividade antitumoral (MIZUNO, 2000).

Estudos realizados no Japão, com cobaias em laboratório, utilizando frações extraídas de corpos frutíferos de *Agaricus blazei*, revelaram que polissacarídeos constituídos de β -glucanos, associados a determinadas proteínas, apresentaram elevada atividade antitumoral (BRAGA, 2005).

Frações extraídas da espécie *Agaricus blazei* foram testadas em camundongos, no combate às células de Sarcoma 180. Os resultados com as frações solúvel e insolúvel em *n*-hexano (800mg/kg) administradas oralmente nos animais durante 20 dias, resultaram na redução de 80,2 e 90,1% do volume do tumor, respectivamente (TAKAKU *et al.*, 2001).

Ajith e Janardhanan (2003) testaram extratos de *Phellinus rimosus* obtidos a partir de três solventes para extração: acetato de etila, metanol e água. Em camundongos albinos Swiss machos, com massa corporal igual a 20 ± 2 g, foi inoculado uma concentração de células de Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) de 1×10^6 cel/mL. Os animais foram tratados diariamente com os extratos numa concentração de 50mg/Kg por 10 dias, obtendo-se uma redução de 65% das células tumorais com o extrato obtido através da extração com acetato de etila.

Diversos estudos comprovam a presença de compostos com atividades terapêuticas em fungos do gênero *Pleurotus*, tais como antimicrobiana, antitumoral, imunomodulatória (RAJARATHNAM *et al.*, 1998; ZHANG *et al.*, 1994; WISBECK *et al.*, 2002).

2.2.2 Fungos do gênero *Pleurotus*

As espécies pertencentes ao gênero *Pleurotus* têm produção relativamente simples e requerem um curto tempo para o crescimento, quando comparado com outros cogumelos comestíveis (JWANNY, RASHAD, e ABDU, 1995; PATRABANSH e MADAN, 1997). Estes fungos distribuem-se por todo o mundo em florestas, tendo uma ótima adaptação aos climas temperados (GUNDE-CIMERMAN, 1999).

É relatado que para o micélio crescer e o corpo frutífero se desenvolver é suficiente a presença de materiais lignocelulósicos (MARTIN, 1992). O sistema de degradação de materiais lignocelulósicos envolve uma série de reações. Os fungos do gênero *Pleurotus* são capazes de realizar tal degradação porque possuem um complexo enzimático lignocelulolítico específico (RAJARATHNAM *et al.*, 1992).

Nos últimos anos, o complexo enzimático lignocelulolítico de *Pleurotus* spp. tem sido estudado com vistas a utilização deste fungo em processos de biorremediação, degradação de materiais recalcitrantes, substâncias químicas tóxicas como organofosforados etc. (NOVOTNÝ *et al.*, 2004, RODRIGUEZ *et al.*, 2004). Duas famílias de enzimas ligninolíticas são consideradas as principais responsáveis pela capacidade biodegradadora dos fungos: peroxidases e fenoloxidasas. Dentre as peroxidases destacam a lignina peroxidase (LiP) e a manganês peroxidase (MnP) e dentre as fenoloxidasas destaca-se a lacase (KARAN e NICELLI, 1997).

Vários estudos envolvendo fungos do gênero *Pleurotus* na biodegradação de compostos aromáticos de um modo geral (SANTOS, 2000; NOVOTNY *et al.*, 1999) e fenóis-clorados especificamente (KUBATOVA *et al.*, 2001; MUNARI *et al.*, 2003; RODRIGUEZ *et al.*, 2004; SILVA, 2005) vêm sendo realizados.

Pleurotus, como outros cogumelos comestíveis, são apreciados pelo seu sabor e também por seus atributos medicinais, mas durante muito tempo, seu valor nutricional foi praticamente ignorado. Hoje se reconhece que além de apresentarem propriedades gastronômicas, possuem comprovadas propriedades nutricionais, como elevado teor de fibras, quantidades moderadas de proteínas de boa qualidade com a maior parte dos aminoácidos essenciais, minerais e vitaminas (RAJARATHNAM *et al.*, 1998; BONATTI *et al.*, 2004).

A composição química de corpos frutíferos de *Pleurotus ostreatus* foi determinada por Bonatti *et al.* (2004).

Tabela 1 – Composição química dos corpos frutíferos de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 cultivado em palha de bananeira.

Parâmetros	Palha de bananeira*
Umidade	88.06
Gordura total	5.97
Carboidratos	46.97
Cinzas	5.58
Fibras	9.41
Nitrogênio total	3.85
<i>Proteína total</i>	16.86

*Exceto a umidade (g/100g de massa úmida) os outros valores são descritos em termos de massa seca (g/100g de massa seca).

O cultivo de fungos do gênero *Pleurotus* pode ser realizado em meio sólido ou líquido. O processo em meio sólido depende da interação entre o fungo e o substrato lignocelulósico, possibilita o processo de fermentação em estado sólido onde o fungo é capaz de decompor o substrato sólido contendo baixo teor de umidade. Um dos processos mais importantes, do ponto de vista econômico, é a utilização de fungos na conversão de resíduos lignocelulósicos em cogumelos comestíveis (MATHEUS e OKINO, 1998; SANTOS, 2000).

O cultivo em meio líquido, começou a ser estudado com o objetivo de utilizar o caldo de cultivo de *Pleurotus* para a produção de substâncias com potencialidades terapêuticas, como antimicrobianos (HARA *et al.*, 1987; WISBECK *et al.*, 2002) e polissacarídeos extracelulares com atividade antitumoral (BURNS *et al.*, 1994; WISBECK *et al.*, 2005).

Wisbeck (2003) obteve cerca de 4,0g/L de polissacarídeos extracelulares em cultivo submerso de *Pleurotus sajor-caju* CCB 019 e *Pleurotus ostreatus* DSM 1833, em meio POL com 40g/L de glicose inicial. Porém a autora não avaliou a atividade antitumoral dos polissacarídeos produzidos.

Segundo Rosado *et al.*, 2003 a principal fração de polissacarídeos extracelulares de *Pleurotus spp.* é insolúvel em água (um total de 80% do polímero extracelular) e é composto principalmente por (1→3), (1→6)-β-glucanos. A menor fração solúvel em água contém glicose, manose, galactose e proteína, sendo ricas

em amido e resíduos de hidroxila que podem estar envolvidas em ligações com proteínas-polissacarídeos.

Estudou-se, ainda, a possibilidade de se utilizar o micélio de *Pleurotus ostreatus* obtido em cultivo submerso, como inóculo para a produção de corpos frutíferos em cultivo sólido utilizando resíduos lignolulósicos (SILVEIRA *et al.*, 2006).

Dentre os fungos do gênero *Pleurotus*, destaca-se a espécie *Pleurotus ostreatus*, conhecido como cogumelo ostra, de acordo com Sepcic *et al.*, (2003). São fungos lignocelulolíticos com aplicações medicinais, biotecnológicas e ambientais (SEPCIC *et al.*, 2003; OBODAI *et al.*, 2003).

2.3 Polissacarídeos

Polissacarídeos representam estruturalmente uma classe de macromoléculas com ampla ocorrência na natureza e oferecem uma alta capacidade para carregar informações biológicas devido a estas moléculas possuírem uma grande variabilidade estrutural. As unidades de monossacarídeos nos oligossacarídeos e polissacarídeos podem interconectar-se por ligações glicosídicas para formar várias ramificações ou estruturas lineares (OOI e LIU, 2000). Alguns microrganismos (algas, bactérias e fungos), assim como as plantas, produzem diferentes polissacarídeos que podem ser aplicados na biotecnologia. Atualmente o avanço nas tecnologias químicas tem permitido o isolamento e a purificação de alguns compostos, especialmente polissacarídeos presentes em fungos, de alta massa molar molecular (β -glucanos), com atividade antitumoral e potencial imunomodulatório (GLAZER e NIKAIDO, 1995; ROUT *et al.*, 2006; LAVI, *et al.*, 2006).

Os polissacarídeos de origem fúngica podem ser extraídos do corpo frutífero, do micélio e do caldo de cultivo de fungos, através de métodos de fracionamento que envolvem extrações a quente com água, etanol ou acetona (MIZUNO *et al.*, 1995; OOI e LIU, 2000; ZHANG, *et al.*, 2004a).

Os polímeros do grupo dos glucanos são os encontrados em maior abundância dentre os polissacarídeos, inclusive nos de origem fúngica (KARNEZIZ *et al.*, 2000).

2.3.1 Glucanos

O grupo dos glucanos, polímeros formados por moléculas de glicose, inclui a celulose, o amido, o glicogênio e muitas outras macromoléculas produzidas pelos seres vivos. Os glucanos mais comumente presentes nos vegetais e microrganismos são aqueles que apresentam diferentes tipos de ligações glicosídicas tais como (1→3), (1→6)- β -glucanos e (1→3)- α -glucanos (OOI e LIU, 1999).

Os β -glucanos estão presentes na parede celular de alguns vegetais como aveia, trigo e cevada (CARR, *et al.*, 1990; HENRY, 1987). Algumas propriedades terapêuticas são encontradas nos polissacarídeos de origem vegetal, porém os polissacarídeos de origem fúngica apresentam superioridade nas várias outras propriedades tais como atividades antitumoral, imunomodulatória, antiviral, antimicrobiana e antiparasitária (CHEUNG, 1998; FUJIMIYA, *et al.*, 1998; WASSER e WEISS, 1999).

Os β -glucanos apresentam ainda atividade de redução do colesterol (GUNDE-CIMERMAN e CIMERMAN, 1995), o que reforça seu grande potencial de aplicação na área da saúde.

Mizuno (1990), ao fracionar polissacarídeos obtidos de *Agaricus blazei* (cogumelo do sol) encontrou, entre outros, (1-6) β -D-glucanos com elevada atividade antitumoral ao realizar testes com células tumorais de Sarcoma 180 em camundongos.

Vários trabalhos (IKEKAWA *et al.*, 1969; CHIAHARA *et al.*, 1970; MORI *et al.*, 1987; RODRIGUES *et al.*, 2003) têm demonstrado que a administração intraperitoneal de polissacarídeos de várias espécies de cogumelos, bem como a suplementação da ração com 10-30% (p/p) do corpo frutífero pulverizado, apresentam atividade antitumoral para certos tipos de tumores em camundongos.

Lee *et al.* (2003) testaram por via oral duas concentrações de extrato de *Agaricus blazei* (100 e 300 mg/Kg de animal) contra Sarcoma 180 em duas linhagens de ratos (ICR e KSN). Os autores observaram uma redução bastante significativa entre o 17º e o 24º dia de tratamento, sendo que o melhor resultado foi obtido com a menor concentração do extrato e com a linhagem de rato ICR.

2.3.1.1 β -glucanos de fungos do gênero *Pleurotus*

Fungos do gênero *Pleurotus* vêm sendo avaliados quanto as suas composições nutricionais, com elevada concentração de carboidratos (57%) e fibras (14%), e medicinais pela presença de β -glucanos em sua parede celular (DALLIES, *et al.*, 1998; ROSADO, *et al.*, 2003), com atividade antitumoral.

Ikekawa *et al.* (1969) testaram em camundongos Swiss albino, extratos aquosos obtidos de sete linhagens fúngicas, entre as quais *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus spodoleucus* que apresentaram taxas de regressão de 75,3 e 72,3%, respectivamente, para Sarcoma 180.

Yoshioka *et al.* (1985) isolaram β -(1 \rightarrow 3)-glucano com cadeias laterais β -(1 \rightarrow 6) do corpo de frutificação de *Pleurotus ostreatus*, o qual mostrou atividade contra o Sarcoma 180 em ratos através de mecanismo imunomodulador.

Os polissacarídeos obtidos de alguns basidiomicetos, como *Pleurotus ostreatus*, quando testados *in vitro* com soro de *Cavia porcellus*, inibiram o crescimento do Sarcoma 180 (OKUDA, *et al.*, 1972). Também foi observado por Zhang *et al.* (2004a) a atividade antitumoral de polissacarídeos extraídos de *Pleurotus tuber regiun* contra células de Sarcoma 180. No tratamento *in vivo* realizado com camundongos machos (BALB) de oito semanas, a concentração da substância utilizada no tratamento foi de 20mg/kg administrada por 10 dias aos animais. Para a concentração inicial de células tumorais de 1×10^5 cel/camundongo a atividade antitumoral de *Pleurotus tuber regiun* variou de a 55,3 a 65,4%.

A atividade antitumoral do polissacarídeo “lectina” extraído de *Pleurotus ostreatus*, foi comprovada em experimentos realizados em camundongos machos ICR com indução de células cancerígenas de Sarcoma 180 na concentração de 5×10^7 cel/mL. Os animais foram tratados por 20 dias com o polissacarídeo na dose de 1,5 mg/kg. Os resultados revelaram que o tratamento proporcionou tempo de sobrevida prolongado, aumento de massa corporal e redução tumoral (WANG e GAO, 2000).

Mizuno (1999) investigou a ação antitumoral das frações de polissacarídeos obtidas do corpo frutífero de treze linhagens de basidiomicetos, dentre elas *Pleurotus sajor-caju* e *Pleurotus citrinopileatus*, em camundongos ICR/SLC, na dose de 0,2mL/dia durante 10 dias consecutivos. Os resultados demonstraram que houve

uma inibição do tumor Sarcoma 180, de 90,1 e 100%, respectivamente, ao se utilizar as frações obtidas de *Pleurotus sajor-caju* e *Pleurotus citrinopileatus*.

Zhuang *et al.* (1993) testou varias frações de polissacarídeos em camundongos fêmeas JCR/SLC, pesando em média 23 a 27 gramas. Foram inoculados 6×10^6 células de Sarcoma 180 por mL e esses animais foram tratados com a substância teste na concentração de 10mg/kg por 10 dias. Os resultados obtidos com a fração FIII-2 α foi de 100% de redução do tumor.

Karácsoyi e Kuniak (1994) isolaram β -D-glucano de *Pleurotus ostreatus* (pleuran) e administraram a substância em camundongos na concentração de 10mg/kg, 72 e 24 horas antes da indução das bactérias *Listeria monocytogenes* e *Haemophilus influenzae*. Os resultados demonstraram eficácia do tratamento na promoção da sobrevivência dos animais suscetíveis às infecções.

3. METODOLOGIA

3.1 Microrganismo e manutenção

Pleurotus ostreatus DSM 1833 foi utilizado para síntese e extração de polissacarídeos em meios sólido e líquido. A linhagem foi mantida em meio sólido TDA (Trigo-Dextrose-Ágar) (FURLAN *et al.*, 1997), sob refrigeração a 4°C e os repiques realizados a cada três meses.

3.2 Animais e manutenção

Foram utilizados camundongos albinos Swiss fêmeas (*Mus musculus*), de 25± 5 g, mantidos no laboratório de Tratamento Crônico da UNIVILLE, com ração e água e 12h luz/dia, pelo período necessário para o desenvolvimento do experimento (VERÇOSA JUNIOR *et al.*, 2006), a 22°C ± 1. Os animais foram obtidos do Biotério do Instituto de Tecnologia do Paraná – TECPAR.

Todos os experimentos realizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa da Univali (Anexo B).

3.3 Células tumorais e manutenção

Com base na literatura foram utilizados Tumor Ascítico de Ehrlich – TAE (ALMEIDA, 2000; AJITH e JANARDHANAN 2003 e VERÇOSA JUNIOR *et al.*, 2006) e Sarcoma 180 -S180 (ZHUANG *et al.*, 1993; ANDRADE *et al.*, 2004).

As linhagens tumorais foram mantidas por transplantes seriados através de aplicações intraperitoneais semanais com um volume de 0,2 mL de suspensão tumoral em camundongos (PAGNO *et al.*, 2006).

3.4 Indução tumoral

A indução tumoral foi realizada intraperitonealmente, inoculando-se 0,2mL de uma suspensão tumoral na concentração de 25×10^6 células/mL (MATSUZAKI *et al.*, 2006 ; PAGNO *et al.*, 2006 e SATO *et al.* 2005).

3.5 Corpos frutíferos de *Pleurotus ostreatus*

3.5.1 Obtenção dos corpos frutíferos

O inóculo ou “spawn” foi preparado conforme metodologia descrita por (BONATTI, 2001) consistindo de grãos de trigo colonizados com micélio de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833.

O substrato, palha de folhas de bananeira, foi triturado em partículas de 2 a 5 cm, seco em estufa a 60°C por 1 hora e embalado em sacos de ráfia (MADAN *et al.*, 1987). Este material foi imerso em água por 12 horas e, após este período, foi drenado por 3 horas. Em seguida, o substrato foi suplementado com 5% de farelo de arroz (em relação à massa de substrato seco), homogeneizado e embalado (150g de substrato seco por pacote de polipropileno de 25 x 35 cm). Os pacotes foram fechados com respiro de espuma e fita crepe e autoclavados por 1 hora a 121°C. Em seguida, foram resfriados e inoculados em cabine de segurança biológica tipo 2, usando 10% de inóculo (em relação à massa de substrato seco), incubados na ausência de luz, a 25°C por aproximadamente 20 dias.

Após a colonização do substrato pelo micélio foi realizada a indução dos primórdios através da perfuração dos pacotes, com orifícios de aproximadamente 0,5 cm e exposição destes à luz por um período de 12 horas/dia, com umidade relativa do ar de 90% e temperatura de 30°C, até a formação dos corpos frutíferos.

A frutificação foi realizada em câmara de cultivo com controle automático de iluminação, de temperatura e de umidade relativa do ar (Figura1).

O ponto de colheita foi definido de forma visual, conforme descrito por Sturion (1994). Os corpos frutíferos (Figura 2) foram colhidos com bisturi, sendo parte desidratada a 40°C por 24 horas em estufa com circulação de ar forçada, para

posterior teste da capacidade antitumoral e parte utilizada *in natura* para extração de compostos bioativos.



Figura 1 – Câmara de cultivo com pacotes de substrato colonizado pelo micélio fúngico em fase de indução dos primórdios.



Figura 2 – Câmara de cultivo com pacotes em fase de frutificação.

3.5.2 Experimento com corpo frutífero (CF)

3.5.2.1 Preparo do corpo frutífero

O CF desidratado com composição química apresentada na Tabela 1 (item 2.2.2), foi triturado junto com a ração da alimentação dos camundongos na proporção 70:30 (g de ração : g de CF), com aproximadamente 50 mL água destilada, remodelados conforme tamanho original dos pellets da ração convencional e levados a estufa a 40°C por 24 horas.

3.5.2.2 Tratamento com corpo frutífero

A alimentação dos animais com a ração suplementada com CF foi iniciada 24 horas após a implantação do tumor e mantida pelo período de 15 dias.

3.5.3 Experimento com extrato obtido dos corpos frutíferos *in natura* (FPI)

3.5.3.1 Extração dos polissacarídeos dos corpos frutíferos *in natura*

A extração dos polissacarídeos de potencial antitumoral a partir dos corpos frutíferos foi realizada com base nas metodologias propostas por Zhuang *et al.* (1993) e Zhang *et al.* (1994), modificada: 900g de cogumelos *in natura*, picados, foram fervidos a 100°C em água, num copo de Becker de 2000 mL por 4 horas. O extrato obtido foi separado por filtração simples e acrescentado de etanol 96% na proporção extrato:etanol igual a 1:5 (v/v). O precipitado formado foi separado e chamado de FP-I (fração de polissacarídeo I), sendo dialisado em membrana Sigma Diagnostics (St. Louis, Mo 63178 USA) por 20 horas, para remover açúcares de baixa massa molar e liofilizado, em um liofilizador Terroni * Fauvel - LT 1000/8, até a secagem total dos polissacarídeos isolados.

3.5.3.2 Tratamento com extrato obtido dos corpos frutíferos *in natura*

O tratamento dos animais com FPI foi iniciado 24 horas após a implantação do tumor e administrado na concentração de 1g de FPI liofilizado/L (0,335g de polissacarídeos/L), por via intraperitoneal (*ip*) e por via intragástrica (*ig*), na concentração de 10 mg/Kg de massa corporal de animal/dia, durante seis dias. A dose administrada foi corrigida diariamente de acordo com a massa do animal.

3.6 Caldo de cultivo de *Pleurotus ostreatus*

3.6.1 Obtenção do caldo de cultivo

Para o cultivo de *Pleurotus ostreatus* em meio líquido foram utilizados frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL de meio POL (MAZIERO *et al.*, 1999): 5,0 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,0 g de K_2HPO_4 ; 2,0 g de extrato de levedura; 1,0 g de peptona; 20g de glicose; água destilada qsp 1,0 L; pH 6,5 a 7,0. Após esterilização a 121°C por 15 minutos, os frascos foram resfriados e inoculados com 2 discos de ágar de 13 ± 1 mm de diâmetro colonizados pelo micélio fúngico, incubados em agitador Certomat B. Braum (Figura 3) com movimento recíproco (120 min^{-1}), a 30°C por um período de 14 dias, conforme metodologia descrita por Wisbeck *et al.* (2002).



Figura 3 – Agitador contendo frascos Erlenmeyer para cultivo submerso de *Pleurotus ostreatus*.

3.6.2 Experimento com caldo de cultivo *in natura* (CCIN)

3.6.2.1 Preparo do caldo de cultivo *in natura*

O caldo de cultivo *in natura* foi filtrado em papel de filtro Whatmann nº1 para separação da biomassa, sendo armazenado em refrigerador a 4°C por, no máximo, dois dias antes do início do tratamento.

3.6.2.2 Tratamento com caldo de cultivo *in natura*

O tratamento dos animais com o CCIN numa concentração de polissacarídeos igual a 0,25 g/L, foi iniciado 24 horas após o implante tumoral e administrado por via intraperitoneal (*ip*) e por via intragástrica (*ig*), na concentração de 10 mL/Kg de massa corporal de animal/dia (ZHUANG *et al.*, 1993), durante seis dias. A dose administrada foi corrigida diariamente de acordo com a massa do animal.

3.6.3 Experimento com extrato do caldo de cultivo (ECC)

3.6.3.1 Extração dos polissacarídeos do caldo de cultivo

O caldo de cultivo, após a separação da biomassa, foi tratado com acetona resfriada a 8°C, na proporção acetona: caldo de 3:1 (v/v) (MAZIERO, 1996). Após 24 horas sob refrigeração a 4°C, para precipitação dos polissacarídeos extracelulares, a amostra foi centrifugada a 4500xg por 5 minutos e lavada duas vezes com uma solução acetona:álcool:água destilada, na proporção 3:1:1 (v/v/v) (CAVAZZONI e ADAMI, 1992). O extrato obtido do caldo de cultivo (ECC) foi liofilizado em um liofilizador Terroni * Fauvel - LT 1000/8 até a secagem total dos polissacarídeos isolados.

3.6.3.2 Tratamento com extrato do caldo de cultivo

O tratamento dos animais com ECC foi iniciado 24 horas após o implante tumoral e administrado por via intraperitoneal (*ip*) na concentração 1g de liofilizado de ECC/L (0,13g de polissacarídeos/L) na concentração de 10 mg/Kg de massa corporal de animal/dia, pelo período de seis dias. A dose administrada foi corrigida diariamente de acordo com a massa do animal.

3.7 Planejamento dos experimentos

Todos os tratamentos realizados neste trabalho foram conduzidos com as duas linhagens tumorais (S180 e TAE) e iniciados 24h após a indução tumoral. Os tratamentos basearam-se nas metodologias de Zhuang *et al.* (1993), Mizuno *et al.* (1995), Leung *et al.* (1997) e Sato *et al.* (2005) modificadas. Todos os testes, à exceção do tratamento com corpos frutíferos, foram conduzidos por seis dias, sendo que no sétimo dia os animais foram sacrificados (MIZUNO *et al.*, 1995; LEUNG *et al.*, 1997 e SATO *et al.*, 2005) e foi realizada a contagem de células tumorais no líquido ascítico (MIZUNO *et al.*, 1995 e SATO *et al.*, 2005). O tratamento com corpos frutíferos foi conduzido por 15 dias.

A figura 4 apresenta, de forma esquemática, o planejamento e a distribuição dos experimentos realizados.

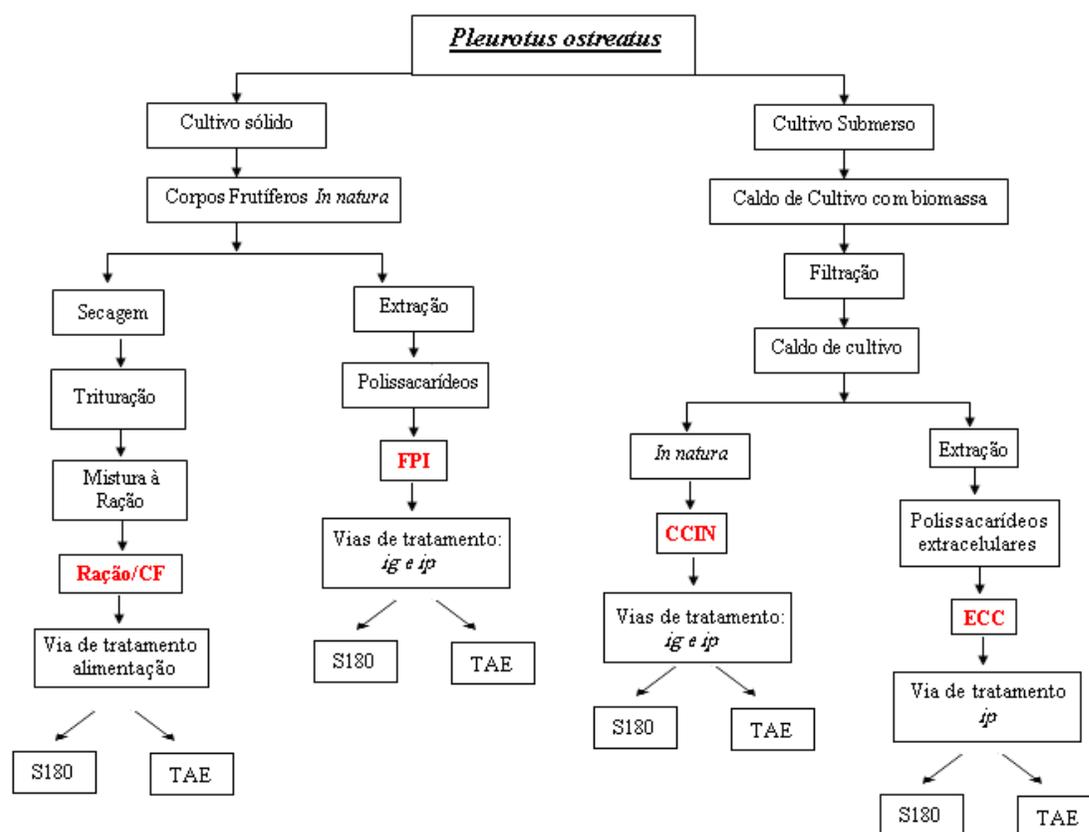


Figura 4 – Esquema de extração e administração das substâncias ração/corpo frutífero (Ração/CF), fração polissacarídeo - I (FPI), caldo de cultivo *in natura* (CCIN) e extrato de caldo de cultivo (ECC), para avaliação da atividade antitumoral por via oral, via intraperitoneal (*ip*) e via intragástrica (*ig*) em animais inoculados com células tumorais de Sarcoma 180 (S180) e Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE).

3.7.1 Composição dos grupos para realização dos experimentos

Os grupos de animais utilizados neste trabalho foram divididos em controle negativo, controle tumor, controle substância e experimentais. Os animais foram classificados por grupos e distribuídos nas respectivas gaiolas.

3.7.1.1 Grupos tratados por via oral (alimentação)

Os grupos tratados por via oral (alimentação) foram divididos da seguinte forma:

- 1º grupo: controle negativo, 3 camundongos sem tumor recebendo somente ração.
- 2º grupo: controle tumor TAE, 3 camundongos com tumor, recebendo somente ração.
- 3º grupo: controle tumor S180, 3 camundongos com tumor, recebendo somente ração.
- 4º grupo: controle substância com 3 camundongos sem tumor, tratados com o composto ração/CF.
- 5º grupo: experimental com 5 camundongos com tumor TAE, tratados com o composto ração/CF.
- 6º grupo: experimental com 5 camundongos com tumor S180, tratados com o composto ração/CF.

3.7.1.2 Grupos tratados por via intraperitoneal (*ip*)

Os grupos tratados com FPI, CCIN e ECC foram divididos da seguinte forma:

- 1º grupo: controle negativo (*ip*), 6 camundongos sem tumor, recebendo veículo (PBS 0,01M).
- 2º grupo: controle tumor TAE (*ip*), 6 camundongos com tumor, recebendo veículo (PBS 0,01M).
- 3º grupo: controle tumor S180 (*ip*), 6 camundongos com tumor, recebendo veículo (PBS 0,01M).
- 4º grupo: controle substância (*ip*), 6 camundongos sem tumor, recebendo FPI.
- 5º grupo: controle substância (*ip*), 6 camundongos sem tumor, recebendo CCIN.
- 6º grupo: controle substância (*ip*), 6 camundongos sem tumor, recebendo ECC.
- 7º grupo: grupo experimental com 3 sub-grupos de 6 camundongos com tumor TAE, recebendo FPI, por via (*ip*).

- 8º grupo: grupo experimental com 3 sub-grupos de 6 camundongos com tumor S180, recebendo FPI por via (*ip*).
- 8º grupo: grupo experimental com 3 sub-grupos de 6 camundongos com tumor TAE, recebendo CCIN por via (*ip*).
- 9º grupo: grupo experimental com 3 sub-grupos de 6 camundongos com tumor S180, recebendo CCIN por via (*ip*).
- 10º grupo: grupo experimental com 3 sub-grupos de 6 camundongos com tumor TAE, recebendo ECC por via (*ip*).
- 11º grupo: grupo experimental com 3 sub-grupos de 6 camundongos com tumor S180, recebendo ECC por via (*ip*).

3.7.1.3 Grupos tratados por via intragástrica (*ig*)

Os grupos tratados com FPI e CCIN foram divididos da seguinte forma:

- 1º grupo: controle negativo (*ig*), 6 camundongos sem tumor, recebendo veículo (PBS 0,01M).
- 2º grupo: controle tumor TAE (*ig*), 6 camundongos com tumor, recebendo veículo (PBS 0,01M).
- 3º grupo: controle tumor S180 (*ig*), 6 camundongos com tumor, recebendo veículo (PBS 0,01M).
- 4º grupo: controle substância (*ig*), 6 camundongos sem tumor, recebendo FPI.
- 5º grupo: controle substância (*ig*), 6 camundongos sem tumor, recebendo CCIN.
- 6º grupo: grupo experimental com 3 sub-grupos de 6 camundongos com tumor TAE, recebendo FPI, por via (*ig*).
- 7º grupo: grupo experimental com 3 sub-grupos de 6 camundongos com tumor S180, recebendo FPI por via (*ig*).
- 8º grupo: grupo experimental com 3 sub-grupos de 6 camundongos com tumor TAE, recebendo CCIN por via (*ig*).
- 9º grupo: grupo experimental com 3 sub-grupos de 6 camundongos com tumor S180, recebendo CCIN por via (*ig*).

3.8 Métodos analíticos

3.8.1 Determinação do número de células tumorais

Para contagem do número de células tumorais presentes no líquido ascítico, uma alíquota de 20 μ L da suspensão celular foi adicionada a 200 μ L de PBS 0,01M (8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 0,12 g KH_2PO_4 , 0,91 g Na_2HPO_4 , 1000 mL de água destilada em pH 7,2) mais 180 μ L de corante azul de tripan (0,1 ml a 0,2%) para fixação e coloração das células. A contagem de células foi realizada em microscópio óptico utilizando câmara de Neubauer (PAGNO *et al.*,2006).

Para obtenção de imagens das células a partir da câmara de Neubauer, foi acoplado ao microscópio óptico com objetivas de aumento 100x, câmara de vídeo MAROTEC, câmara: SONY, Modelo: Hyper HAD.

3.8.2 Avaliação da massa corporal dos animais

O massa corporal dos animais foi determinada antes do implante tumoral e diariamente até o final do experimento, utilizando uma balança semi analítica Mettler Toledo PS7.

3.8.3 Determinação do volume do líquido ascítico

Para a determinação do volume de líquido ascítico foi inserido na cavidade peritoneal 4 mL de PBS 0,01M, posteriormente descontados do volume total de líquido. Realizou-se uma breve massagem no peritônio do animal e, em seguida, aspirou-se o líquido por meio de uma seringa de 5 mL e este foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL para medida do volume total (MATSUZAKI *et al.*, 2003 e PAGNO *et al.*,2006).

3.8.4 Análise da concentração de polissacarídeos

3.8.4.1 No caldo de cultivo *in natura* (CCIN)

Uma alíquota do caldo de cultivo (20 mL), após separação da biomassa, foi tratada com acetona na proporção acetona:caldo igual a 3:1 (v/v), e após 24h sob refrigeração a 4°C, para precipitação do polissacarídeo, as amostras foram centrifugadas (4000xg por 10min), lavadas duas vezes com uma solução de acetona:etanol:água destilada, na proporção 3:1:1 (v/v/v) (CAVAZZONI e ADAMI, 1992). As amostras foram ressuspensas ao volume original (20mL) pela adição de solução de ácido sulfúrico diluído. A concentração de açúcares redutores totais (ART) presentes no CCIN foi então determinada indiretamente pelo método colorimétrico fenol-sulfúrico (DUBOIS, 1956).

3.8.4.2 Nas frações FPI e ECC

Pesou-se 2 mg de cada amostra (FPI ou ECC) em um tubo de ensaio e acrescentou-se 1 mL de água destilada e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado em cada tubo para solubilização. Após completa dissolução, adicionou-se 8 mL de água destilada para completar um volume final de 10 mL, ou seja, concentração final de 0,2 mg/mL ou 0,2 g de extrato liofilizado/L. A concentração de açúcares redutores totais (ART) presentes no FPI e no ECC foi então determinada indiretamente pelo método colorimétrico fenol-sulfúrico (DUBOIS, 1956).

Uma curva de calibração “tipo” utilizada para os cálculos de concentração de polissacarídeos pelo método de Dubois (1956) está apresentada no Anexo A.

3.8.5 Análise Estatística

Com exceção dos dados relacionados à cinética da variação da massa corporal dos animais com o tempo, todos os demais dados obtidos foram analisados por meio do teste estatístico para rejeição de valores desviantes, denominado Teste ‘Q’ de Dixon (r_{10}), com nível de confiança de 95% (RORABACHER, 1991). Os

resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de valores médios, através do Teste F com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Estudo da capacidade antitumoral de *Pleurotus ostreatus* sobre Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE)

4.1.1 Tratamento com corpo frutífero (CF)

A tabela 2 apresenta os resultados obtidos para o tumor TAE, em animais tratados por via oral, com ração/corpo frutífero *in natura* de *Pleurotus ostreatus* (ração/CF). A tabela mostra também os resultados obtidos para os grupos controle negativo (sem indução tumoral e sem tratamento), controle substância (sem indução tumoral e com tratamento) e controle tumor (com indução tumoral e sem tratamento)

Tabela 2: Ganho da massa corporal (g), volume de líquido ascítico no peritônio (mL) e número de células de TAE no líquido ascítico ($\times 10^6$ cel/mL) após seis dias de tratamento (via oral) dos animais com ração/corpo frutífero (ração/CF).

GRUPO	Ganho de massa corporal (g)	Volume líquido ascítico (mL)	Nº células tumorais ($\times 10^6$ cel/mL)
Controle negativo *	18,6 \pm 0,4	-	-
Controle tumor *	28,5 \pm 2,2	12,3 \pm 0,7	800 \pm 25
Grupo experimental *	2,3 \pm 1,2	5,75 \pm 1,2	395 \pm 86
Controle substância *	16,7 \pm 0,4	-	-

* Valor médio \pm erro padrão

A figura 5 apresenta os perfis de evolução da massa corporal dos animais em função do tempo para os tratamentos do TAE por alimentação com ração/corpo frutífero (ração/CF).

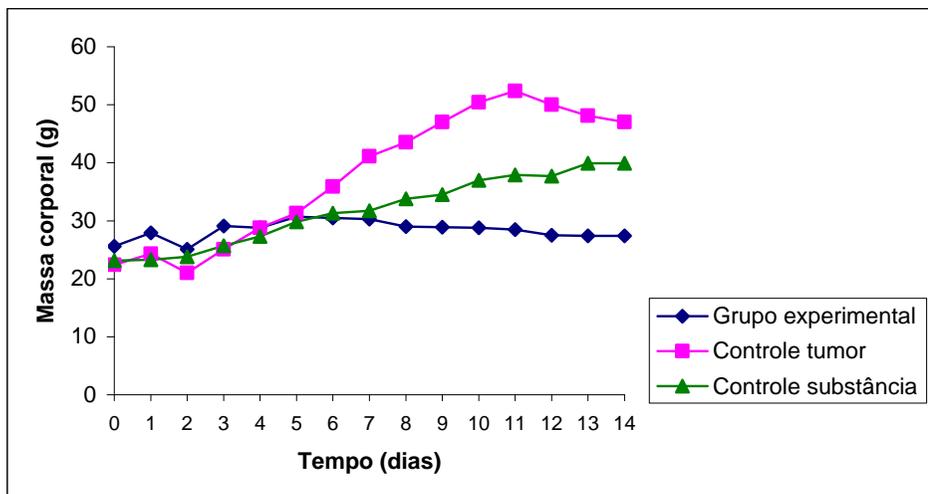


Figura 5 - Variação da massa corporal (g) dos animais em função do tempo para o tratamento do TAE por alimentação com ração/corpo frutífero (ração/CF).

De acordo com os dados da tabela 2, analisando a diferença de volume de líquido ascítico entre os grupos, observa-se que este volume é menor nos animais em tratamento. Considerando-se os valores médios, a redução do número de células tumorais do grupo experimental foi de 59% em relação ao controle tumor. No entanto, se considerarmos o erro padrão, este valor cai para 38% e representa a redução tumoral mínima a ser admitida para este experimento.

Comparando a massa corporal (figura 5) do grupo experimental com os demais grupos, constata-se que ocorreu uma diferença considerável, sendo que o grupo experimental obteve pouco ganho de massa corporal.

4.1.2 Tratamento com extrato de corpo frutífero *in natura* (FPI)

A tabela 3 apresenta os resultados obtidos para o tumor TAE, em animais tratados por via intraperitoneal (*ip*) e intragástrica (*ig*), com a substância teste FPI (extrato de corpos frutíferos *in natura* de *Pleurotus ostreatus*). A tabela mostra também os resultados obtidos para os grupos controle negativo (sem indução tumoral e sem tratamento), controle substância (sem indução tumoral e com tratamento) e controle tumor (com indução tumoral e sem tratamento).

Tabela 3: Ganho da massa corporal (g), volume de líquido ascítico no peritônio (mL) e número de células de TAE no líquido ascítico ($\times 10^6$ cel/mL) após seis dias de tratamento (via intraperitoneal e via intragástrica) dos animais com extrato do corpo frutífero *in natura* (FPI).

GRUPO	Ganho de massa corporal (g)	Volume líquido ascítico (mL)	Nº células tumorais ($\times 10^6$ cel/mL)
Controle negativo <i>ip</i> *	10,6 \pm 0,5	-	-
Controle tumor <i>ip</i> *	13,0 \pm 0,1	1,5 \pm 1,0	575 \pm 100
Experimental <i>ip</i> **	2,1 \pm 0,4	1,8 \pm 0,3	167 \pm 24
Controle substância <i>ip</i> *	7,3 \pm 0,8	-	-
Controle negativo <i>ig</i> *	11,7 \pm 0,6	-	-
Controle tumor <i>ig</i> *	10,7 \pm 0,9	2,3 \pm 0,6	546 \pm 64
Experimental <i>ig</i> **	14,2 \pm 0,6	5,0 \pm 0,7	551 \pm 58
Controle substância <i>ig</i> *	9,1 \pm 0,3	-	-

*Valor médio \pm erro padrão

** Valor médio entre os 3 sub-grupos experimentais \pm erro padrão

As figuras 6 e 7 apresentam os perfis de evolução da massa corporal dos animais em função do tempo para os tratamentos *ip* e *ig*, respectivamente.

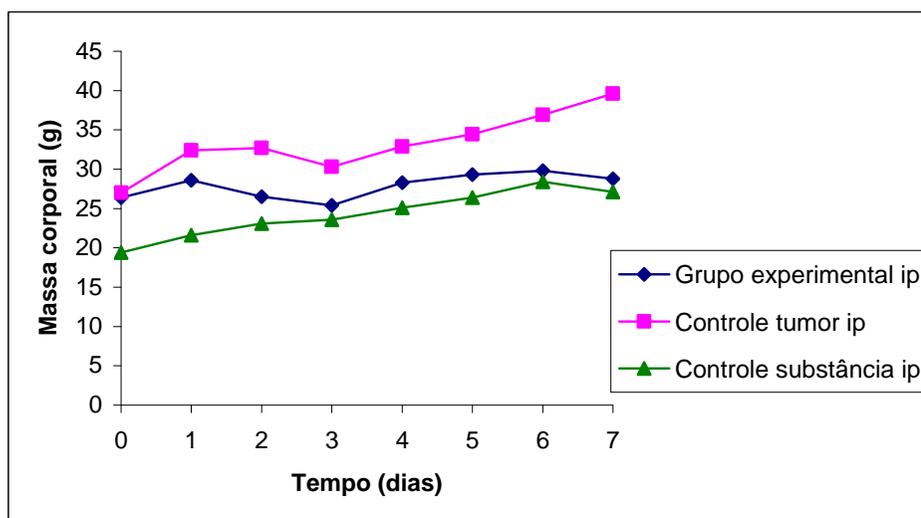


Figura 6 - Variação da massa corporal (g) dos animais (média dos 3 sub-grupos experimentais) em função do tempo para o tratamento do TAE por via *ip*, utilizando extrato do corpo frutífero *in natura* (FPI).

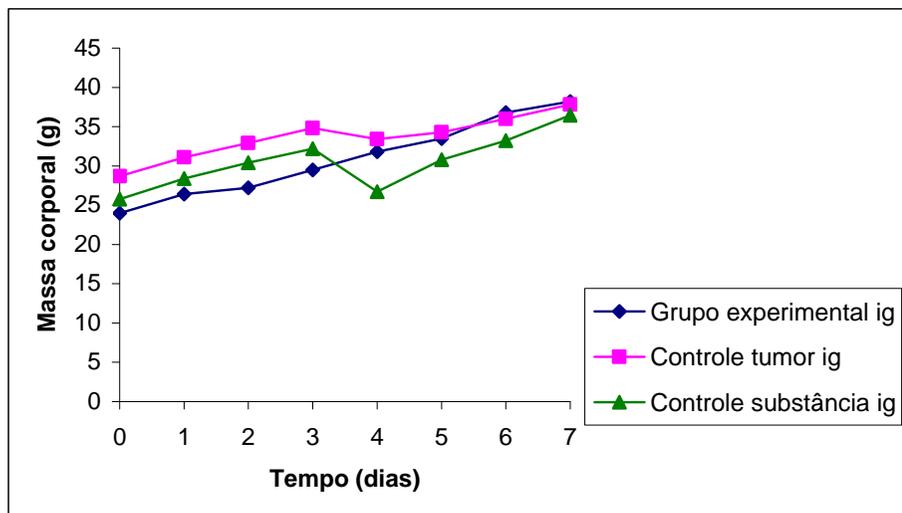


Figura 7 - Variação da massa corporal (g) dos animais (média dos 3 sub-grupos experimentais) em função do tempo para o tratamento do TAE por via *ig*, utilizando extrato do corpo frutífero *in natura* (FPI).

Ao analisar os dados da tabela 3, observa-se que o grupo experimental *ig*, controle substância, controles tumor *ip* e *ig* alcançaram os maiores ganhos de massa corporal quando comparados ao grupo experimental *ip*. No que diz respeito ao volume de líquido ascítico, o grupo experimental *ig* apresentou maior valor em relação aos demais grupos. Levando-se em consideração os valores médios, o grupo experimental *ip* apresentou 71% menos células tumorais em relação ao controle (o valor mínimo, considerando o erro padrão é de cerca de 60%), enquanto que a via de administração *ig* não apresentou qualquer redução.

Analisando-se a figura 6 observa-se que o perfil de variação de massa corporal dos animais tratados por via *ip*, assemelha-se, a partir do 4º dia de tratamento, ao do grupo saudável (controle substância). Este fato não foi observado na figura 7, quando o tratamento *ig* foi utilizado, pois todos os grupos ganharam massa corporal ao longo do tempo de tratamento, atingindo valores finais semelhantes. Conclui-se, portanto, que no tratamento com FPI, o ganho de massa corporal do grupo experimental *ig* está diretamente associado ao crescimento do tumor, que atingiu, após o tratamento $551 \pm 58 \times 10^6$ cel/mL contra $167 \pm 24 \times 10^6$ cel/mL do grupo experimental *ip*.

4.1.3 Tratamento com caldo de cultivo *in natura* (CCIN)

A tabela 4 apresenta os resultados obtidos para os tratamentos do TAE em animais, realizados com caldo de cultivo *in natura* de *Pleurotus ostreatus*, assim como de seus respectivos grupos controle.

Tabela 4: Ganho da massa corporal (g), volume de líquido ascítico no peritônio (mL) e número de células de TAE no líquido ascítico ($\times 10^6$ cel/mL) após seis dias de tratamento (via intraperitoneal e via intragástrica) dos animais com caldo de cultivo *in natura* (CCIN).

GRUPOS	Ganho de massa corporal (g)	Volume líquido ascítico (mL)	Nº células tumorais ($\times 10^6$ cel/mL)
Controle negativo <i>ip</i> *	10,6 \pm 0,5	-	-
Controle tumor <i>ip</i> *	14,2 \pm 1,4	5,7 \pm 0,7	680 \pm 115
Experimental <i>ip</i> **	3,05 \pm 0,7	3,8 \pm 0,4	206 \pm 28
Controle substância <i>ip</i> *	11,7 \pm 0,7	-	-
Controle negativo <i>ig</i> *	11,7 \pm 0,6	-	-
Controle tumor <i>ig</i> *	15,1 \pm 0,6	5,4 \pm 1,4	422 \pm 63
Experimental <i>ig</i> **	15,6 \pm 0,7	5,4 \pm 0,6	558 \pm 64
Controle substância <i>ig</i> *	11,6 \pm 0,6	-	-

*Valor médio \pm erro padrão

** Valor médio entre os 3 sub-grupos experimentais \pm erro padrão

As figuras 8 e 9 apresentam os perfis de evolução da massa corporal dos animais em função do tempo para os tratamentos *ip* e *ig*, respectivamente.

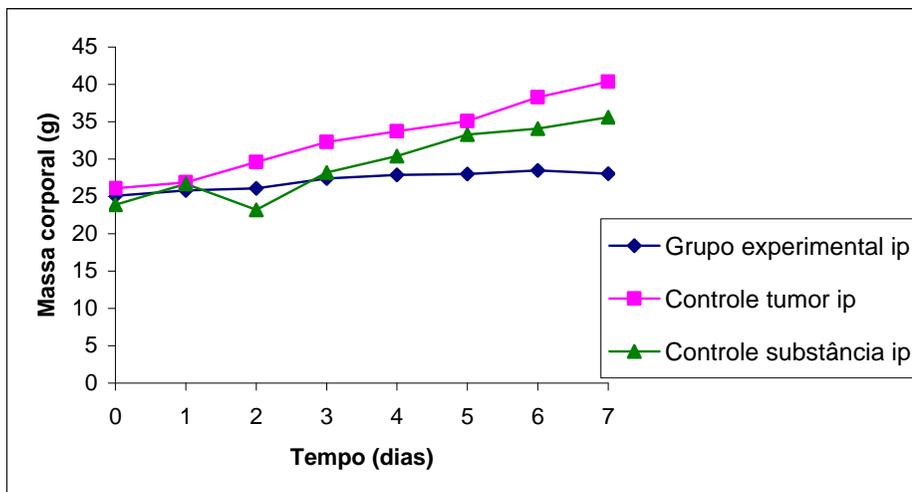


Figura 8 - Variação da massa corporal (g) dos animais (média dos 3 sub-grupos experimentais) em função do tempo para o tratamento de TAE por via *ip* utilizando caldo de cultivo *in natura* (CCIN).

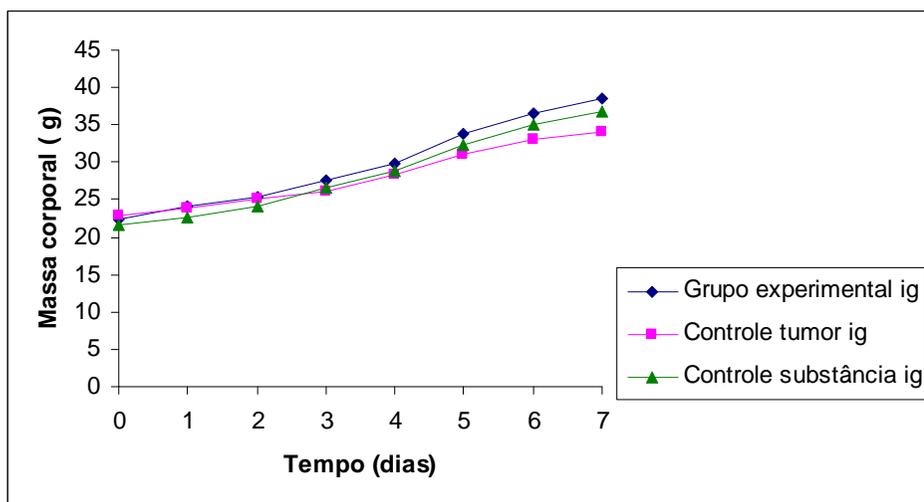


Figura 9 - Variação da massa corporal (g) dos animais (média dos 3 sub-grupos experimentais) em função do tempo para o tratamento de TAE por via *ig* utilizando caldo de cultivo *in natura* (CCIN).

Conforme os dados apresentados na tabela 4, o grupo tratado por via intraperitoneal evidenciou o menor ganho de massa corporal quando comparado aos outros grupos. No volume de líquido ascítico foi observado que o grupo experimental *ip* apresentou menor volume quando comparado aos grupos controles tumor *ip*, *ig* e experimental *ig*. Ao ser analisado o número de células tumorais do grupo

experimental tratado por via *ip*, verificou-se uma redução média de 70% no número de células tumorais em relação ao grupo controle tumor *ip* (com redução mínima de 59%). Novamente, o tratamento do TAE por via *ig* não se mostrou eficaz.

Os resultados obtidos para o tratamento realizado com caldo de cultivo *in natura* (CCIN) revelam que o grupo experimental *ip* (figura 8) teve um menor ganho de massa corporal ao longo do tempo em comparação aos grupos controles, enquanto que no grupo experimental *ig* (figura 9) a evolução da massa corporal dos animais é similar para os grupos experimentais e grupos controles. Da mesma forma, o menor ganho de massa corporal apresentado pelo grupo experimental *ip* está relacionado ao menor volume de células tumorais no líquido ascítico.

4.1.4 Tratamento com extrato de caldo de cultivo (ECC)

Considerando-se os resultados obtidos nos testes anteriores para o tratamento do TAE por via *ig*, este tratamento não foi avaliado para o extrato de caldo de cultivo (ECC).

A tabela 5 apresenta os resultados obtidos para o tratamento do TAE em animais, realizado com (ECC) de *Pleurotus ostreatus*, assim como de seus respectivos testes controle.

Tabela 5: Ganho da massa corporal (g), volume de líquido ascítico no peritônio (mL) e número de células de TAE no líquido ascítico ($\times 10^6$ cel/mL) após seis dias de tratamento (via intraperitoneal) dos animais com extrato de caldo de cultivo (ECC).

GRUPO	Ganho de massa corporal (g)	Volume líquido ascítico (mL)	Nº células tumorais ($\times 10^6$ cel/mL)
Controle negativo <i>ip</i> *	10,6 \pm 0,5	-	-
Controle tumor <i>ip</i> *	12,9 \pm 0,9	11,0 \pm 0,8	353 \pm 44
Experimental <i>ip</i> **	9,0 \pm 0,8	6,75 \pm 0,6	84 \pm 12
Controle substância <i>ip</i> *	12,9 \pm 0,8	-	-

* Valor médio \pm erro padrão

** Valor médio entre os 3 sub-grupos experimentais \pm erro padrão

A figura 10 mostra a variação de massa corporal (g) dos animais em função do tempo para o tratamento de TAE por via *ip* utilizando extrato de caldo de cultivo (ECC).

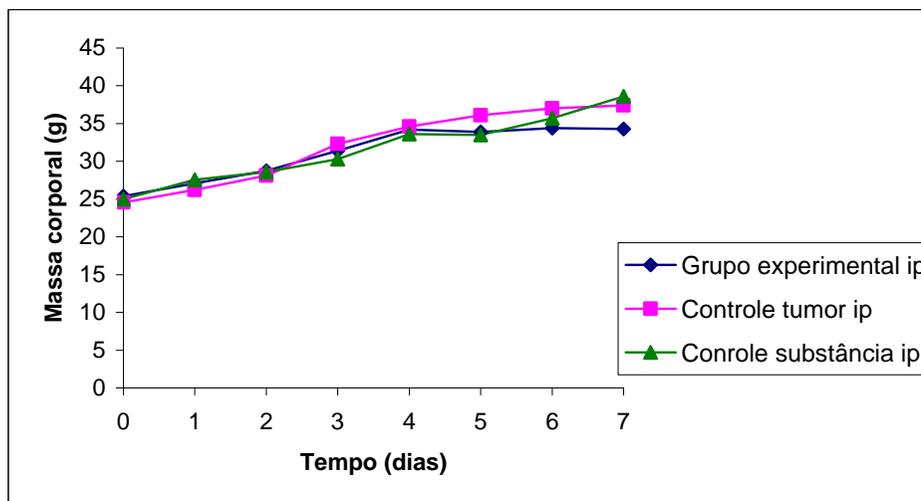


Figura 10 - Variação da massa corporal (g) dos animais (média dos 3 sub-grupos experimentais) em função do tempo para o tratamento do TAE por via *ip* utilizando extrato de caldo de cultivo (ECC).

A tabela 5 mostra pouca diferença no ganho de massa corporal entre os grupos, porém nota-se diferença significativa entre volume de líquido ascítico e também no número de células no líquido ascítico. Atingiu-se uma redução tumoral média de 76% e uma redução mínima de 69%.

Conforme a figura 10, os perfis de variação de massa corporal dos animais em função do tempo para o tratamento do TAE por via *ip* utilizando extrato de caldo de cultivo (ECC) é muito similar aos respectivos controles.

4.2 Estudo da capacidade antitumoral de *Pleurotus ostreatus* sobre Sarcoma 180 (S180)

4.2.1 Tratamento com corpo frutífero (CF)

A tabela 6 apresenta os resultados obtidos para o tumor S180, em animais tratados por via oral, com a substância ração/corpo frutífero de *Pleurotus ostreatus* (ração/CF). A tabela mostra também os resultados obtidos para os grupos controle negativo (sem indução tumoral e sem tratamento), controle substância (sem indução tumoral e tratado com a substância teste) e controle tumor (com indução tumoral e sem tratamento).

Tabela 6: Ganho da massa corporal (g), volume de líquido ascítico no peritônio (mL) e número de células de S180 no líquido ascítico ($\times 10^6$ cel/mL) após seis dias de tratamento (via oral) dos animais com ração/corpo frutífero (ração/CF).

GRUPO	Ganho de massa corporal (g)	Volume líquido ascítico (mL)	Nº células tumorais ($\times 10^6$ cel/mL)
Controle negativo *	18,6 \pm 0,4	-	-
Controle tumor *	22,3 \pm 0,05	18,3 \pm 0,9	925 \pm 29
Grupo experimental *	7,2 \pm 1,0	9,0 \pm 0,4	340 \pm 38
Controle substância *	16,7 \pm 0,4	-	-

* Valor médio \pm erro padrão

A figura 11 apresenta a variação da massa corporal (g) dos animais em função do tempo para o tratamento do S180 por alimentação com ração/corpo frutífero (ração/CF).

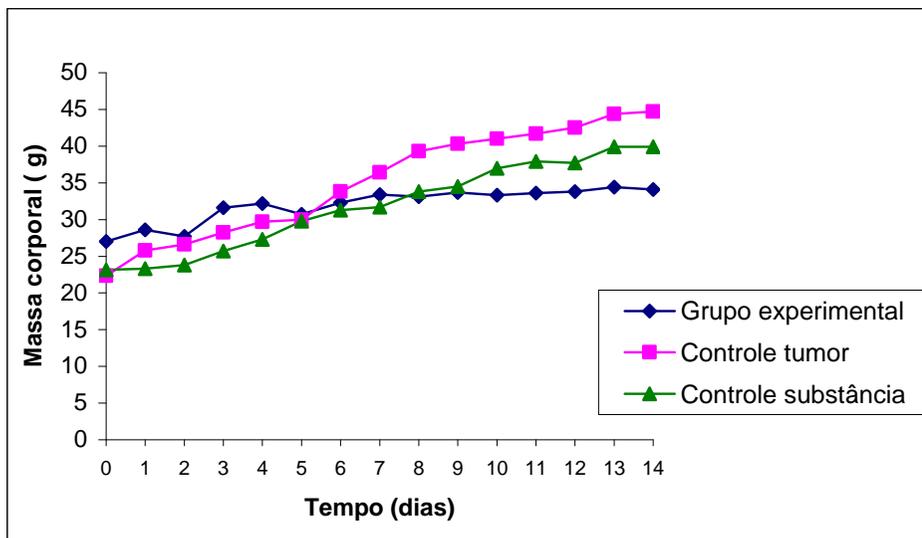


Figura 11 - Variação da massa corporal (g) dos animais em função do tempo para o tratamento do S180 por alimentação com ração/corpo frutífero (ração/CF).

Os resultados obtidos para o tratamento realizado com ração/CF revelam que o grupo experimental teve um menor ganho de massa corporal ao longo do tempo em comparação aos controles. Levando em consideração o erro padrão, o volume de líquido ascítico e o número de células tumorais são 46% e 58% inferiores, respectivamente, os valores observados no grupo controle tumor. Já a redução média do número de células tumorais foi de 63%.

4.2.2 Tratamento com extrato de corpo frutífero *in natura* (FPI)

A tabela 7 apresenta os resultados obtidos para o tratamento do Sarcoma 180 (S180) em animais, via *ip* e *ig* e seus respectivos controles, utilizando-se extrato de corpo frutífero (FPI).

Tabela 7: Ganho da massa corporal (g), volume de líquido ascítico no peritônio (mL) e número de células do S180 no líquido ascítico ($\times 10^6$ cel/mL) após seis dias de tratamento (via intraperitoneal e via intragástrica) dos animais com extrato de corpo frutífero *in natura* (FPI).

GRUPO	Ganho de massa corporal (g)	Volume líquido ascítico (mL)	Nº células tumorais ($\times 10^6$ cel/mL)
Controle negativo <i>ip</i> *	10,6 \pm 0,5	-	-
Controle tumor <i>ip</i> *	15,7 \pm 1,2	4,0 \pm 0,0	618 \pm 95
Experimental <i>ip</i> **	6,7 \pm 0,7	2,3 \pm 0,4	150 \pm 27
Controle substância <i>ip</i> *	7,3 \pm 0,8	-	-
Controle negativo <i>ig</i> *	11,7 \pm 0,6	-	-
Controle tumor <i>ig</i> *	15,2 \pm 0,8	5,5 \pm 0,6	311 \pm 27
Experimental <i>ig</i> **	14,7 \pm 0,8	3,0 \pm 0,4	327 \pm 35
Controle substância <i>ig</i> *	9,1 \pm 0,3	-	-

* Valor médio \pm erro padrão

** Valor médio entre os 3 sub-grupos experimentais \pm erro padrão

As Figuras 12 e 13 mostram a variação da massa corporal dos animais em função do tempo para os tratamentos *ip* e *ig*, respectivamente.

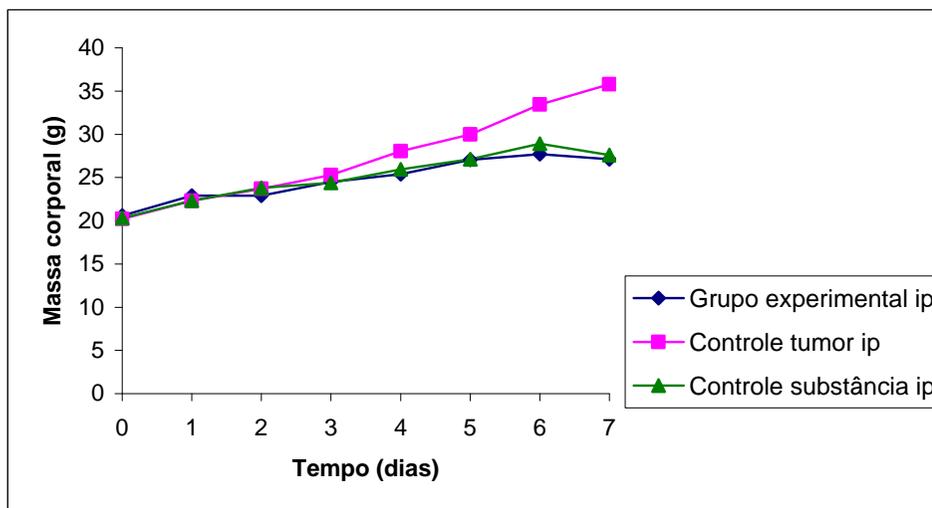


Figura 12 - Variação da massa corporal (g) dos animais (média dos 3 sub-grupos experimentais) em função do tempo para o tratamento do S180 por via *ip*, utilizando extrato de corpo frutífero *in natura* (FPI).

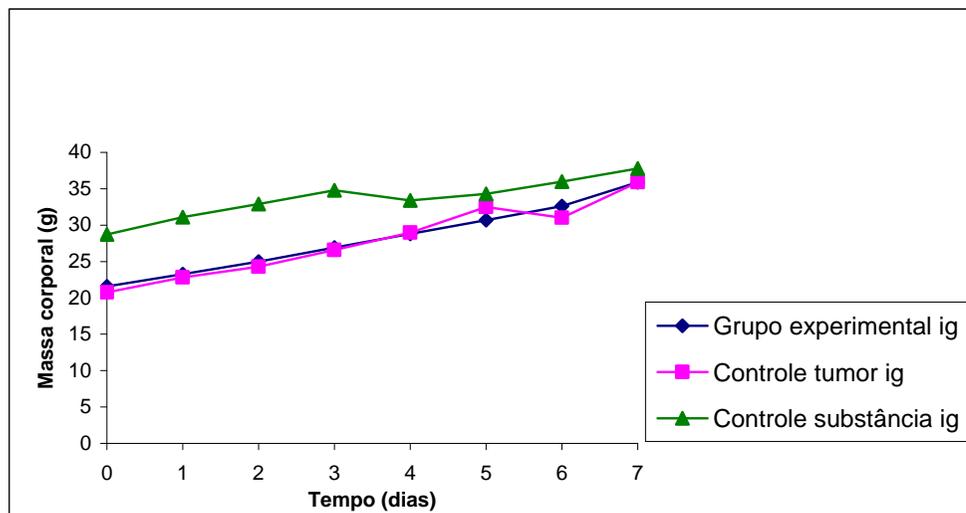


Figura 13 - Variação da massa corporal (g) dos animais (média dos 3 sub-grupos experimentais) em função do tempo para o tratamento do S180 por via *ig*, utilizando extrato de corpo frutífero *in natura* (FPI).

Observa-se, com base nos resultados reportados na Tabela 7, que o grupo experimental *ip* e controle substância *ip* foram os que menores ganhos de massa corporal apresentaram. O volume de líquido ascítico apresentou diferenças significativas entre todos os grupos analisados. O grupo experimental *ip* apresentou um número médio de células tumorais 76% inferior ao número apresentado pelo respectivo grupo controle tumor, enquanto que o tratamento intragástrico não foi eficaz, apresentando o mesmo número de células tumorais do controle tumor. Ao se considerar nos cálculos os valores dos erros padrões, pode-se afirmar que a redução mínima no número de células tumorais que se poderia obter por este tratamento seria de 66%.

A figura 12 mostra que o grupo experimental e controle substância apresentaram perfis idênticos de evolução da massa corporal com o tempo, com valores inferiores aos do grupo controle tumor a partir do 4º dia de tratamento.

Apesar da diferença inicial na massa corporal dos animais dos diferentes grupos (figura 13), observa-se que os grupos atingiram valores muito similares de massa corporal ao final do experimento.

4.2.3 Tratamento com caldo de cultivo *in natura* (CCIN)

A tabela 8 relata os resultados obtidos para o tratamento do Sarcoma 180 em animais (S180) por via intraperitoneal (*ip*) e via intragástrica (*ig*) e seus respectivos controles, utilizando caldo de cultivo *in natura*.

Tabela 8: Ganho da massa corporal (g), volume de líquido ascítico no peritônio (mL) e número de células do S180 no líquido ascítico ($\times 10^6$ cel/mL) após seis dias de tratamento (via intraperitoneal e via intragástrica) dos animais com caldo de cultivo *in natura* (CCIN).

GRUPO	Ganho de massa corporal (g)	Volume líquido ascítico (mL)	Nº células tumorais ($\times 10^6$ cel/mL)
Controle negativo <i>ip</i> *	10,6 \pm 0,5	-	-
Controle tumor <i>ip</i> *	16,5 \pm 0,9	6,2 \pm 0,7	424 \pm 92
Experimental <i>ip</i> **	7,7 \pm 0,7	5,0 \pm 0,2	58 \pm 8,0
Controle substância <i>ip</i> *	7,3 \pm 0,8	-	-
Controle negativo <i>ig</i> *	11,7 \pm 0,6	-	-
Controle tumor <i>ig</i> *	20,6 \pm 1,35	6,5 \pm 0,7	521 \pm 68
Experimental <i>ig</i> **	14,9 \pm 1,4	7,2 \pm 0,5	431 \pm 49
Controle substância <i>ig</i> *	9,1 \pm 0,3	-	-

* Valor médio \pm erro padrão

** Valor médio entre os 3 sub-grupos experimentais \pm erro padrão

A figura 14 e 15 mostram a variação da massa corporal (g) dos animais em função do tempo para os tratamentos do S180 por via *ip* e *ig*. Respectivamente, utilizando caldo de cultivo *in natura* (CCIN).

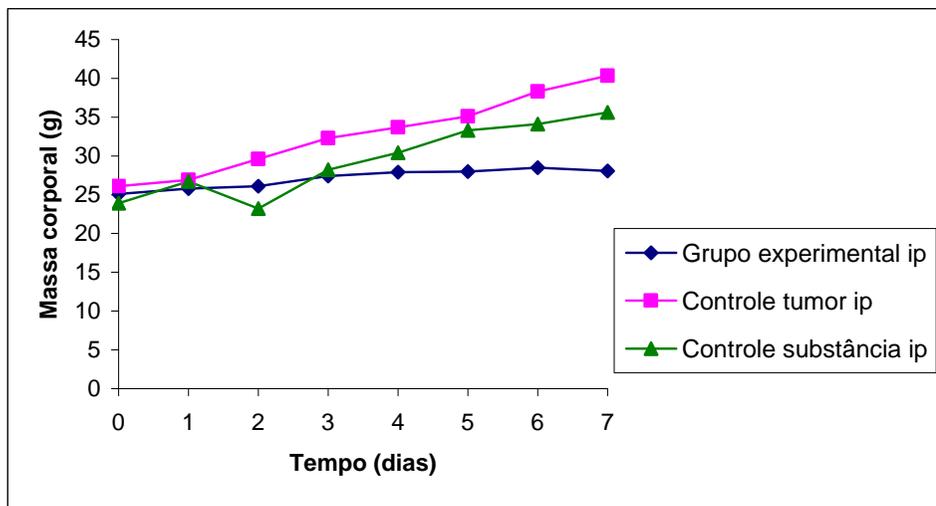


Figura 14 - Variação da massa corporal (g) dos animais (média dos 3 sub-grupos experimentais) em função do tempo para o tratamento do S180 por via *ip*, utilizando caldo de cultivo *in natura* (CCIN).

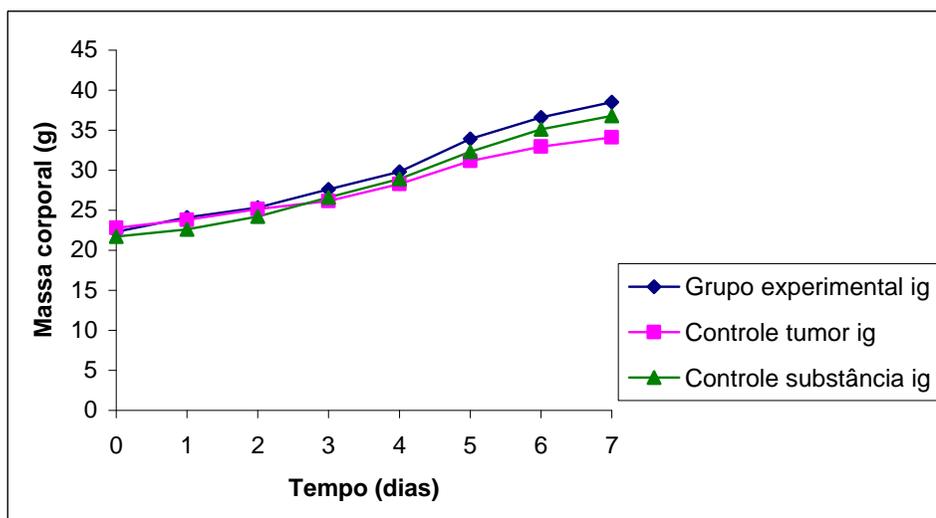


Figura 15 - Variação da massa corporal (g) dos animais (média dos 3 sub-grupos experimentais) em função do tempo para o experimento com S180 por via *ig*, utilizando caldo de cultivo *in natura* (CCIN).

A tabela 8 indica que há diferença no ganho de massa corporal entre os diferentes grupos. Nota-se que o grupo tratamento *ip* apresentou uma redução média de aproximadamente 86% no número de células tumorais em relação ao seu controle (redução mínima de 80%), enquanto que o tratamento *ig* não apresentou redução tumoral.

Analisando-se a figura 14 observa-se que ao longo do tempo de tratamento, o ganho de massa corporal dos animais do grupo tratamento *ip* foi muito pequeno. Porém, o mesmo não foi observado no tratamento *ig* (figura 15), pois todos os grupos ganharam massa corporal ao longo do tempo, atingindo massas corporais finais semelhantes. Observa-se ainda que os perfis de evolução da massa corporal dos diferentes grupos *ig* com o tempo são semelhantes.

4.2.4 Tratamento com extrato de caldo de cultivo (ECC)

Conforme reportado anteriormente para o TAE, em função dos resultados obtidos com administração por via *ig* não serem satisfatórios, esta via não foi avaliada para o extrato de caldo de cultivo sobre o S180.

A tabela 9 mostra o ganho da massa corporal (g), volume de líquido ascítico no peritônio (mL) e número de células tumorais no líquido ascítico ($\times 10^6$ cel/mL) em experimento com S180 e tratamento em animais (via intraperitoneal) com ECC.

Tabela 9: Ganho da massa corporal (g), volume de líquido ascítico no peritônio (mL) e número de células do S180 no líquido ascítico ($\times 10^6$ cel/mL) após seis dias de tratamento (via intraperitoneal) dos animais com extrato de caldo de cultivo (ECC).

GRUPO	Ganho de massa corporal (g)	Volume líquido ascítico (mL)	Nº células tumorais ($\times 10^6$ cel/mL)
Controle negativo <i>ip</i> *	10,6 \pm 0,5	-	-
Controle tumor <i>ip</i> *	11,7 \pm 0,6	10,0 \pm 1,4	408 \pm 38,5
Experimental <i>ip</i> **	9,4 \pm 0,7	7,2 \pm 0,6	116 \pm 15,0
Controle substância <i>ip</i> *	12,9 \pm 0,8	-	-

* Valor médio \pm erro padrão

** Valor médio entre os 3 sub-grupos experimentais \pm erro padrão

A figura 16 apresenta a variação da massa corporal (g) dos animais em função do tempo para o tratamento de S180 por via *ip* utilizando extrato de caldo de cultivo (ECC).

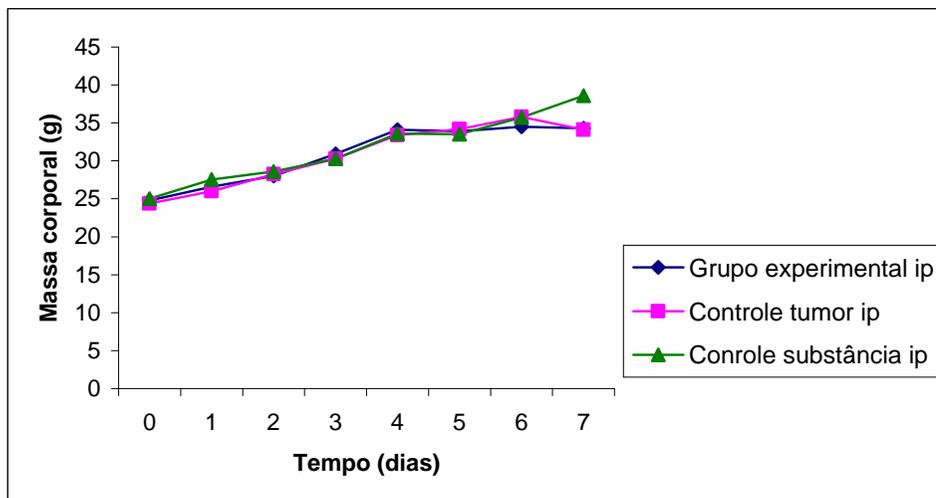


Figura 16 - Variação da massa corporal (g) dos animais (média dos 3 sub-grupos experimentais) em função do tempo para o tratamento de S180 por via *ip* utilizando extrato de caldo de cultivo (ECC).

Nota-se que a diferença entre o grupo experimental e o grupo controle tumor em relação ao número médio de células tumorais foi de 72%, sendo a redução mínima possível igual a 65%.

Conforme a figura 16, o perfil de evolução da massa corporal dos animais em função do tempo é similar para todos os grupos testados.

5 DISCUSSÃO

5.1 Variação de massa corporal

A análise da massa corporal dos animais foi um monitoramento aplicado em todos os experimentos, uma vez que segundo Benjamini *et al.* (2002), o sistema imunológico, quando ativado, gera uma perda de massa corporal decorrente da energia gasta para a produção de células de defesa.

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram evidenciar que os tratamentos que proporcionaram elevados percentuais de redução do número de células tumorais (via oral e, principalmente via *ip*), provavelmente devido a uma melhor ativação do sistema imunológico, foram aqueles que levaram a menores ganhos de massa corporal, validando assim, a afirmação feita por Benjamini *et al.* (2002), uma vez que a massa relativa ao tumor está incluída na massa corporal.

Benkovic *et al.* (2007) estudaram a capacidade antitumoral de Irinotecan, associado ou não ao derivado de própolis solúvel em água (WSDP), ao derivado de própolis etanólico (EEP), e a compostos polifenólicos (Quercetin e Naringin), contra o Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) inoculados intraperitonealmente na concentração de 1×10^6 células/animal. Cada grupo era composto por 9 camundongos (Swiss albino) e, ao longo do experimento, foi avaliado o nível de sobrevivência. Dos animais tratados com Irinotecan/WSDP e Irinotecan/EEP, quatro sobreviveram por mais de 50 dias, sendo que no grupo dos animais controle, inoculados com o tumor e sem tratamento, não houve sobrevivência, bem como nos grupos tratados apenas com compostos polifenólicos.

Neste trabalho, os autores usaram a massa corporal como medida da proliferação das células tumorais na cavidade peritoneal.

5.2 Variação do volume de líquido ascítico

Em observações experimentais realizadas por Saad-Hossne e colaboradores (2003), uma solução composta por fenol, ácido acético e glicerina, testada sobre o tumor ascítico de Ehrlich (TAE), em um modelo experimental com camundongos, reduziu o número de células tumorais, elevou o número de células inflamatórias em suspensão no líquido ascítico e, para os animais sem tumor, determinou o influxo de células em suspensão na cavidade peritoneal. O crescimento tumoral foi avaliado pela determinação do volume de líquido ascítico. Esta produção pode ser ocasionada pelo estímulo da defesa imune, o que não necessariamente indica regressão das células cancerígenas.

Efetivamente, com base nos resultados obtidos neste trabalho, não foi evidenciada uma relação precisa entre o volume de líquido ascítico e a diminuição do número de células tumorais. No entanto, pôde-se constatar que os grupos tratados por via oral e *ip* independentemente da substância testada, que apresentaram resultados promissores quanto a inibição tumoral, foram os que apresentaram também menores volume de líquido ascítico, comparativamente ao respectivo grupo controle tumor e aos grupos controle tumor e experimental *ig*.

5.3 Variação do número de células tumorais

O número de células tumorais neste trabalho foi determinado pela contagem em Câmara de Neubauer, conforme descrito no item 3.8.1. A figura 18 mostra as fotografias ao microscópio óptico com dispositivo com amostras do líquido ascítico de animais dos grupos controle substância (A), controle tumor (B) e experimental (C) para um mesmo experimento, deixando clara diferença entre os grupos.

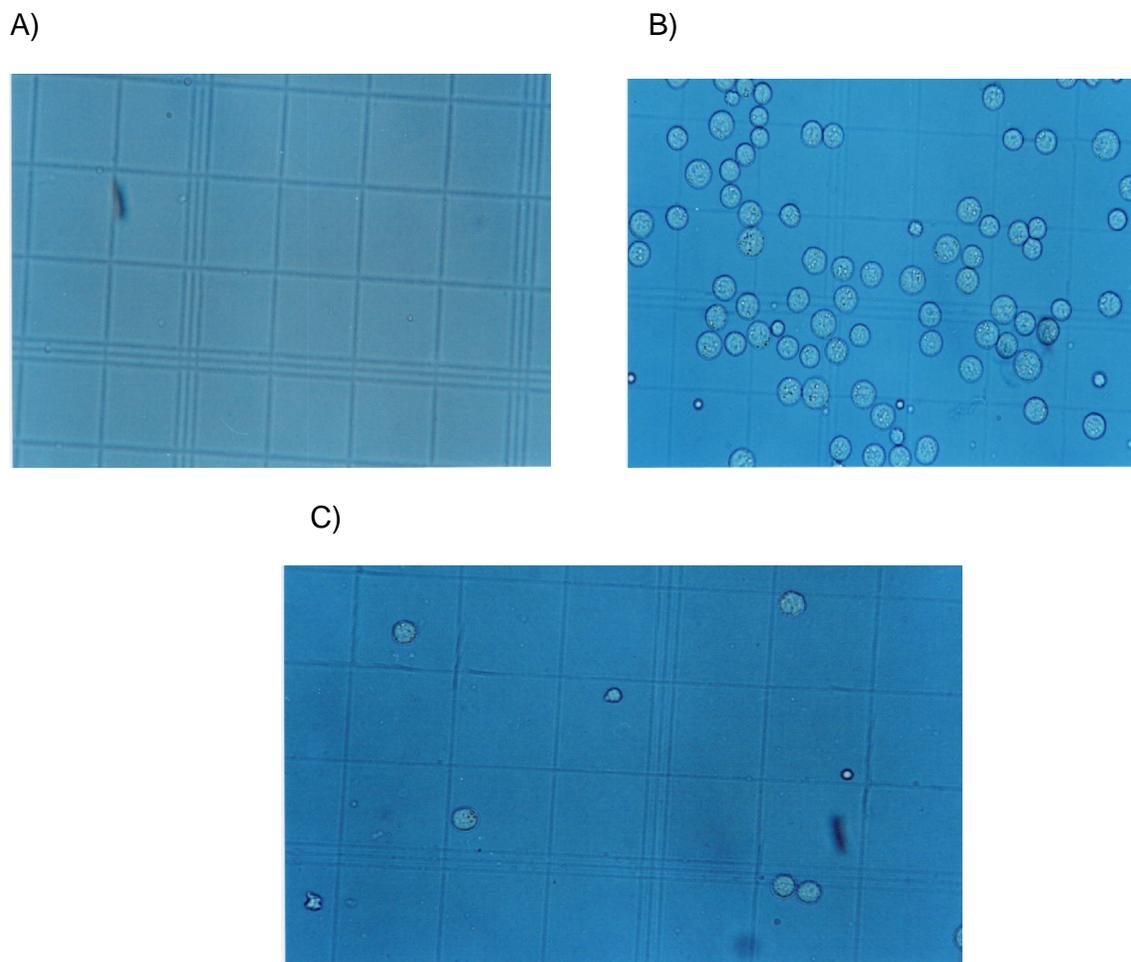


Figura 17 – Células tumorais na câmara de Neubauer dos grupos controle substância (A), controle tumor (B) e grupo experimental (C). Aumento de 100x ao microscópio.

A tabela 10 apresenta um resumo dos principais resultados obtidos neste trabalho para o TAE e o S180. Os percentuais de redução tumoral são apresentados em termos médios e mínimos. O primeiro a fim de facilitar a comparação destes resultados com os descritos na literatura e o segundo a fim de se ter a máxima confiabilidade nos resultados aqui publicados.

Tabela 10 – Percentual médio e mínimo de inibição dos tumores (TAE e S180) pelas substâncias corpo frutífero (CF) administrada por via oral e extrato do corpo frutífero *in natura* (FPI), caldo de cultivo *in natura* (CCIN) e extrato de caldo de cultivo (ECC), administradas por via *ip*.

TRATAMENTO	TAE	S180		
	Redução tumoral média (%)	Redução tumoral mínima (%)	Redução tumoral média (%)	Redução tumoral mínima (%)
CF oral	51	38	63	58
FPI <i>ip</i>	71	60	76	66
CCIN <i>ip</i>	70	59	86	80
ECC <i>ip</i>	76	69	72	65

Analisando os resultados obtidos neste trabalho para a atividade antitumoral de *Pleurotus ostreatus* testada em camundongos Swiss albinos de aproximadamente 25 g, com indução intraperitoneal de Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE), conclui-se que tanto o tratamento via oral com ração/CF, como os tratamentos via intraperitoneal com FPI, CCIN e ECC de *Pleurotus ostreatus* levaram a resultados promissores, sendo que o maior percentual de redução tumoral (76%) foi obtido com o extrato de caldo de cultivo (ECC). Os tratamentos realizados por via intragástrica não demonstraram eficácia na redução tumoral.

Segundo Almeida (2000), o tratamento via oral utilizando extrato de *Casearia sylvestris* apresentou dificuldade no controle de TAE. Apesar disso, alguns tratamentos foram capazes de reduzir o acúmulo de fluido ascítico e o número de células tumorais até o 11^o dia. A partir deste dia, o tratamento não foi capaz de conter o desenvolvimento do tumor ascítico, promovendo o crescimento tumoral.

Ajith e Janardhanan (2003) testaram a atividade antitumoral de extratos de *Phellinus rimosus* obtidos a partir de três métodos de extração, sendo que o melhor resultado foi obtido da fração extraída com acetato de etila. A administração diária de 50mg/kg em camundongos albinos Swiss machos contra uma concentração de células de Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) de 1×10^6 cel/mL, proporcionou redução de 96% das células tumorais, resultado maior ao obtido neste trabalho com os tratamentos *ip*, independentemente da substância teste.

Pagno *et al.* (2006), em estudos com TAE, verificaram o potencial antitumoral de *Vernonia scorpioides* em ratos machos Swiss de oito semanas, por um período de 7 dias. Os animais foram inoculados intraperitonealmente com células de TAE na concentração 5×10^6 células/animal. Foram avaliados tanto tratamento *ig* quanto *ip*, e, conforme observado também neste trabalho, os resultados obtidos não foram satisfatórios para o tratamento *ig*. No entanto houve redução de 100% do número de células e do volume ascítico dos animais tratados por via *ip*.

As análises dos resultados obtidos neste trabalho para o S180 revelam que, conforme observado para o TAE, o tratamento intraperitoneal também mostrou-se mais eficaz. Ikekawa *et al.* (1969) testaram intraperitonealmente extratos aquosos de sete linhagens de fungos contra Sarcoma 180 implantado em camundongos. *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus spodoleucus* apresentaram taxas de regressão do tumor de 75,3 e 72,3% respectivamente. Estes valores são similares aos obtidos neste trabalho para tratamento com FPI e ECC por via *ip* e inferiores aos observados com CCIN (86%).

Zhang e colaboradores (2004a) isolaram frações, a quente (Mh e Sh) e por sonicação (Ms, Ss), do micélio e do corpo frutífero de *Pleurotus tuber regium*. Para o teste *in vivo* foram utilizados ratos fêmeas (BALB), de oito semanas, inoculados 24 horas antes do tratamento com células tumorais de Sarcoma 180 na concentração 1×10^5 células/rato e para o teste *in vitro* foi utilizado uma cultura de células de HL-60 (leucemia) na concentração 1×10^6 células/mL. O tratamento intraperitoneal *in vivo* foi administrado por 10 dias (20mg/kg), já o tratamento *in vitro* foi mantido a 37°C por 72 horas com frações em diferentes concentrações (50, 100 e 200 µg/mL) em PBS. Os melhores resultados foram obtidos com as frações extraídas a quente (Mh e Sh), sendo que o tratamento *in vivo* proporcionou 65,4% de redução tumoral pela fração Mh e 55,3% pela fração Sh. O melhor resultado *in vitro* demonstrou 83% de redução tumoral com Mh na concentração de 200 µg/mL, valor obtido neste trabalho em testes *in vivo* com CCIN.

Leifa *et al.* (2003) isolaram uma fração (EPS) solúvel em água, extraída do caldo de cultivo de *Agaricus blazei* e conduziram, durante 10 dias, tratamento por via intraperitoneal, em camundongos inoculados com Sarcoma 180. A substância foi administrada aos animais na concentração de 10 mg/Kg/dia, havendo redução de 72,19% da massa tumoral, em relação ao grupo controle.

Zhuang *et al.* (1993) realizaram, durante 7 dias consecutivos, tratamento com uma fração extraída de *Pleurotus sajor-caju*, sobre S180 e registraram 100% de inibição tumoral, evidenciando a necessidade de se identificar e purificar o(s) β -glucano(s) de efetiva ação antitumoral.

Várias frações polissacarídicas (solúveis e insolúveis em água) foram extraídas de basidiomas de *Pleurotus citrinopileatus* por Zhang e colaboradores (1994). Após o fracionamento, a atividade antitumoral das frações contra Sarcoma 180 implantado em camundongos foi avaliada. Foram obtidos onze polissacarídeos solúveis em água, sendo que apenas três (FI₀, FA-2-b- β , FA-3) mostraram altas taxas de inibição do tumor (59,5; 59,4; 61,7%). Dentre os polissacarídeos insolúveis em água obtidos, três frações (FIII-2, FIII 2-a, FIII 2-b) apresentaram elevados percentuais (93,5; 87,3; 90,1%) de inibição do tumor quando comparados com o controle positivo.

Mizuno (1999) também avaliou o efeito antitumoral de frações polissacarídicas obtidas do basidioma de treze linhagens de basidiomicetos, dentre os quais *Pleurotus sajor-caju* e *Pleurotus citrinopileatus*, cujas frações mais ativas proporcionaram 100% e 90,1% de inibição do Sarcoma 180.

Comparando estes resultados com os obtidos neste trabalho com caldo de cultivo *in natura*, pode-se concluir que o cultivo submerso de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 é bastante promissor para a síntese de polissacarídeos extracelulares de atividade antitumoral, sendo necessário, no entanto, aprofundar estudos sobre a separação, purificação e caracterização destes compostos.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que:

- ✓ a substância ração/CF (Ração/Corpo frutífero de *Pleurotus ostreatus*) quando administrada por via oral (alimentação), apresentou, na média, 51% de inibição do TAE e 63% do S180.
- ✓ a substância FPI (Extrato de corpos frutíferos *in natura* de *Pleurotus ostreatus*) quando administrada por via intraperitoneal, reduziu o número de células tumorais de TAE em 71% e de S180 em 76%;
- ✓ a substância CCIN (Caldo de cultivo *in natura* de *Pleurotus ostreatus*) quando administrada por via intraperitoneal, apresentou redução de 70% no crescimento do TAE e de 86% no crescimento de S180, representando o melhor resultado obtido sobre este tumor;
- ✓ a substância ECC (Extrato de caldo de cultivo de *Pleurotus ostreatus*), quando administrada por via intraperitoneal, provocou maior inibição do crescimento do Tumor Ascítico de Ehrlich – TAE (76%), com 72% de redução do crescimento de S180;
- ✓ em todos os testes realizados com FPI, ECC e CCIN, o tratamento por via intragástrica não apresentou redução tumoral.

7. PERSPECTIVAS

Como sugestão para trabalhos futuros, cita-se:

- ✓ Isolar e caracterizar o polissacarídeo de atividade antitumoral
- ✓ Avaliar a atividade antitumoral utilizando tumores sólidos
- ✓ Avaliar a atividade antitumoral de outras espécies de fungos do gênero *Pleurotus*
- ✓ Avaliar a eficácia do tratamento com extratos encapsulados
- ✓ Fazer teste de sobre vida dos animais
- ✓ Avaliar a citotoxicidade das substâncias *in vitro*
- ✓ Estudar o tratamento preventivo
- ✓ Estudar as substância testes na biologia molecular do tumor

REFERÊNCIAS

AJITH, T. A.; JANARDHANAN, K. K. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *Phellinus rimosus* (Berck) Pilat. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.l.], v. 84, n.2-3, p. 157-162, set. 2003.

ALMEIDA, A. **Atividade antiinflamatória e antitumoral do extrato hidroalcoólico de *Casearia sylvestris***: estudo comparativo com os antiinflamatórios piroxicam e Meloxicam. 1999. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

ALMEIDA, J. R. C. **Farmacêuticos em oncologia**: uma nova realidade. São Paulo: Atheneu, 2004.

ANDRADE, C. A. S. et al. Antitumor activity of Cratylia mollis lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 278, n. 2, p. 435-445, jun. 2004.

ARAÚJO, E. S. ; BRANDEBURGO, M. A. M. Efeito biológico do veneno de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) sobre o Sarcoma TG-180. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 2., 1995, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: [s.n.], 1995. p.331.

ASSEF, M. L. M. et al. Histological and immunohistochemical evaluation of Sarcoma 180 in mice after treatment with an a-d-glucan from the lichen Ramalina celastri. **Brazilian Journal of Morphological Science**, [S.l.]. v.19. n. 2, p. 49-54, 2002.

BENJAMINI, E.; COICO R.; SUNSHINE, G. **Imunologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

BENKOVIC, V. et al. Enhanced Antitumor Activity of Irinotecan Combined with própolis and its Polyphenolic Compounds on Ehrlich Ascites Tumor in Mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.l.], v. 20, p. 1-6, fev. 2007.

BERTINO, J.R.; SALMON S.E. In: BENNETT, J. C.; PLUM, F. **Cecil tratado de medicina interna**. 21. ed. , Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p. 1178 - 1194. v.1

BERGERS, G. et al. Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. **Science**, [S.l.], v. 284, n. 5415, p. 808-812, april, 1999.

BONASSA, E. M. A.; **Enfermagem em Terapêutica Oncológica**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

BONATTI, M. **Estudos do potencial nutricional de cogumelos do gênero Pleurotus cultivados em resíduos agro-industriais**. 2001. 140f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

BONATTI, M.; KARNOPP, P.; SOARES, H. M.; FURLAN. S. A. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 88, n. 3, p. 425-428, dec., 2004.

BRAGA, G. C. Cogumelos comestíveis e Medicinais. **Revista Tecnologia e Treinamento**, v. 1, n.33, p. 07, 2005.

BRASILEIRO FILHO, G. **Patologia geral**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993.

BRASILEIRO FILHO, G. et al. **Bogliolo Patologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo**: patologia geral. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

BRASILEIRO FILHO, G.; GUIMARÃES, R. C.; BOGLIOLO, L. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: BRASILEIRO FILHO, G. (Ed.) **Bogliolo Patologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 149-193.

BRAUNWALD, E et al. **Harrison Medicina Interna**. 15 ed., Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2001, v.1.

BURNS, P.J. et al. Physiological studies of exopolysaccharide production from the Basidiomycete *Pleurotus SP*. Florida. **Enzyme and Microbial Technology**, [S.I.], v. 16, n. 7, p. 566-572, 1994.

CARR, J. M. et al. Enzymatic determination of b-glucan in cereal-based food-products. **Cereal Chemistry**, [S.I.], v. 67, n. 3, p. 226-229, 1990.

CAVAZZONI, V. ; ADAMI, A. Exopolysaccharides produced by mucelial edible mushrooms. **Italian Journal of Food Science**, Chiriotti, v.4, n. 11, p. 9-15, 1992.

CHANDRASOMA, P. ; TAYLOR, C.R. **Patologia básica**. Rio de janeiro: Pretince Hall do Brasil Ltda, 1993.

CHANG, R. Functional properties of edible mushrooms. **Nutricional Review**, [S.I.], v.54, n.11, p. 91-93, 1996.

CHEUNG, P.C.K. Plasma and hepatic cholesterol levels and fecal neutral sterol excretion are altered in hamsters fed straw mushroom diets. **Journal of Nutrition**, [S.I.], v. 128, n. 9, p. 1512-1516, may, 1998.

CHIAHARA, G. et al. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity especially lentinan, from *Lentinus edodes*. **Cancer Research**, [S.l.], v. 30, p. 2776-2781, 1970.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

DALLIES, N.; FRANCOIS, J.; PAQUET, V. A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall: application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, [S.l.], v. 14, n. 14, p. 1297-1306, dec., 1998.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, [S.l.], v 28, p. 350, 1956.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Biodegradação de Lignina e tratamento de efluentes por fungos ligninolíticos. In: MELO, I. S., AZEVEDO, J. L. **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna, SP: Embrapa, 1998. p. 269-292.

FAUCI, A.S. et al. **Harison Medicina Interna**. 14. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 1998.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

FUJIMIYA, Y. et al. Tumoricidal activity of high molecular weight polysaccharides derived from *Agaricus blazei* via oral administration in the mouse tumor model. **Journal of Japan Society of Food Science**, [S.l.], v. 45, n. 4, p. 246-252, 1998.

FURLAN, S.A. et al. Mushroom strains able to grow at high temperatures and low pH values. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, [S.l.], v. 13, n. 6, p. 689-692, nov., 1997.

GIACONI J.A.; KARP C.L. Current treatment options for conjunctival and corneal intraepithelial neoplasia. **Ocul Surface**, [S.l.], v.2,n. 1, p.66-73, apr., 2003.

GLAZER, A.; NIKAIDO, H. **Microbial Biotechnology**: fundamentals of applied microbiology. New York : W.H. Freeman, 1995, 50p.

GUNDE-CINERMAN, N. Medicinal value of the genus *Pleurotus* (Fr) P. Karst. (Agaricales s.l. Basidiomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, [S.l.], v. 1, p. 69-80, 1999.

GUNDE-CINERMAN, N., CINERMAN, A. *Pleurotus* fruiting bodies contain the inhibitor of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme a Reductase-Lovastatin. **Experimental Mycology**, [S.l.], n. 19, p.1-6, 1995.

HENRY, R. J. Pentosan and (1-3),(1-4)-beta-glucan concentrations in endosperm and whole grain of wheat, barley, oats and rye. **Journal of Cereal Science**, [S.l.], v. 6, n. 3, p. 253-258, 1987.

IKEKAWA, T. et al. Antitumor Activity of Aqueous Extracts of Edible Mushrooms. **Cancer Research**, [S.l.], n. 29, p. 734-735, 1969.

MORAES, Marcos F. Incidência e mortalidade por câncer no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [Brasília], v. 43, n. 3, jul./set. 1997. Disponível em: http://www.inca.gov.br/rbc/n_43/v03/editorial.html. Acesso em: 02 julho 2007.

JUNQUEIRA, L. C. U. . In: CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 8.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 288-297.

JWANNY, E. W.; RASHAD, M. M.; ABDU, H. M. Solid-state fermentation of agricultural wastes into food through *Pleurotus* cultivation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S.l.], v. 50, n. 1 p. 71-78, 1995.

KARÁCSOYI, S.; KUNIAK, L. Polysaccharides of *Pleurotus ostreatus*: isolation and structure of pleuran, an alkali-insoluble β -D-glucan. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v.24, n. 2, p. 107-111, 1994.

KARAM, J.; NICELE, J. A. Potential Applications of Enzymes em waste Treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, [S.l.], v. 69, n. 2, p. 141-153, 1997.

KARNEZIS, T. et al. The biosynthesis of Beta-glycans. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, [S.l.], v. 12, n. 66, p. 211-227, 2000.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

KUBATOVA, A. et al. PCB congener selective biodegradation by the white rot fungus *P. ostreatus* in contaminated soid. **Chemosphere**, [S.l.], v. 43, n. 2, p. 207-215, apr., 2001.

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de Micologia Médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LAVI, I. et al. An aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HT-29 colon cancer cells. **Cancer Letters**, [S.l.], v. 244, n.1, p. 61-70, nov., 2006.

LEE, Y.L. et al. Oral administration of *Agaricus blazei* (H1 Strain) inhibited tumor growth in a sarcoma 180 inoculation model. **Exp. Amin.**, [S.l.], v. 52, p. 371-375, 2003.

LEIFA, F. et al. Production of polysaccharide by culinary-medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. LPB 03 (*Agaricomycetidae*) in submerged fermentation and its antitumor effect. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, [S.l.], v. 5, n. 1, p. 17-23, trim., 2003.

LEUNG, M. Y. K.; FUNG, K. P.; CHOY, Y. M. The isolation and characterization of an immunomodulatory and anti-tumor polysaccharide preparation from *Flammulina velutipes*. **Immunopharmacology**, [S.l.], v. 35, n.3, p. 255-263, jan., 1997.

LORENZEN, K.; ANKE, T. Basidiomycetes as a source for new bioactive natural products. **Current Organic Chemistry**, [S.l.], v.2, p. 329-364, 1998.

LOURO, I.D. Oncogenética. **Revista Sociedade Brasileira de Cancerologia**, [S.l.], v.12, n.11, p. 36-45, 2000.

LOWE, J.; STEVENS, A. **Patologia**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1998.

LULL, C.; WICHERS, H. J.; SAVELKOUL, H. F. J. Antiinflammatory and Immunomodulating Properties of Fungal Metabolites. **Mediators of Inflammation**. [S.l.], v. 9, n. 2, p. 63-80, 2005.

MADAN, M.; VASUDEVAN, P.; SHARMA, S. Cultivation of *Pleurotus sajor caju* on Different Agro-wastes. **Biological Waster**, [S.l.], v.22,, p. 241-250, 1987.

MANZI, P., PIZZOFRATO, L. Beta-glucans in edible mushrooms. **Food Chemistriy**, [S.l.], v.68,n.3, p. 315-318, feb., 2000.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO J. M.; PARKER J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Prentice hall, 2004.

MARTIN, A. M. Study of the growth and biomass composition of the edible mushroom *Pleurotus Ostreatus*. **Food Science and Human Nutrition**, [S.l.], v.29, p. 239-248, 1992.

MATHEUS, D. R.; OKINO, L. K. Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos. In: BONONI, V. L. R. (org.). **Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos**: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado e Meio Ambiente, 1998. p. 107-139.

MATSUZAKI, P. et al. Antineoplastic effects of butanolic residue of *Pfaffia paniculata*. **Cancer Letters**, [S.l.], v. 238, n.1, p. 85–89, July., 2006.

MAZIERO, R., CAVAZZONI, V., BONONI, V.L.R. Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. **Revista de Microbiologia**, São Paulo: v. 30, n. 1, p. 77-84, Jan./Mar., 1999.

MAZIERO, R. **Produção de exopolissacarídeos por basidomicetos em cultura submersa**: screening, caracterização química preliminar e estudo da produção utilizando *Irpex lacteus* (Fr:Fr)Fr. 1996. 181f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

MICHEREFF, S.J. **Fungos Como Agentes de Doenças de Plantas**. 2003. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 2003.

MIZUNO, T. Antitumor activity and some properties of water soluble polysaccharides from Himematsutake the fruiting body of *Agaricus blazei*. **Biochemistry**, Washington, v. 54, n. 11, p. 2889-2896, May., 1990.

MIZUNO, T. et al. Reishi, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*: Bioactive substances and medicinal effects. **Food Reviews International**, [S.l.], v. 11, n. 1, p. 151-166, 1995.

MIZUNO, T. The Extraction and Development of Antitumor-active Polysaccharides from medicinal Mushrooms in Japan (Review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, [S.l.], v.1, p. 9-30, 1999.

MIZUNO, M. et al. Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* Mill. **Biochemistry and molecular**, Japão, v. 47, n.4, p. 707-714, april, 1999.

MIZUNO, M. Anti-tumor polisaccharides from mushrooms during storage. **BioFactors**, Japão, v. 12, n.1-4, p. 275-281, 2000.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia**: processos gerais. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

MORI, K. et al. Antitumor activities of edible mushrooms by oral administration. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SCIENTIFIC TECHNICAL ASPECTS OF CULTIVATING EDIBLE FUNGI, 1987, Pennsylvania. **Proceedings...**Amsterdan: Elsevier, 1987, p.1-6.

MUNARI, F., GAIO, T. A., DILLON, A.J.P., Cinética da secreção de lacases e peroxidases e degradação de fenóis totais em cultivo submerso de *Pleurotus sajor-caju* com efluentes da indústria papeleira. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 2003, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: [s.n.], 2003.

NOSÁLOVÁ, V. et al. Effects of pleuran (beta-glucan isolated from *Pleurotus ostreatus*) on experimental colitis in rats. **Physiology research**, [S.l.], v. 50, n.6, p. 575-581, oct., 2001.

NOVOTNÝ, C. et al. Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white-rot fungi. **Biodegradation**, [S.l.], v.10, n. 3, p. 159-168, aug.,1990.

NOVOTNÝ, C. et al. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. **Soil Biology & Biochemistry**, [S.l.] v.36,n. 10, p. 1545-1551, 2004.

OBODAI, M.; CLELAND-OKINE, J.; VOWOTOR, K. A. Comparative study on the growth and yield of *Pleurotus ostreatus* mushroom on different lignocellulosic by-products. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [S.l.], v. 30,n. 3,p. 146-149, march, 2003.

OKUDA, T. et al. Anticomplementary Activity of Antitumour Polysaccharides. **Nature New Biology**, [S.l.], v. 238, n.80, p. 59-60, 1972.

OOI, V. E. C.; LIU, F. A. Review of Pharmacological Activities of Mushroom Polysaccharides. **International Journal of Medicinal Mushroom**, [S.l.], v. 1,,p. 195-206, 1999.

OOI, V. E. C.; LIU, F. Immunomodulation and Anti-Cancer Activity of Polysaccharide-Protein Complexes. **Current Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 7, n. 7, p. 715-729, jul., 2000.

PAGNO, T. et al. Citotoxic activity of the dichloromethane fraction from *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. (Asteraceae) against Ehrlich´s tumor cells in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [S.l.], v.39, n.11, p.1483-1491, nov., 2006.

PATRABANSH, S.; MADAN, M. Studies on cultivation, biological efficiency and chemical analysis of *Pleurotus sajor caju* (FR.) Singer on different bio-wastes. **Acta Biotechnology**, [S.l.], v. 17,n. 2, p. 107-122, 1997.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. In: PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos**. 2. ed., Santa Cruz do Sul, RS: EDUNISC, 2003. p. 13-23.

RAJARATHNAM, S.; SHASHIRECA, M. N.; BANO, Z. Biopotentialities of the Basidiomycetes. **Advances in Applied Microbiology**, [S.l.], v. 37, p. 233-361, 1992.

RAJARATHNAM, S.; SHASHIREKHA, M.N.; BANO, Z. Biodegradative and biosynthetic capacities of mushrooms: present and future strategies. **Critical Reviews in Biotechnology**, [S.l.], v. 18, n. 2/3, p. 91-236, 1998.

RIEGER, P. T. Bioterapia. In: OTTO, Shirley E. **Enfermagem em Quimioterapia**. 3.ed., Loures: Lusociência, 2000.p. 631-676.

ROBBINS, S.L. CONTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Patologia estrutural e funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

RODRIGUES, S. B. et al. Avaliação do potencial antimutagênico do Cogumelo do Sol (*Agaricus blazei*) no sistema methG1 em *Aspergillus (Emericella) nidulans*. **Acta Scientiarum**, [S.l.], v. 25, n.2, p. 513-517, 2003.

RODRIGUEZ, E. et al. Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. **Soil Biology & Biochemistry**, Elsevier, [S.l.], v.36, p. 909-916, 2004.

RORABACHER, D. B. Statistical treatment for rejection of deviant values: critical values of Dixon's "Q" parameter and related subrange ratios at the 95% confidence level. **Analytical Chemistry**, [S.l.], v. 63, n. 2, p. 139-146, 1991.

ROSADO, F.R. et al. Biomass and exopolysaccharide production in submerged cultures of *Pleurotus ostreatus* Sing. and *Pleurotus ostreatus* florida (Jack.:Fr.) Kummer. **Journal of Basic Microbiology**, [S.l.], v. 43, n.3, p. 230-237, 2003.

ROUT, D. et al. Chemical analysis of a new (1-3), (1-6) branched glucano from an edible mushroom, *Pleurotus florida*. **Carbohydrate Research**, [S.l.], v. 340, p. 2533-2539, 2006.

RUBIN, E.; FARBER, J. L. **Patologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SAAD-HOSSNE, R.; SAAD-HOSSNE, W.; PRADO, R. G. **Ascite neoplásica**: efeito da solução aquosa de fenol, ácido acético e glicerina sobre o tumor ascítico de Ehrlich. **Acta Cirúrgica Brasileira**, [S.l.], v. 18, n.6, São Paulo, 2003.

SAAD-HOSSNE. R.; SAAD-HOSSNE W.; PRADO. R. G. Efeito da solução aquosa de fenol, ácido acético e glicerina sobre o tumor ascítico de Ehrlich: estudo experimental *in vitro*. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 19 n.1, 2004.

SALMONES, D.; MATA, G.; WALISZEWSKI, K.N. Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. **Bioresource Technology**, [S.l.], v. 96, n. 5, p. 537-544, mar., 2005.

SALMON, S. E.; SARTORELLI, A. C. Quimioterapia do câncer. In: KATZUNG, B. G. (Ed.) **Farmacologia básica e clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2003, p. 803-832.

SANTOS, V.M.C.S. **Contribuição ao Estudo da Produção de *Pleurotus spp* em Resíduos Lignocelulósico**. 1999. [150]f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

SATO, D. Y. O. et al. Histopathological and immunophenotyping studies on normal and sarcoma 180-bearing mice treated with a complex homeopathic medication. Homeopathy. **Science Direct Online**, [S.l.], v. 94, n. 1, p. 26-32, 2005.

SEPCIC, K. et al. Interaction of ostreolysin, a cytolytic protein from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*, with lipid membranes and modulation by lysophospholipids. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 270, n. 6, p. 1199-1210, 2003.

SILVA, H. H. B. **Biodegradação de 2,4-diclorofenol por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833**. 2005. 79f. Dissertação (Mestrado) - Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2005.

SILVEIRA, M. L. L. et al. Evaluation of inoculum influence on *Pleurotus* nutritional characteristics. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, p. 85-90, 2006.

STURION, G.L. **Utilização de folha de bananeira como substrato para o cultivo de cogumelos comestíveis (*Pleurotus spp*)**. 1994. 147 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

TAKAKU, T; KIMURA, Y; OKUDA, H. Isolation of an Antitumor Compound from *Agaricus blazei* Murill and Its Mechanism of Action. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 131, n.5, p. 1409-1413, feb., 2001.

TANNOCK, I. F.; HILL, R. P. **The basic science of Oncology**. 3. ed. [S.l.]: McGraw Hill, 1998.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2003.

VERÇOSA JUNIOR, D. et al Influência de *Agaricus blazei* Murrill sobre o tumor sólido de Ehrlich e linfonodos poplíteos de camundongos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n.1, p. 150-154, feb., 2006.

WANG, H.; GAO, J. A new lectin with highly Potent Antihepatoma and Antisarcoma Activities from the Oyster Mushroom *Pleurotus Ostreatus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v.275, n.3, p. 810-816, sept., 2000.

WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. **Critical Reviews in Immunology**, Boca Raton, v.19, n.1, p. 65-96, 1999.

WISBECK, E.; ROBERT, A. P.; FURLAN, S.A. Avaliação da produção de agentes antimicrobianos por fungos do gênero *Pleurotus*. **Revista Saúde e Ambiente**, Joinville, v.3, n.2, p. 7-10, dez. 2002.

WISBECK, E. **Estudo do cultivo submerso de pleurotus ostreatus DSM 1833 para a produção de biomassa e de exopolissacarídeos**. 2003. 175f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

WISBECK, E.; FURLAN, S. A.; NINOW, J. L. Efeito da concentração inicial de glicose e do pH na produção de exopolissacarídeos de potencial antitumoral por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833. **Revista Saúde e Ambiente**, Joinville, v. 6, n. 2, p. 19-22, dez., 2005.

YOSHIOKA, Y. et al. Studies on Antitumor Activity of Some Fractions from Basidiomycetes. I. An Antitumor Acidic Polysaccharide Fraction of *P. ostreatus* (Fr.) QuéL. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 20, n. 6, p. 1175-1180, 1972.

YOSHIOKA, Y. et al. Antitumor polysaccharides from *P. Ostreatus* (FR.) QUÉL.: isolation and structure of a β -glucan. **Carbohydrate Research**, [S.l.], v. 140, n. 1, p. 93-100, jul., 1985.

ZELMANOWICZ, A. M. Detecção precoce para o câncer de pele. Disponível em: <<http://www.abcdasaude.com.br/artigo.php?122>>. Acesso em: 02 jul. de 2007.

ZHANG, J. et al. Antitumor Polysaccharides from a Chinese Mushroom, *Yuhuangmo*, the Fruiting Body of *Pleurotus citrinopileatus*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, [S.l.], n.58, v.7, p. 1195-1201, jul., 1994.

ZHANG, M. et al. Molecular weight and antitumor activity of the water soluble polysaccharides isolated by hot water and ultrasonic treatment from the sclerotia and mycelia of *Pleurotus tuber-regium*. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 56, n. 2, p.123-128, jun., 2004.

ZHANG, M. et al. Evolution of sulfated fungal β -glucans from the sclerotium of *Pleurotus tuber-regium* as a potential water-soluble anti-viral agent. **Carbohydrate Research**, [S.l.], v. 339, n. 13, p. 2297-2301, sept., 2004.

ZHUANG, C. et al. Antitumor protein-containing polysaccharides from a chinese mushroom Fengweigu or Houbitake, *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) sings. **Bioscience, Biotchnology and Brochemistry**, [S.l.], v. 57, n.6, p. 901-906, jun., 1993.

ANEXO

Anexo A – Curva de calibração

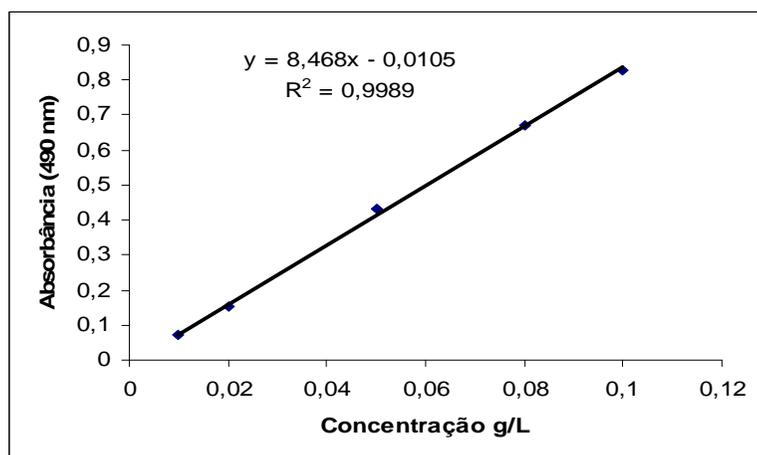


Figura A.1 - Análise da concentração de polissacarídeos das substâncias FPI, CCIN e ECC.

Anexo B - Certificado da Comissão Ética de pesquisa da UNIVALI


UNIVALI
UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO,
EXTENSÃO E CULTURA

Certificado

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "Estudo *in vivo* da atividade antitumoral de polissacarídeos sintetizados por *Pleurotus ostreatus* DSM 1833", da pesquisadora **Elisa Regina de Souza Wolff**, com a orientação da Professora Sandra Aparecida Furlan, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, tendo sido aprovado através do parecer nº 36/2007 pela Comissão de Ética em Pesquisa da UNIVALI.

Itajaí (SC), 27 de abril de 2007.


Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho
Pró-Reitor de Pesquisa, Pós-Graduação, Extensão e Cultura


Prof. Dr. Márcia Maria de Souza
Coordenadora da CEP/UNIVALI

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.