HEIDI PFUTZENREUTER CARSTENS

AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE MANOGALACTANA OBTIDA DE *PLEUROTUS SAJOR-CAJU*

JOINVILLE/SC

2015

HEIDI PFUTZENREUTER CARSTENS

AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE MANOGALACTANA OBTIDA DE *PLEUROTUS SAJOR-CAJU*

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, na Universidade da Região de Joinville. Orientador: Prof. Dr. Mauro de Souza Leite Pinho. Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França.

JOINVILLE/SC

2015

Catalogação na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

Carstens, Heidi Pfutzenreuter

C321aAvaliação in vivo da atividade antitumoral de manogalactana obtida de pleurotussajor-caju /Cartens, Heidi Pfutzenreuter; orientador Dr. Mauro de Souza Leite Pinho, co-orientador Dr. Paulo Henrique Condeixa de França– Joinville:UNIVILLE, 2015.

60f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente –

Universidade da Região de Joinville)

1. Pleurotussajor-caju. 2.Polissacarídeos fúngicos3. Ação antitumoral.4. Sarcoma 180. 5.Sistema imunológico. I.Pinho, Mauro de Souza Leite.(orient.). II. França, Paulo Henrique Condeixa de. III. Título.

CDD 616.01

Termo de Aprovação

"Avaliação *in vivo* da Atividade Antitumoral de Manogalactana Obtida de *Pleurotus sajor-caju*"

por

Heidi Pfutzenreuter Carstens

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.

Prof. Dr. Mauro de Souza Leite Pinho
Orientador (UNIVILLE)

Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França
Coorientador (UNIVILLE)

Profa. Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Mauro de Souza Leite Pinho
Orientador (UNIVILLE)

Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França
Coorientador (UNIVILLE)

Profa. Dra. Ana Angélica Steil
(UNIVALI)

Profa. Dra. Maristela Adamovski
(UNIVILLE)

Joinville, 09 de abril de 2015

"Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda a prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar. Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda verificação experimental. Perceber os fenômenos, discernir as relações, comparar as analogias e as dessemelhanças, classificar as realidades e induzir as leis: eis a ciência; eis, portanto, o alvo que a educação deve ter em mira. Espertar na inteligência nascente as faculdades cujo concurso se requer nesses processos de descobrir e assimilar a verdade."

Rui Barbosa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a DEUS, que colocou pessoas tão especiais a meu lado, sem as quais certamente não teria conseguido e me deu saúde e determinação em sempre seguir adiante.

A meu esposo, Maurício, por ser tão importante na minha vida. Graças ao seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio e amor, esta etapa da minha vida pôde ser concretizada. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho.

A meus pais, meu infinito agradecimento. Sempre acreditaram em minha capacidade e me ensinaram a fazer o melhor. Por cuidarem do meu filho Pedro,todas as vezes em que estive me dedicando a este trabalho, muito obrigada!

Aos meus orientadores, Professor Mauro de Souza Leite Pinho e Professor Paulo Henrique Condeixa de França, por acreditarem em mim, me mostrarem o caminho da ciência e serem exemplos de profissionais.

A professora Marcia Luciane Lange Silveira, que com muito carinho e dedicação me recebeu e orientou nas atividades práticas. Sua participação foi fundamental para a realização deste trabalho.

A todos os colegas e professoresda pós-graduação em Saúde e Meio Ambiente da Univille pelo convívio e aprendizado.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Molecular que me receberam tão bem e que nesses últimos dois anos participaram direta ou indiretamente me dando força e apoio, além de me ensinarem a cada dia.

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO**..... 12

2 **OBJETIVOS**..... 14

2.1 OBJETIVO GERAL..... 14

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 14

3 **REVISÃO DA LITERATURA**..... 15

3.1 CÂNCER..... 15

3.1.1 Imunidade tumoral..... 16

3.1.2 Cenário do câncer no Brasil e no mundo..... 18

3.1.3 Terapias..... 20

3.1.4 Modelo tumoral de estudo *in vivo*..... 22

3.2 POLISSACARÍDEOS FÚNGICOS..... 23

3.2.1 Propriedades antitumorais..... 24

3.2.2 Fungos do gênero *Pleurotus*..... 25

3.2.3 Manogalactana..... 26

4 METODOLOGIA..... 29

4.1 PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES (EPS)..... 29

4.1.1 Micro-organismo..... 29

4.1.2 Inóculo (pré-cultivo)..... 29

4.1.3 Cultivo em biorreator..... 30

4.1.4 Extração dos polissacarídeos do caldo de cutivo..... 31

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VIVO*..... 32

4.2.1 Animais..... 32

4.2.2 Tumor 32

4.2.3 Substâncias e dosagens..... 33

4.2.4 Delineamento experimental..... 33

4.2.4.1 Avaliação das frações PE1 e PEIsR após 11 dias..... 33

4.2.4.1 Avaliação das frações PE1 e PEIsR após 21 dias..... 33

4.2.5 Avaliação do desenvolvimento tumoral..... 34

4.2.6 Análise estatística..... 34

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 36

6 CONCLUSÃO..... 53

RERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 54

ANEXOS 60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$CaCO_3$ – carbonato de cálcio

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CN- controle negativo

CP – controle positivo

CP2 – controle positivo 2

CS1 – controle substância 1

CS2 – controle substância 2

DNA - ácido desoxirribonucleico

EPS – exopolissacarídeo ou polissacarídeo extra celular

EUA – Estados Unidos da América

G – gramas

GT1 – grupo testes 1

GT2- grupo teste 2

GT3 – grupo teste 3

GT4 – grupo teste 4

GT5 – grupo teste 5

GT6- grupo teste 6

H_3PO_4 – ácido fosfórico

INCA – Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva

K_2HPO_4 – fosfato dibásico de potássio

KG – quilogramas

L- litros

LTc – linfócitos T citotóxicos

M- molar

MAC – medicina complementar e alternativa

Me - metilado

MG – miligramas

$MgSO_47H_2O$ – sulfato de magnésio heptahidratado

MIN – minutos

ML- mililitros

NaOH – hidróxido de sódio

$(NH_4)_2SO_4$– sulfato de amônio

NK- natural killer

NO – óxido nítrico

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAHO – Pan American Health Organization

PBS – solução tampão fosfato

PE1 – precipitado etanólico 1

PEI – precipitado etanólico retido

PEIs –precipitado etanólico retido solúvel

PEIi – precipitado etanólico retido insolúvel

PEIsR – precipitado etanóllico retido solúvel retido

RPM – rotações por minuto

S180 – Sarcoma 180

UNIVALI – universidade do vale do Itajaí

UNIVILLE – universidade da região de Joinville

TDA – trigo-dextrose-ágar

V/V – volume/volume

WHO – World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2014, distribuídas por Unidades da Federação (todas as neoplasias malignas) 19

Figura 2- Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2014, distribuídas por Unidades da Federação (todas as neoplasias malignas)..... 19

Figura 3 – Esquema da parede de uma célula fúngica e composição química..... 24

Figura 4 – *Pleurotus sajor-caju* na natureza..... 26

Figura 5 - Inóculo de *Pleurotus sajor-caju* em garrafa Duran de 2L..... 30

Figura 6 - Cultivo de *Pleurotus sajor-caju* em biorreator..... 30

Figura 7 - Fluxograma simplificado para extração de polissacarídeos de *P. sajor-caju*..... 32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Avaliação da Massa do Tumor (11 dias)..... 37

Tabela 2 - Avaliação do Volume Tumoral (11 dias) 38

Tabela 3 - Avaliação da Massa do Tumor (21 dias)..... 40

Tabela 4 - Avaliação do Volume Tumoral (21 dias)..... 40

Tabela 5 – Valores médios de massa e volume do tumor e intervalo de tempo entre a indução do Sarcoma 180 e a avaliação de diferentes grupos controle positivo 43

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 - Termo de aprovaçãoda Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIVILLE..... 61

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das causas líderes em mortes por todo o mundo. Apesar de todos os esforços científicos e tecnológicos buscarem a cura do câncer nas últimas décadas, os efeitos adversos e indesejáveis de um tratamento quimioterápico continuam sendo um problema indissolúvel (WHO, 2014).

A descoberta de novas drogas seguras com atividade antitumoral tornou-se um importante objeto de investigação na medicina. A potencialização do sistema de defesa do próprio hospedeiro emerge como um dos mecanismos para inibição do crescimento tumoral, sem causar os efeitos adversos indesejados ao paciente (CHA *et al*., 2012).

Os cogumelos tem sua utilização estabelecida na culinária e medicina tradicional oriental em vários países, mas no último meio século, estudos por todo o mundo demonstram o potencial dos seus extratos e polissacarídeos, tanto na prevenção como no tratamento de câncer (ZONG *et al.*, 2012).

Polissacarídeos de fungos do gênero *Pleurotus* tiveram as atividades antitumorais de seus extratos descritas por vários autores (DALONSO *et al*., 2010; ASSIS *et al*., 2013; CHA *et al*., 2012). Sugere-se que esta atividade seja resultado de imunopotencialização e imunomodulação, uma vez que os polissacarídeos promovem ativação e proliferação de células do sistema imune inato (NK, macrófagos e neutrófilos), as quais secretam citocinas e ativam linfócitos B e T que medeiam a resposta imune celular e humoral (EL ENSHASY e HATTI-KAUL, 2013) .

Vários tipos de polissacarídeos são produzidos por fungos, sendo as glucanas os mais descritos. Todavia, heterogalactanas também foram encontradas tanto em corpos frutíferos como em exopolissacarídeos de cultura submersa (KOMURA *et al*., 2014). Algumas atividades biológicas das heterogalactanas foram testadas nos últimos anos, com resultados que sugerem a utilização destas, como modificadores da resposta biológica (SMIDERLE *et al*., 2008; SUN & LIU, 2009; JEFF *et al*., 2013).

A manogalactana, um heteropolissacarídeo, foi purificada e caracterizada em diferentes espécies fúngicas (ROSADO *et al*., 2003; SMIDERLE *et al*., 2011; MAITY *et al*., 2014), mas apenas uma manogalactoglucana isolada de *Lentinus edodes* teve sua atividade antitumoral testada *in vivo*até o presente momento (JEFF *et al*., 2013).

Diante do exposto, desenvolveu-se um estudo para avaliação em camundongos do potencial antitumoral de uma manogalactana obtida e purificada a partir de cultivo submerso de *Pleurotus sajor-caju*, bem como comparar o efeito deste polissacarídeoisolado com substâncias bioativas (extratos) já testadas deste fungo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliaro potencial antitumoral*in vivo* do polissacarídeo ‘manogalactana’ purificado de caldo de cultivo de *Pleurotus sajor-caju.*

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar*in vivo*, contra o Sarcoma 180, a atividade antitumoral da manogalactana;
- Determinar a dose de manogalactana mais eficiente para regressão tumoral;
- Avaliar a atividade antitumoral da manogalactana purificada em comparação às substâncias bioativas do caldo de cultivo de *Pleurotus sajor-caju.*

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CANCÊR

Os seres humanos adultos são compostos por um quatrilhão (10^5) de células e a constância deste número é mantida por um processo de replicação dinâmico e constante (POLLOK, 2006).

O câncer é uma doença celular. Diferente das células normais que crescem, multiplicam-se e morrem de maneira ordenada, os cânceres surgem da proliferação e disseminação descontrolada de clones de células malignamente transformadas (ABBAS *et al.*, 2012).

Câncer é sinônimo de tumor maligno ou massa neoplásica, deriva da palavra grega para caranguejo e passou a ser utilizada a partir da observação de que as neoplasias malignas cresciam para tecidos adjacentes com projeções em forma de pinça. A depender do grau de agressividade do tumor, o termo *câncer* nem sempre é considerado adequado para uso profissional, pois não corresponde ao comportamento biológico de uma neoplasia (STEVENS & LOWE, 1998).

Todos os tecidos tem potencial para gerar células neoplásicas e os processos que dão origem aos tumores são bastante semelhantes, apesar de cada câncer ter características únicas. Os eventos que levam à transformação de uma célula normal em maligna são chamados de carcinogênese e desencadeados por danos genéticos e alterações epigenéticas (INCA, 2011).

É possível narrar três estágios sequenciais da carcinogênese: iniciação, promoção e progressão. No primeiro, os genes sofrem ação dos agentes cancerígenos, como compostos químicos, radiações ou vírus. Estes alteram a composição ou estrutura do DNA e essas células passam a exibir uma vantagem seletiva de crescimento em relação às não expostas. Muitos desses eventos de iniciação são revertidos por mecanismos de reparo do DNA ou ainda podem ser neutralizados por resposta imunológica. A fase de promoção envolve a expressão do gene, a expansão clonal seletiva e a proliferação das células que sofreram iniciação. Esta fase, porém, sofre influencia de outros fatores (ambientais, idade do hospedeiro, composição da dieta, entre outros) e é caracterizado pela reversibilidade. O último estágio, o da progressão, é marcado pela multiplicação

descontrolada e irreversível das células. Aumento da massa do tumor, desprendimento de células dessa massa e alterações moleculares adicionais levam à penetração em tecidos e órgãos distantes, onde se fixam e continuam a crescer, processo conhecido como metástase (POLLOK, 2006).

A nomenclatura e a classificação dos tumores proporcionam informações sobre as células que os originaram. Carcinomas são neoplasias iniciadas em tecidos epiteliais e os tumores de origem mesenquimatosa (tecido conjuntivo ou músculo) são chamados de sarcomas (INCA, 2014).

3.1.1 Imunidade tumoral

É sabido que o sistema imunológico e as células malignas coexistem num equilíbrio dinâmico (DISIS, 2014). Considerando que uma célula neoplásica é geralmente menos diferenciada que uma célula normal e possui sua atividade proliferativa desregulada, espera-se que o sistema de defesa tenha um papel na vigilância e na eliminação dos tumores (VAZ *et al*., 2007).

O conceito de vigilância imunológica foi proposto por Frank Macfarlane Burnet na década de 50 e estabelece que alterações genéticas em células somáticas de animais de vida longa são mais comuns e que estas levam à malignidade celular. Portanto, um mecanismo de caráter imunológico para promover inativação ou eliminação dessas células foi evolutivamente necessário (CORTHAY, 2014).

A maior frequência de tumores em indivíduos imunocomprometidos e imunosuprimidos corrobora com essa ideia, assim como o oposto, a imunoestimulação, é importante coadjuvante na terapêutica do câncer. (ABBAS *et al*., 2012).

A atividade imune antitumoral é mantida por todos os componentes efetores do sistema imunológico, tanto nas respostas inespecíficas como nas específicas. As células imunes responsáveis pela depuração inicial de células tumorais, incluem células T CD4+ tipo 1, linfócitos T CD8+, *natural killers (NK)*, macrófagos tipo 1, neutrófilos tipo 1 e células dendríticas maduras. O mecanismo imune primário contra tumores é regulado por citocinas (IL-1α, IL-1β, IL-6 e IL-12) e traduz-se numa vigorosa resposta inflamatória (BURKHOLDER *et al*., 2014).

Macrófagos são frequentemente encontrados no microambiente de tumores e quando estimulados secretam TNF-α, por exemplo, uma citocina com atividade tumoricida. Outra célula importante na imunidade inata contra tumores são as células *natural killer*s, que reconhecem antígenos das células tumorais, mesmo que estas deixaram de expressar moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) (VAZ et al., 2007).

De modo geral, a imunidade celular parece ser mais requisitada que a resposta humoral. As células T são as mais importantes no combate aos tumores, atuando tanto na destruição das células malignas, quanto na ativação de outros mecanismos efetores. Neste contexto, as células apresentadoras de antígenos (APC) ou células dendríticas ocupam uma posição central. As APCs capturam os antígenos tumorais, processam e apresentam estes em um MHC I ou II. Juntamente com a co-estimulação, populações de linfócitos CD4+ e CD8+ são estimulados e montam uma resposta efetora específica, gerando linfócitos T CD8+ capazes de induzir a morte das células tumorais (ROMAGNOLI *et al*.,2015).

Assim, há também um grande envolvimento das células T CD4+, que atuam na resposta global pela geração de citocinas e células T CD8+, que também podem secretar citocinas, mas desempenham seu papel principalmente através de lise direta do tumor. Deve ser lembrado que as células T atuam de modo MHC restrito e que alguns tumores não expressam Ag associados ao MHC, escapando à ação destas células. Nestes casos, a ação de células como NK (imunidade inata)pode ser fundamental (CRUZ-MERINO *et al*., 2008).

O microambiente tumoral é importante para a determinação da progressão tumoral e está relacionado às citocinas predomindantes neste cenário. O linfócito T CD4+ ativado por uma APC será diferenciado em Th1, Th2, Treg, Th17 ou Th22 de acordo com as citocinas presentes no meio em que encontraram o antígeno e estes, de acordo com o perfil de citocinas que expressam, desempenham respostas imunes diferentes. Neste sentido, algumas citocinas incluindo IL-2, IL-7, IL-12, IL-18 e INF-α são utilizadas no tratamento de tumores promovendo crescimento e ativação de células T e NK aumentando o processamento do antígeno tumoral (ANESTAKIS *et al*., 2015).

Entretanto, apesar da vigilância imunológica, os tumores desenvolvem vários mecanismos para o escape do reconhecimento imune. Entre as propriedades das células tumorais que permitem sua evasão da defesa do hospedeiro estão a perda da expressão de antígenos que promovam a resposta imunológica, secreção de produtos imunossupressores, redução da expressão das moléculas de histocompatibilidade e inacessibilidade do antígeno tumoral (ABBAS *et al*., 2012).

3.1.2 Cenário do câncer no Brasil e no mundo

A incidência do câncer varia com o sexo, raça e idade e essa diferença entre as populações é atribuída a fatores ocupacionais, sociais e geográficos. Apesar de haver uma associação entre o tipo de tumor encontrado em cada idade, na vida adulta tardia há uma ampla variedade de neoplasias, consequência dos efeitos cumulativos da exposição aos agentes ambientais e dos traços hereditários de cada indivíduo (STEVENS & LOWE, 1998).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2012 o câncer foi responsável por 8,2 milhões de mortes em todo o mundo. Mais de 60% dos novos casos de câncer estão na África, Ásia e Américas Sul e Central e essas regiões são responsáveis por 70% das mortes por câncer no mundo. Em duas décadas, o número de casos de câncer passará de 14 para 22 milhões (OMS, 2014).

Nos países em desenvolvimento, os três cânceres mais frequentes em 2012 em homens foram os de pulmão, estômago e fígado; e de mama, colo do útero e pulmão nas mulheres (WHO, 2014).

Do total de mortes causadas por câncer em 2012 nas Américas, 47% estão na América Latina e Caribe. Um terço dos casos poderia ser prevenido se os principais fatores de risco fossem evitados. Eles incluem uso de tabaco, álcool, dieta pouco saudável e sedentarismo (PAHO, 2014)

No Brasil, a estimativa para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema no país. Em homens, os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral e nas mulheres, os de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireoide (INCA, 2014).

As figuras 1 e 2 mostram a representação das taxas de incidência de neoplasias malignas para cada 100 mil homens/mulheres, distribuídas por estados brasileiros, estimadas para o ano de 2014, pelo Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, onde as regiões Sul e Sudeste apresentam as maiores taxas de incidência, independente do gênero. Todas as neoplasias malignas estão inseridas neste cenário, incluindo as de pele, o que pode contribuir para a maior incidência estar nessas regiões.

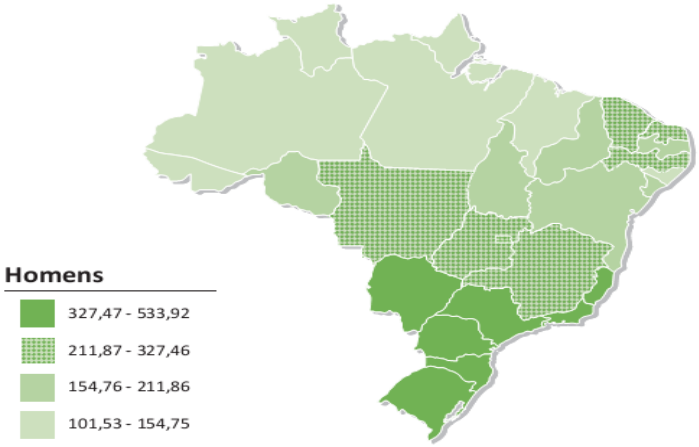

Figura 1- Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2014, distribuídas por Unidades da Federação (todas as neoplasias malignas).
Fonte: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

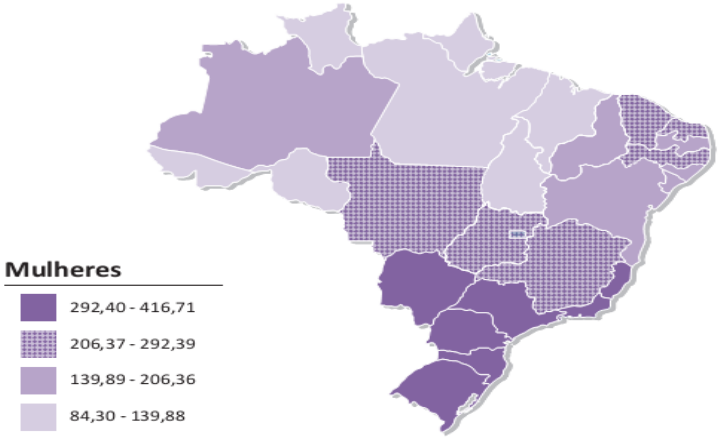

Figura 2 - Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2014, distribuídas por Unidades da Federação (todas as neoplasias malignas).
Fonte: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

3.1.3 Terapias

O planejamento terapêutico adequado para cada paciente com doença maligna depende do diagnóstico e estadiamento, juntamente com as alternativas terapêuticas para o tipo de tumor (POLLOK, 2006).

A cirurgia foi a primeira modalidade utilizada no tratamento do câncer e é eficaz para pacientes com tumores sólidos e restritos a determinados locais anatômicos, porém a invasão microscópica do tumor no tecido normal circundante pode ser não percebida pelo profissional cirurgião (FAUCI *et al*., 1998).

A cirurgia pode ser terapêutica, diagnóstica, terapia paliativa ou até mesmo profilática. É um método invasivo, mas necessário para validar o diagnóstico e identificar o tipo de câncer (biópsia) (GATES & FINK, 2009).

Assim como a cirurgia, a radioterapia é um tratamento localizado do câncer. Seu objetivo é destruir as células cancerígenas com pouca ou nenhuma destruição das estruturas adjacentes. É uma aplicação de radiação eletromagnética (raios X ou gama),ministrada em doses fracionadas, normalmente por feixe externo, onde a radiação provém de fonte fora do corpo. Por esse motivo, o posicionamento do paciente deve ser reproduzido com exatidão em cada seção de tratamento para garantir que apenas a massa tumoral esteja sendo afetada. A radioterapia é um tratamento minimamente invasivo e pode ser usada como única modalidade curativa, mas na maioria das vezes é utilizada combinada a outras terapias contra tumores (FAUCI *et al*., 1998).

A quimioterapia sistêmica é a principal terapia para doença maligna disseminada, além de ter papel importante da intervenção paliativa. Os agentes farmacológicos usados no tratamento do câncer incluem uma gama variada de compostos que atuam por vários mecanismos (FAUCI *et al*., 1998).

De maneira ampla, os quimioterápicos atuam nas diferentes fases do ciclo celular. Todas as células, normais ou cancerosas, passam pelas mesmas fases até chegarem à divisão celular. Células normais de crescimento rápido, como células sanguíneas, mucosa de revestimento do tubo digestivo, pele e células germinativas, são as mais afetadas pelos antineoplásicos (ALMEIDA, 2004).

A quimioterapia pode ser feita com a aplicação de um ou mais fármacos, porém o uso de drogas isoladas (monoquimioterapia) mostrou-se ineficaz em induzir respostas completas ou parciais significativas na maioria dos tumores. A

poliquimioterapia tem eficácia comprovada e objetiva atingir populações celulares em diferentes fases do ciclo celular, diminuir o desenvolvimento de resistência às drogas e promover maior resposta por dose administrada. Os efeitos terapêuticos e tóxicos dos quimioterápicos dependem do tempo de exposição e da concentração plasmática da droga. A toxicidade é variável para os diversos tecidos, dependente da droga utilizada e vai desde efeitos precoces como mal-estar, náuseas e vômitos até tardios, que incluem alopecia, nefrotoxicidade e sequelas no sistema nervoso central, entre outros (INCA, 2014).

Apesar dos esforços na direção de tornar os fármacos seletivos ao tecido tumoral, os agentes neoplásicos ainda manifestam toxicidade significativa sobre as células sadias, com efeitos colaterais acentuados na maioria dos pacientes(SILVA, 2002).

Avanços na compreensão do sistema imunológico e na definição de antígenos em células tumorais tem motivado o estudo para tratamentos contra o câncer mediante abordagens imunes. A principal razão para o interesse atual nesta área está no fato de ser altamente específica, com destruição das células tumorais sem danos aos tecidos sadios (ABBAS*et al.*, 2012)

O objetivo da imunoterapia é potencializar ou restaurar a habilidade do sistema imune em detectar e destruir células tumorais, retomando o equilíbrio da proteção imune. As estratégias incluem vacinas, anticorpos monoclonais, drogas antiangiogênicas e drogas biológicas imunoestimulantes, entre outras(PADOLFI*et al.*, 2011).

Vacinas terapêuticas para o câncer tem o objetivo de aumentar a apresentação de antígenos tumor-associados e ativar células T e B específicas, podendo ser produzidas de células do tumor do próprio paciente (autóloga) ou por linhagens celulares tumorais humanas estabelecidas (alogênica) (DISIS, 2014).

Na última década, os esforços para melhorar a apresentação de antígenos tumorais para o sistema imune tem se centrado em células apresentadoras de antígenos. Células dendríticas tem papel da indução e modulação da resposta imune efetiva e, além do contato direto com outras células e secreção de citocinas, podem secretar nanovesículas chamadas de exosomas, quequando incorporadas por células tumorais, as tornam alvos imunogênicos (ROMAGNOLI *et al*., 2015).

As drogas biológicas estão agrupadas na categoria de imunoterapia ativa, onde o objetivo é a estimulação do sistema imune como um todo ou contra um

antígeno tumoral específico através da própria “máquina” imune do paciente (CRUZ-MERINO*et al.*, 2008). São também chamados de *modificadores da resposta biológica* sugerindo que esses agentes alterem a resposta imunológica do hospedeiro frente ao câncer sem citotoxicidade direta (FAUCI *et al*., 1998).

Finalmente, algumas terapias para o câncer são utilizadas concomitantemente aos tratamentos convencionais, como o uso de ervas medicinais, suplementos vitamínicos, dietas especiais, medicina chinesa, homeopatia, técnicas de relaxamento terapêutico e outros. Esse conjunto de sistemas, práticas e produtos, que não são considerados de primeira escolha na rotina médica édefinido como Medicina Complementar e Alternativa (MAC), sendo elevado o número de pacientes que buscam esse tipo de terapia (LEAL, 2008).

3.1.4 Modelo tumoral de estudo *in vivo*

A oncologia experimental é um ramo da oncologia que utiliza modelos experimentais para estudar a biologia, desenvolvimento, comportamento clínico e tratamento de tumores, permitindo melhor compreensão de efeitos adversos dos agentes estudados sobre o processo neoplásico (BRENTANI *et al*., 2006).

A escolha do modelo tumoral depende do problema a ser investigado. Os experimentos com transplante de células tumorais em camundongos ou ratos por via subcutânea são de simples avaliação para agentes anticancerígenos, fácil inoculação e permitem acompanhamento contínuo e por esse motivo são os mais comuns (WORKMAN *et al.,* 2010).

O Sarcoma 180 (S180) foi descoberto por Woglom, em 1914, a partir do isolamento de células de um tumor espontâneo na região axilar de um camundongo albino (ZUCKERBERG, 1973).

Também conhecido como tumor de Crocker é uma neoplasia pouco diferenciada, com comportamento agressivo. Invade os tecidos adiposo e muscular esquelético, nervos e vasos sanguíneos, mas não produz metástase (KURASHIGE & MITSUHASHI, 1982).

Segundo Bucchi (2002), as células do S180 são de fácil obtenção e manutenção com crescimento rápido em 90 a 100% dos animais inoculados.

Vários autores tem utilizado o S180 em camundongos para avaliação antitumoral (LEE*et al.*, 2003; DALONSO *et al.*, 2010; CHA *et al.*, 2012; SHIM *et al*., 2012; ASSIS *et al*.,2013).

3.2 POLISSACARÍDEOS FÚNGICOS

Os polissacarídeos são macromoléculas compostas de longas cadeias com centenas ou milhares de unidades de monossacarídeos (açúcares simples), representando a forma da maioria dos carboidratos encontrados na natureza. Também chamados de glicanos, diferem entre si na identidade de suas unidades monossacarídicas, nos tipos de ligações que as unem, no comprimento das cadeias e no grau de ramificação. Se formados de apenas um tipo de unidade monomérica, são chamados de homopolissacarídeos; com dois ou mais tipos, são conhecidos como heteropolissacarídeos (LEHNINGER*et al*., 2000).

A parede celular dos fungos é constituída principalmente pelos polissacarídeosmanana , glucana e quitina. A quitina é o principal componente do exoesqueleto da parede celular fúngica,as glucanas responsáveis pela manutenção da forma celular, enquantoas mananascombinadas às proteínas são o maior componente da matriz da parede celular(ROSS, 2001).

A camada interna da parede celular dos fungos é majoritariamente composta por β (1→3) glucanas e (1→6) glucanas. As mananas estão comumente ligadas covalentemente a proteínas nas camadasmais externas (CARLILE & WATKINSON, 1994).

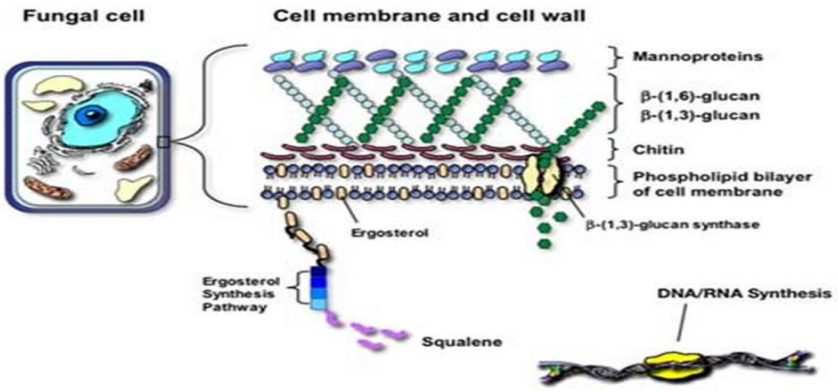

Figura 3 – Esquema da parede de uma célula fúngica e composição química.
Fonte: http://infungicas.blogspot.com.br/

Os polissacarídeos fúngicos podem ser produzidos a partir de corpos de frutificação por meio de cultivo sólido ou da massa micelial e polissacarídeos extracelulares (EPS), obtidos a partir de cultivo líquido (CHAVES, 2011)

O meio para cultivo submerso pode ser modificado, a fim de melhorar a produção dos EPS. Agostini (2013) modificou o meio POL, retirando o extrato de levedura de sua composição, sem interferência na produção de EPS de *Pleurotus sajor-caju*. Este estudo tinha como objetivo confirmar que a presença de mananas no caldo eraoriunda do cultivo e não do substrato do meio.

Pelas suas atividades farmacológicas, diversos polissacarídeos de várias espécies fúngicas foram estudados. Estão descritas atividades antimicrobianas, antivirais,antitumorais, imunomoduladoras, anti-inflamatória, entre outras (LINDEQUIST *et al*., 2005).

3.2.1 Propriedades antitumorais

Em países asiáticos como China e Japão, cogumelos como *Ganoderma lucidum, Lentinus edodes* (shiitake) e *Tremella fuciformis* são apreciados pelo seu sabor e textura e usados na medicina tradicional. A maior parte do conhecimento sobre cogumelos como alimento ou agente medicinal provém dessas três espécies (ZHANG *et al*., 2007).

Cogumelos são descritos como macrofungos, com um corpo frutífero distinto, largo o suficiente para ser visto a olho nu e colhido com as mãos. Apenas fungos da classe dos Basideomicetos e alguns Ascomicetos possuem essa característica (LINDEQUIST *et al*, 2005)

Em 1957, pela primeira vez, uma substância de um cogumelo foi testada contra o S180 com efeito inibitório significativo e a partir daí, subsequentes estudos foram realizados (ZHANG *et al*., 2007). Muitos polissacarídeos, a maioria deles β-glucanos, foram relatados como tendo efeitos antitumorais significativos. Os mais extensivamente estudados são os provenientes de *Lentinus edodes* (BORCHERS *et al*, 2004).

Lee *et al*. (2003) testaram a atividade antitumoral de *Agaricus blazei* frente ao S180 em camundongos, administrado oralmente, com redução significativa do tamanho do tumor, quando comparado ao controle positivo.

Shim *et al*. (2012) verificaram atividade antitumoral de extrato de *Elfvingia applanata* em camundongos, quando tratados intraperitonealmente por 10 dias contra S180 e a sobrevida dos animais aumentou 42,5%.

O extrato polissacarídeo de *Inonotus obliquus* foi investigado *in vitro* frente a uma cultura celular de neurogliocitoma humano, com inibição da proliferação tumoral. O resultado deste estudo foi baseado na análise de expressão de proteínas ligadas ao mecanismo de apoptose (NING *et al*., 2014).

Ao lado da identificação da atividade antitumoral dos extratos de cogumelos, está a pesquisa de novas substâncias de origem fúngica com esta propriedade. Juntamente com as glucanas, um grande leque de polissacarídeos antineoplásicos vem aumentando o grupo dos compostos naturais que atuam como modificadores da resposta biológica (ZONG *et a*l., 2012).

3.2.2 Fungos do gênero *Pleurotus*

Cogumelos do gênero *Pleurotus* são largamente utilizados na alimentação e podem ser encontrados naturalmente em florestas tropicais, subtropicais e temperadas (Figura 4). Todavia, são facilmente cultiváveis em resíduos agroindustriais e agroflorestais com baixo custo (BONATI, 2002). Esse gênero

pertence à classe dos Basidiomicetos, na qual existem mais de 25 mil espécies conhecidas.

Figura 4 – *Pleurotus sajor-caju* na natureza.
Fonte: http://about-chinesefood.com/cookbook_material/pleurotus-sajor-caju-618/

O *Pleurotus sajor-caju*, conhecido no Japão como "Houbitake", é um cogumelo de sabor suave, rico em vitaminas e aminoácidos e que apresenta propriedades terapêuticas. Alguns autores mostraram que este cogumelo pode ser útil para o desenvolvimento de drogas antitumorais (DALONSO *et al.*, 2010; FACHINI *et al*., 2014).

Furlan *et al*. (2008) revelaram algumas possibilidades de aplicação dos fungos do gênero *Pleurotus* como produção de corpos de frutificação com alto teor de proteínas, produção de EPS com efeito antitumoral e utilização da biomassa micelial como inóculo para cultivo sólido.

Estudos comprovam diversas propriedades terapêuticas dos polissacarídeos sintetizados por *Pleurotus*, como a anti-inflamatória (SILVEIRA *et al*., 2014), antinociceptiva (SMIDERLE *et al.*, 2008; AGOSTINI, 2013); imunoestimulante (SUN & LIU, 2009) e antitumoral (BARBA, 2010; CHA *et al*., 2012; YANG *et al*., 2013; ASSIS *et al*., 2013).

3.2.3 Manogalactana

Polissacarídeos e extratos de vários cogumelos contendo principalmente α e β-glucanas possuem atividade antitumoral descrita em estudos com animais (ZONG *et al.*, 2012). Entretanto, ao lado das glucanas, outros polissacarídeos como galactanas, fucanas, xilanas e mananas isoladas de diferentes cogumelos também

exibem atividades biológicas significantes e por isso, estão sendo purificadas, identificadas e estudadas nos últimos anos (MAITY *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, heteropolissacarídeos de algumas espécies de fungos foram purificados e estruturalmente caracterizados como contendo uma cadeia principal α-D-Galp (1-6) ligada com uma manose e terminal não-redutor, denominados genericamente como 'manogalactanas'(CARBONERO, 2006).

Rosado *et al*. (2003) analisaram a composição dos precipitados de corpos frutíferos de *Pleurotus ostreatus* 'flórida' Berk e *Pleurotus ostreatoroseus* Sing e encontraram manose, galactose, glicose e 3-O-metil galactose. Um estudo anterior dos mesmos autores em 2002 havia caracterizado uma α-D-galactana 3-O-metilada (1→4) ligada, em cultivo submerso, também de *Pleurotus ostreatoroseus* (ROSADO *et al*., 2002).

Agaricus bisporus e *Agaricus brasiliensis* mostraram diferenças em suas composições polissacarídicas, onde o primeiro apresentou manogalactana como polissacarídeo principal e o segundo, β-glucana (SMIDERLE *et al*., 2011).

Komura *et al*. (2014) estudaram três polissacarídeos da biomassa micelial obtidos de cultura submersa em comparação com os encontrados nos corpos frutíferos de *Pleurotus ostreatus* var. *florida*. Os polissacarídeos eram manogalactana, β-glucana e glicogênio e o resultado mostrou que é possível obter as mesmas moléculas, independente da origem (cultivo submerso ou corpos frutíferos) e que o cultivo submerso seria o caminho de escolha para obtenção dessas moléculas, já que requer um tempo menor.

Outros estudos apontam para a capacidade desses polissacarídeos apresentarem atividades biológicas (SMIDERLE *et al*., 2011; JEFF *et al*., 2013; MAITY *et al*., 2014).

Smiderle *et al*. (2008) caracterizaram a estrutura polissacarídica extraída de corpos frutíferos de *Pleurotus pulmonaris* como sendo uma manogalactana. No mesmo estudo, esta apresentou inibição dose-dependente na resposta nociceptiva em camundongos, com inibição de 93 ± 3% na dose de 30mg/kg, mas a resposta anti-inflamatória não foi observada.

Uma manogalactoglucana de *Lentinus edobes*, nomeada de LE-MGG, foi isolada e purificada por Jeff *et al*. (2013). De acordo com o estudo, foi observada

uma taxa de inibição de crescimento tumoral, frente ao S180 de 29, 38 e 43% nas concentrações de 1, 2 e 5mg/mL.

Isolada de corpos frutíferos de*pfle 1p* (forma híbrida dos cogumelos *Pleurotus florida* e *Lentinula edodes*), uma manogalactana foi purificada e estruturalmente caracterizada por MAITY *et al*. (2014). Neste mesmo estudo, o heteropolissacarídeo exibiu ativação dos macrófagos por produção de NO, bem como estimulação de timócitos e esplenócitos *in vitro*, sugerindo que possa ser usado como modificador da resposta biológica.

4. METODOLOGIA

4.1 PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEO EXTRACELULAR (EPS)

O polissacarídeo extracelular foi produzido por cultivo submerso no Laboratório de Biotecnologia II da UNIVILLE.

4.1.1 Micro-organismo

O fungo utilizado para síntese dos polissacarídeos foi *Pleurotus sajor-caju* CCB019, mantido sob refrigeração a 4°C, com repiques trimestrais em meio TDA (trigo-dextrose-ágar), conforme descrito por Furlan*et al.*(1997) em placas de Petri.

4.1.2. Inóculo (pré-cultivo)

Preparou-se 400 mL de meio de cultivo POL, composto de 5,0 g/L de sulfato de amônio [$(NH_4)_2SO_4$], 0,2g/L de sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4.7H_2O$), 1,0g L^{-1} de fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4), 2,0g/Lde extrato de levedura, 1,0g/L de peptona de soja com pH incial de 6,5-7,0 (CAVAZZONI e ADAMI, 1992) e concentração inicial de glicose de 20g/L. Este meio foi acondicionado em frasco Duran de 2L com duas saídas laterais e autoclavado a 121°C por 20 minutos. Em seguida, em condições estéreis, o meio foi inoculado com todo o micélio de uma placa de Petri de 7 dias de crescimento em meio TDA. O frasco permaneceu incubado a 30°C, sob agitação recíproca de 120 min^{-1} por seis dias (Figura 5). O volume do inóculo preparado correspondeu a 10% do volume de trabalho necessário para cultivo posterior em biorreator (WISBECK, 2003). Este procedimento foi feito emduplicata.

Figura 5 – Inóculo de *Pleurotus sajor-caju* em garrafa Duran de 2L.

4.1.3.Cultivo em biorreator

O cultivo de *Pleurotus sajor-caju* foi realizado em biorreator de mistura completa modelo MD B. BRAUN e dorna de vidro de capacidade útil de 5L, com volume de trabalho de 4L. Foi utilizado omeio POL modificado, segundo ASSIS *et al.* (2013): 2,5g/L de $(NH_4)_2SO_4$; 0,2g/L de $MgSO_4.7H_2O$; 1,0g/L de K_2HPO_4; 1,0g/L de peptona; 1,0 g/L de $CaCO_3$, sem adição de extrato de levedura e concentração inicial de glicose de 20g/L, em processo descontínuo simples. A temperatura foi mantida em 30°C e a aeração em 250mL/min, com frequência de agitação de 350rpm. O pH foi controlado em 4,0 por adição automática de soluções de NaOH 6M e H_3PO_4 12N (Figura 6).

O cultivo foi finalizado após 256 horas (11 dias aproximadamente), tempo em que a concentração de EPS atinge seu valor máximo (AGOSTINI, 2013).

Figura 6 – Cultivo de *Pleurotus sajor-caju* em biorreator.

4.1.4 Extração dos polissacarídeos do caldo de cultivo

O processo de extração do polissacarídeo extracelular foi realizado no Laboratório de Biotecnologia II da UNIVILLE e desenvolvido durante tese de doutorado de Silveira, M.L.L.

A biomassa e o caldo obtidos do cultivo foram separados por filtração em papel Whatman n°1. A precipitação dos polissacarídeos extracelulares foi realizada adicionando-se etanol ao caldo de cultivo na proporção de 4:1 (v/v). O material precipitado (PE1), após 24 horas sob refrigeração, foi separado do sobrenadante etanólico por centrifugação e dialisado em membrana de celulose com limite de exclusão de 2kDa. O conteúdo retido na membrana de diálise (PEI) foi concentrado em rotaevaporador e submetido ao processo de congelamento e descongelamento, a fim de promover a separação dos polissacarídeos insolúveis em água fria. Ao final do descongelamento, a solução foi centrifugada. O sobrenadante continha os polissacarídeos solúveis em água fria (PEIs) e o precipitado continha os polissacarídeos insolúveis (PEIi). Ambas as frações foram congeladas novamente e o processo de gelo/degelo/centrifugação repetido até a não formação de precipitado ao final da centrifugação. A fração solúvel (PEIs) foi liofilizada e dialisada em membrana de celulose com limite de exclusão de 6-8 kDa.A fração retida pós-diálise (PEIsR) apresentou um perfil de eluição homogêneo e composição monossacarídica constituída por manose (37,0%), galactose (39,7%) e 3-*O*-metil-galactose (23,3%). A análise de metilação demonstrou a presença de 35,2% de unidades 3,4-Me_2-Gal*p*, 31,1% de unidades de 2,3,4-Me_3-Gal*p* e 33,7% de unidades terminais não redutoras de manose. Estes dados sugerem que PEIsR apresentou uma cadeia principal formada por unidades de α-D-galactose (1- 6)-ligada e unidades de 3-*O*-Me-α-D-galactose (1- 6)-ligada, com ramificações em O-2 de unidades de β-D-manose com terminais não-redutores (SILVEIRA *et al*., 2015). O processo de extração desta manogalactana está apresentado esquematicamente na figura 7.

As frações PE e PEIsR (manogalactana) foram liofilizadas e utilizadas para avaliação de atividade antitumoral.

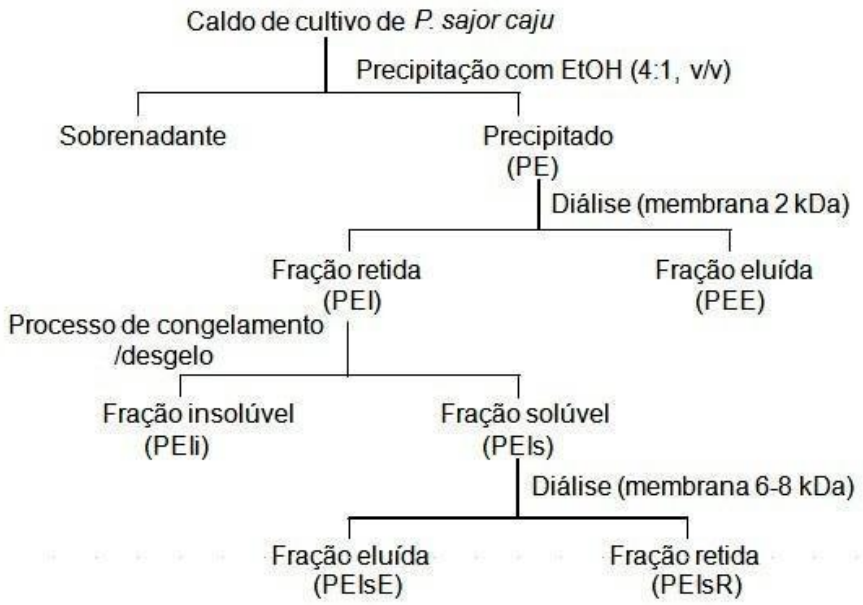

Figura 7 -Fluxograma simplificado para extração de polissacarídeos de *Pleurotus sajor-caju*.
Fonte: Silveira et al., 2015.

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VIVO*

Os experimentos realizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIVILLE, sob ofício n° 032/2013 de 04 de setembro de 2013 e desenvolvidos no Biotério Experimental da UNIVILLE.

4.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss machos *(Mus musculus)*, com peso de 30 ± 5g, mantidos em biotério com água e ração *ad libidum*, temperatura controlada em 22 ± 1°C, umidade relativa do ar em 60 ± 2 % e fotoperíodo de 12 horas.

4.2.2 Tumor

A linhagem tumoral Sarcoma 180 (S180) foi doada pela Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) e mantida por repiques intraperitoneais semanais de suspensão

tumoral em camundongos albinos Swiss machos (MATSUZAKI*et al.*, 2003).Nos animais submetidos a indução tumoral, esta foi realizada no dorso, por via subcutânea (LEE*et al.*, 2003), utilizando líquido ascítico na concentração de 5 x 10^6 células.animal^{-1} (MATSUZAKI, *et al*., 2003).

4.2.3 Substâncias e dosagens

As frações *extrato* (PE) e *manogalactana* (PEIsR)foram solubilizadas em solução tampão fosfato (PBS 0,01M pH 7,0) na concentração de0,5 mg/mL para os grupos de animais testados na dose de 3,0 mg/kg(ASSIS *et al*., 2013). Para as doses de 0,1 mg/kg e 1,0 mg/kg(AGOSTINI, 2013) as soluções de PEIsR foram preparadas nas concentrações de 0,025 mg/mL e 0,25 mg/mL, respectivamente.

A administração de cada fração foi iniciada 24 horas após a indução tumoral, via intraperitoneal, por 10 dias consecutivos, uma vez ao dia (AJITH & JANARDHANAN, 2003).

4.2.4 Delineamento experimental

4.2.4.1 Avaliação do*extrato* (PE) e *manogalactana* (PEIsR)após 11 dias

Na primeira etapa da fase experimental foram utilizados 65 animais,com avaliação das frações PEIsR e PEapós 11 dias da indução tumoral eos grupos divididos da seguinte maneira:

a) **Grupo Controle Negativo (CN)** - composto por 5 animais, sem indução tumoral e administração de volume equivalente a 3,0mg/kg de PEIsR de PBS.

b) **Grupo Controle Positivo (CP)** – composto por 10 animais, com indução tumoral e administração de volume equivalente a 3,0mg/kg de PEIsRde PBS.

c) **Grupo Controle Substância PEIsR (CS1)** – composto por 5 animais, sem indução tumoral, com administração de 3,0 mg/kgde PEIsR.

d)**Grupo Controle Substância PE1 (CS2)** – composto por 5 animais, sem indução tumoral, com administração de 3,0 mg/kgde PE.

e) **Grupo Teste 1 (GT1)** – composto por 10 animais, com indução tumoral e administração de 0,1 mg/kg de PEIsR.

f)**Grupo Teste 2 (GT2)** – composto por 10 animais, com indução tumoral e administração de 1,0 mg/kg de PEIsR.

g)**Grupo Teste 3 (GT3)** – composto por 10 animais, com indução tumoral e administração de 3,0 mg/kg de PEIsR.

h)**Grupo Teste 4 (GT4)** – composto por 10 animais, com indução tumoral e administração de 3,0 mg/kg de PE.

4.2.4.2 Avaliação do *extrato* (PE) e *manogalactana* (PEIsR) após 21 dias

Nesta fase, as frações PE e PEIsR foram avaliadas 21 dias após a indução tumoral (ZHUANG*et al.*, 1993), ou seja, 10 dias após o término da administração das frações polissacarídicas. Foram avaliados 30 animais, distribuídos da seguinte maneira:

a) **Controle Positivo (CP2)**: composto por 10 animais, com indução tumoral e administração devolume equivalente a 3,0mg/kg de PEIsRde PBS.
b) **Grupo Teste 5 (GT5)**: composto por 10 animais, com indução tumoral e administração de 3,0 mg/kg de PEIsR.
c) **Grupo Teste 6 (GT6)**: composto por 10 animais, com indução tumoral e administração de 3,0 mg/kg de PE.

4.2.5 Avaliação do desenvolvimento tumoral e análise estatística

A avaliação do desenvolvimento tumoral foi realizada por determinação do volume tumoral (cm^3) de acordo com Ajith & Janardhanan (2003), da massa (g) do tumor(MISAKI *et al*., 1984) e da taxa de inibição (%). Os tumores foram retirados e pesados com balança de precisão analítica. O volume do tumor foi determinado pela fórmula ($4/3\pi\ (a^2\ b)/2$), onde *a* é o diâmetro menor e *b* corresponde ao diâmetro maior, medidos com auxílio de um paquímetro. A taxa de inibição foi obtida pela relação [(1-T/C)100], onde T é a média dos tumores do grupo tratado e C é a média dos tumores do grupo controle (LEE *et al*., 2003).

Os dados foram analisados por meio de teste estatístico para rejeição de valores desviantes, Teste 'Q' de Dixon, com nível de confiança de 99% (RORABACHER, 1991) e submetidos à análise de variância de valores médios

(ANOVA), através do teste F, com nível de significância de 5%.A verificação das diferenças significativas entre médias foi realizada pelo teste t, com nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme as normas do Programa de Pós Graduação do Mestrado em Saúde e Meio Ambiente da UNIVILLE, esse capítulo será apresentado na forma de artigo científico que será encaminhado para publicação em periódicos.

Avaliação *in vivo* da atividade antitumoral de manogalactana obtida de *Pleurotus sajor-caju*

In vivo evaluation of the antitumoral activity of mannogalactan obtained from *Pleurotus sajor-caju*

Heidi Pfützenreuter Carstens[a] *,Henrique Herbst Rosa[b], Silvia Vanderléia Petzhold[b], Marcia Luciane Lange Silveira[c], Sandra Furlan[c], Maristela Adamowski[c], Leslie Ecker Ferreira[c,d], Paulo Henrique Condeixa de França[e], Mauro de Souza Leite Pinho[e].

[a] Mestranda do Programa de Pós-graduação em Saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE - Joinville (SC), Brasil

[b] Acadêmico do Departamento de Farmácia da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE - Joinville (SC), Brasil

[c]Docente da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE - Joinville (SC), Brasil

[d] Bióloga Responsável pelo Laboratório de Pesquisa em Biologia Molecular da UNIVILLE - Joinville (SC), Brasil

[e] Docente do Departamento de Medicina da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE - Joinville (SC), Brasil

[*] Correspondência do autor

Laboratório de Biologia Molecular da Universidade da Região de Joinville.

Endereço: Paulo Malschitzki, 10, Campus Universitário, Zona Industrial. CEP: 89219710. Joinville, Santa Catarina, Brasil.

Tel.: +55 47 34619197

E-mail: heidipi@hotmail.com

Resumo

OBJETIVO: Avaliar*in vivo* o potencial antitumoral do polissacarídeo ‘manogalactana’ purificado de caldo de cultivo de *Pleurotus sajor-caju*frente ao Sarcoma 180 (S180).**MÉTODOS**: A manogalactana foi purificada de caldo de cultivo de *Pleurotus sajor-caju* por precipitação etanólica, seguida de ciclos de congelamento/descongelamento e diálise. Foi testada em camundongos inoculados com S180 nas doses de 0,1, 1,0 e 3,0mg/kg, tratados intraperitonealmente por 10 dias. O precipitado etanólico (extrato PE) foi estudado apenas na dose de 3,0 mg/kg, em camundongos igualmente tratados por via intraperitoneal durante 10 dias. A avaliação do efeito antitumoral foi realizada por determinação do volume tumoral, da massa do tumor e da taxa de inibição. **RESULTADOS:** Os grupos-teste com avaliação após 11 dias da indução tumoral e tratados com extrato e manogalactana não apresentaram inibição do crescimento tumoral. Os grupos tratados com manogalactana e extrato, ambos na dose de 3,0mg/kg e avaliados após 21 dias da indução tumoral, tiveram uma taxa de inibição do volume tumoral de 3,44 e 8,76%, respectivamente, mas os resultados não apresentaram significância estatística.**CONCLUSÃO:**Não foi possível demonstrar a existência de atividade antitumoral da manogalactana purificada de caldo de cultivo de *Pleurotus sajor-caju*em relação ao Sarcoma 180.

Palavras-chave: Manogalactana*, Pleurotus sajor-caju,* antitumoral, Sarcoma 180.

Abstract

OBJECTIVE: The purpose of this study was to evaluate *in vivo* the antitumor potential of the'mannogalactan' polysaccharide purified from the liquid culture of *Pleurotus sajor-caju* against Sarcoma 180 (S180). METHODS: The mannogalactan was purified by ethanol precipitation followed by cycles of freezing / thawing and dialysis. It was tested in mice inoculated with S180 by intraperitoneally doses of 0.1, 1.0 and 3.0mg/kg during 10 days. The ethanol precipitate (PE extract) was only studied in the 3.0 mg / kg dose in mices also treated intraperitoneally for 10 days. The antitumor effect was carried out by determining the tumor volume, the tumor mass and the inhibition rate. RESULTS: The tests groups with analisys after 11 days of tumor induction and treated with PE extract or mannogalactan showed no inhibition of tumor growth. The treated groups with mannogalactan and PE extract, both on 3.0mg/kg dose and evaluated 21 days after tumor induction, had an inhibition rate of tumor volume of 3.44 and 8.76%, respectively. This results were not statistically significant. CONCLUSION: It was no possible to demostrate the existence of anti –tumor activity of mannogalactan obtained from *Pleurotus sajor – caju* against to the Sarcoma 180 .

Keywords: Mannogalactan , *Pleurotus sajor-caju*, anti-tumor, Sarcoma 180.

Introdução

Fungos do gênero *Pleurotus* são amplamente utilizados na culinária e figuram entre as espécies mais comercializadas no mundo[1]. Nos últimos anos, diversos estudos tem demostrado que compostos bioativos derivados de cogumelos deste gênero também possuem propriedades medicinais, entre elas a atividade antitumoral[2].

Em 2012, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 8,2 milhões de pessoas morreram de câncer em todo o mundo e em duas décadas o número de casos passará de 14 para 22 milhões. A estimativa para o ano de 2015 é que 576.000 novos casos ocorrerão somente no Brasil[3]. Os tratamentos disponíveis para tumores englobam cirurgia, radioterapia e agentes quimioterápicos, mas os efeitos adversos e indesejáveis dessas terapias continuam sendo um desafio. Novos compostos capazes de modificar o sistema de defesa do próprio hospedeiro, levando à inibição do crescimento tumoral sem os efeitos colaterais indesejados, emergem como uma alternativa promissora[4].

Polissacarídeos fúngicos têm despertado interesse na comunidade científica por sua ação antitumoral aparentemente estar relacionada à modulaçãodo sistema imunológico ou agirem como modificadores da resposta biológica[5]. Já foram descritos efeitos antineoplásicos de extratos de corpos frutíferos[6] e de exopolissacarídeos (EPS) obtidos a partir de cultura submersa[7], ambos processados de *Pleurotus sajor-caju*, bem como de biomassa micelial obtida de *Pleurotus ostreatus*[8].

Os cogumelos podem produzir vários tipos de estruturas polissacarídicas, sendo as glucanas as mais descritas e estudadas[1]. Ao lado delas, outros polissacarídeos como galactanas, fucanas, xilanas e mananas veem sendo identificadas e estudadas[9]. Heteropolissacarídeos, especialmente as manogalactanas obtidas de *Pleurotus*, tiveram suas estruturas elucidadas nos últimos tempos[10,11, 12] e estão sendo apontadas como potenciais modificadores da resposta biológica, ainda sem mecanismos de ação determinados[9]. Apenas um estudo até este momento, apresenta uma manogalactoglucana obtida de *Lentinus edodes* como tendo efeito antitumoral*in vivo*[13].

O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial antitumoral*in vivo* de uma manogalactana purificada de caldo de cultivo de *Pleurotus sajor-caju,* comparando-a com o efeito do extrato não purificado.

Materiais e métodos

Microrganismo e manutenção

Pleurotus sajor-caju CCB019 da Universidade da Região de Joinville foi mantido sob refrigeração (4°C) em meio trigo-dextrose-agar (TDA)[14], com repiques trimestrais.

Cultivo em meio submerso

Foram preparados 400mL de pré-inóculo contendo meio POL[15](5,0 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 g/L de $MgSO_4.7H_2O$, 1,0 g/L K_2HPO_4, 2,0 g/L de extrato de levedura, 1,0 g/L de peptona de soja e 20g/L de glicose) previamente esterilizado. O frasco foi inoculado com todo conteúdo micelial de uma placa de Petri e incubado a 30°C, sob agitação de 120/minuto por seis dias. O cultivo foi conduzido em biorreator MD B.Braun contendo 4L de meio POL modificado[16] (2,5 g/Lde $(NH_4)_2SO_4$; 0,2 g/L de $MgSO_4.7H_2O$; 1,0 g/L de K_2HPO_4; 1,0 g/L de peptona; 1,0 g/L de $CaCO_3$ e 20 g/Lglicose) em processo descontínuo simples. Após adição do pré-inóculo, a temperatura foi mantida em 30°C, aeração em 250mL/min, sob agitação de 350 rpm e pH 4,0 controlado por adição automática de NaOH 6M e H_3PO_4 12N.O cultivo foi finalizado após 256 horas[16].

Extração e purificação da manogalactana

A extração e purificação da manogalactana foi realizada de acordo com Silveira *et al*[17]. A biomassa e o caldo obtidos do cultivo foram separados por filtração. A precipitação dos EPS foi realizada pela adição de etanol ao caldo de cultivo na proporção de 4:1 (v/v). O precipitado etanólico (extrato PE), após 24 horas sob refrigeração, foi separado do sobrenadante por centrifugação. Uma fração foi reservada e liofilizada para avaliação antitumoral e outra foi dialisada em membrana

de celulose 2kDa. O conteúdo retido na membrana de diálise foi concentrado em rotaevaporador e submetido ao processo de congelamento e descongelamento, a fim de promover a separação dos polissacarídeos insolúveis em água fria. Ao final do descongelamento, a solução foi centrifugada. O sobrenadante continha os polissacarídeos solúveis em água fria e o precipitado continha os polissacarídeos insolúveis. Ambas as frações foram congeladas novamente e o processo de gelo/degelo/centrifugação repetido até a não formação de precipitado ao final da centrifugação. A fração solúvel foi liofilizada e dialisada em membrana de celulose de 6-8 kDa. A fração retida pós-diálise (PEIsR) contém apenas manogalactana como polissacarídeo e foi liofilizada e utilizada para avaliação antitumoral.

Animais

Camundongos albinos machos *(Mus musculus*; 30 ± 5 g) adquiridos do Biotério da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), foram mantidos no Biotério da Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) com água e ração *ad libidum*, temperatura controlada em 22 ± 1°C, umidade relativa do ar em 60 ± 2 % e fotoperíodo de 12 horas durante todo período de estudo.

Tumor

As células de S180 foram obtidas da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) e mantidas por repiques intraperitoneais semanais de suspensão tumoral em camundongos. A indução tumoral foi realizada via subcutânea, no dorso dos animais dos grupos teste e controle positivo, utilizando líquido ascítico na concentração de 5 x 10^6 células/animal[18].

Avaliação da atividade antitumoral

O extrato PE e a manogalactana foram solubilizados em tampão fosfato (PBS 0,01M pH 7,0) na concentração de0,5 mg/mL para os grupos de animais testados na dose de 3,0 mg/kg de peso. Para as doses de 0,1 mg/kg e 1,0 mg/kg, as soluções

de manogalactana foram preparadas nas concentrações de 0,025 mg/mL e 0,25 mg/mL, respectivamente.

Os animais foram divididos em quatro grupos: (1) Grupos-Teste (n=10), com tumor e tratamento; (2) Controle Positivo (n=10) com tumor e sem tratamento; (3) Controle Substância (n=5), sem tumor e com tratamento; (4) Controle Negativo (n=5) sem tumor e sem tratamento. O tratamento consistiu em administração de 3,0 mg/kg de peso de PE ou 0,1, 1,0 e 3,0mg/kg de peso de manogalactana, em doses diárias durante 10 dias, por via intraperitoneal, começando 24 horas após a indução tumoral. Os camundongos dos controles negativo e positivo receberam uma dose diária de 3mg/kg de peso de PBS por 10 dias.

A avaliação do desenvolvimento tumoral foi realizada por determinação do volume tumoral (cm^3)[19], da massa (g) do tumor[20]e da taxa de inibição (%) obtida pela relação [(1-T/C)100], onde T é a média dos tumores dos grupos-teste e C é a média dos tumores do grupo controle positivo[21]. O volume do tumor foi determinado pela fórmula ($4/3\pi\ (a^2\ b)/2$), onde *a* é o diâmetro menor e *b* corresponde ao diâmetro maior, medidos com auxílio de um paquímetro.

Foram realizadas duas etapas de avaliação: (a) 4 grupos-teste (0,1, 1,0 e 3,0 mg/kg de manogalactana e 3,0mg/kg de extrato PE) e grupo controle positivo, avaliados 11 dias após a indução tumoral; (b) 2 grupos-teste (3,0mg/kg de manogalactana e 3,0 mg/kg de extrato PE) e grupo controle positivo analisados 21 dias após a indução do tumor.

Os experimentos tiveram aprovação prévia pelaComissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) daUniville (ofício no. 032/2013).

Análise estatística

Os dados foram analisados por meio de teste estatístico para rejeição de valores desviantes, Teste ‘Q’ de Dixon, com nível de confiança de 99%[22]e submetidos à análise de variância de valores médios (ANOVA), através do teste F, com nível de significância de 5%. A verificação das diferenças significativas entre médias foi realizada pelo teste t, com nível de significância de 5%.

Resultados

A figura 1 e 2 apresentam a massa tumoral média (g) e o volume tumoral médio (cm^3) dos animais dos grupos controle positivo e tratados com manogalactana (PEIsR) nas doses de 0,1, 1,0 e 3,0mg/kg e extrato (PE) na dose de 3,0mg/kg, avaliados 11 dias após a indução tumoral.

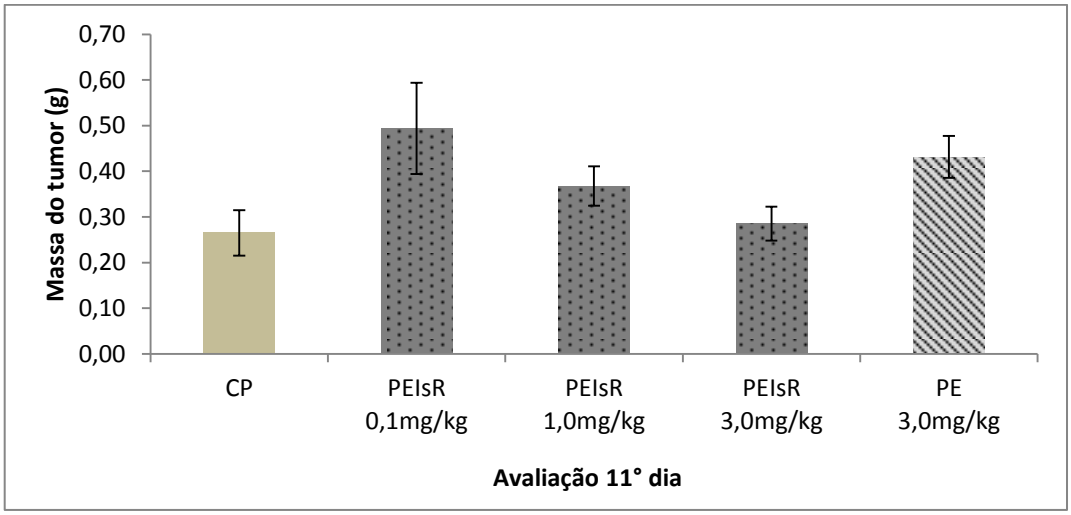

Figura 1 – Massa média e erro padrão (g) do tumor dos camundongos do grupo controle positivo (CP) e grupos teste tratados com manogalactana (PEIsR) e extrato (PE).

Os resultados mostram, que independentemente da dose utilizada no tratamento, a manogalactana não reduziu o desenvolvimento tumoral.

Pode-se observar na tabela 1, que não houve diferença significativa entre a massa do tumor dos animais do grupo 'controle positivo' e dos animais dos grupos tratados.

Tabela 1- Avaliação da Massa do Tumor (11 dias)

Grupo	*Dose (mg/kg)*	*Média (g)*	*F*	*F crítico*	*valor-P*
Controle Positivo		0,27			
Manogalactana	0,1	0,49			
Manogalactana	1,0	0,37	2,4425	2,588836	**0,061**
Manogalactana	3,0	0,29			
Extrato (PE)	3,0	0,43			

Com relação ao volume tumoral, a figura 2 indica que os grupos tratados com 0,1 mg/kg de manogalactana (PEIsR) e 3,0 mg/kg de extrato (PE) tiveram diferenças significativas em relação ao grupo controle positivo (demostrados na tabela 2), com volumes tumorais médios apresentando-se superiores ao volume médio do tumor do controle positivo.

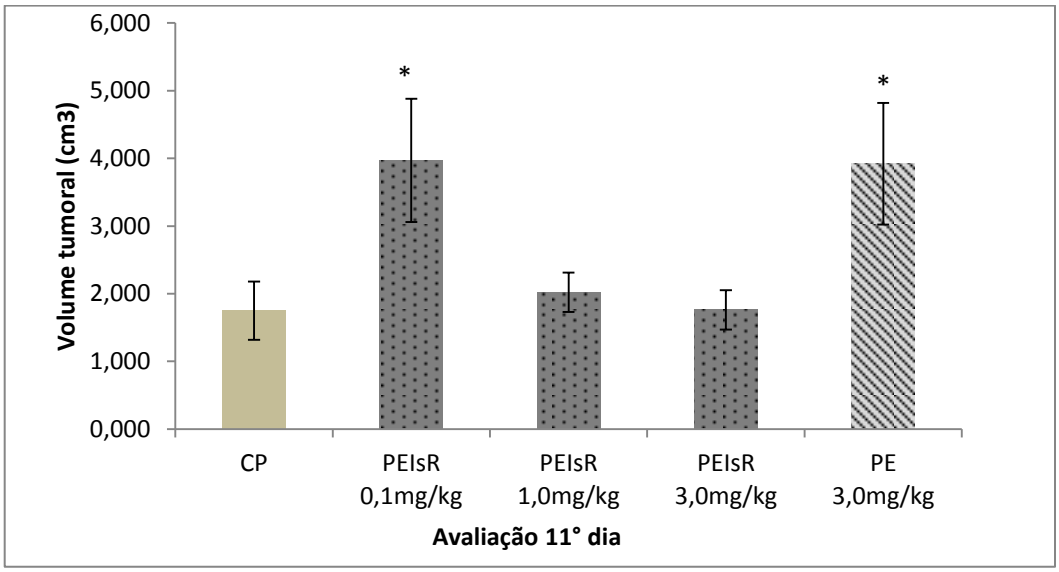

*Figura 2 – Volume médio e erro padrão (cm^3) do tumor dos camundongos do grupo controle positivo (CP) e grupos teste tratados com manogalactana (PEIsR) e extrato (PE). * representa a existência de diferença significativa em relação ao grupo controle.*

Tabela 2 - Avaliação do Volume Tumoral (11 dias)

Grupo	*Dose (mg/kg)*	*Média (cm3)*	*F*	*F crítico*	*valor-P*
Controle Positivo		1,75			
Manogalactana	0,1	3,97			
Manogalactana	1,0	2,02	3,2502	2,6100	**0,0202**
Manogalactana	3,0	1,76			
Extrato PE	3,0	3,92			

As figuras 3 e 4 apresentam a massa tumoral média (g) e o volume tumoral médio (cm^3) dos animais dos grupos controle positivo e tratados com manogalactana (PEIsR) e extrato (PE) na dose 3,0mg/kg avaliados 21 dias após a indução tumoral.

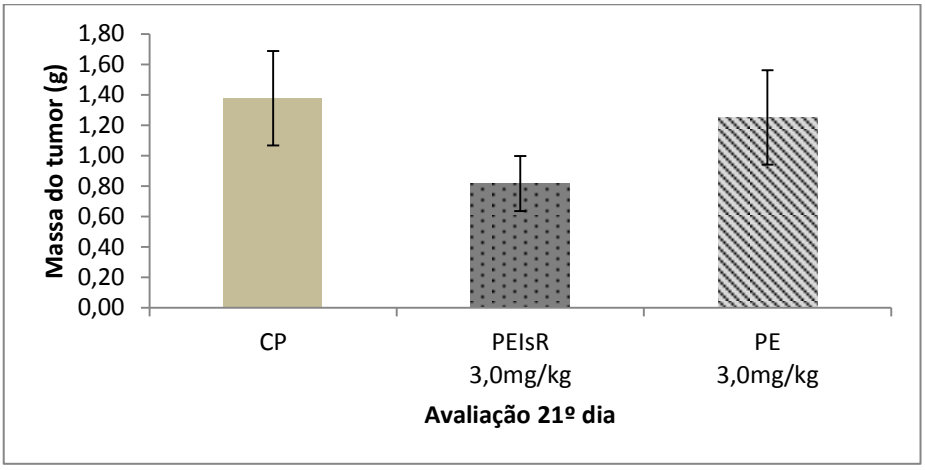

Figura 3 – Massa média e erro padrão (cm^3) do tumor dos camundongos do grupo controle positivo (CP) e grupos teste tratados com manogalactana (PEIsR) e extrato (PE).

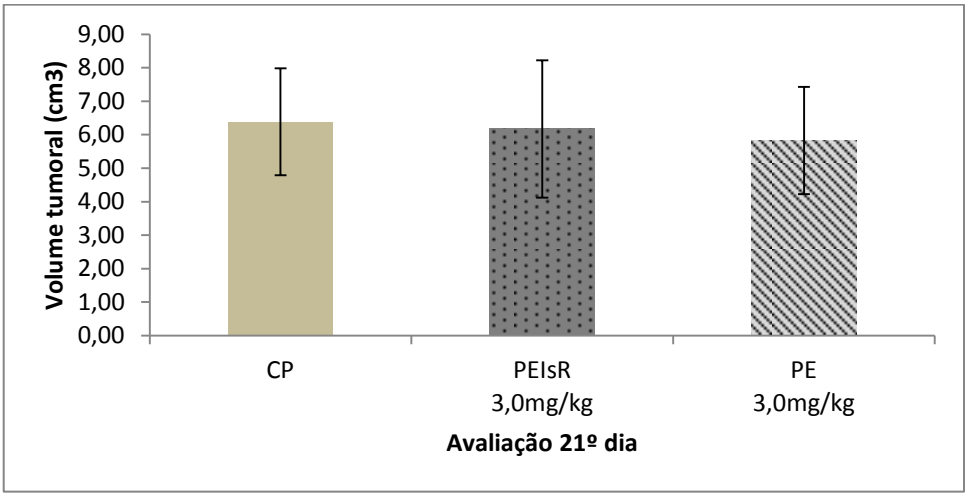

Figura 4 – Volume médio e erro padrão (cm^3) do tumor dos camundongos do grupo controle positivo (CP) e grupos teste tratados com manogalactana (PEIsR) e extrato (PE).

Para ambas as variáveis de desenvolvimento tumoral avaliadasapós 21 dias da indução do tumor, não houve diferenças significativas entre os grupos tratados e controle positivo, como se observa nas tabelas 3 e 4. Essa diferença também não foi observada entre os grupos.

Tabela 3 - Avaliação da Massa do Tumor (21 dias)

Grupo	*Dose (mg/kg)*	*Média*	*F*	*F crítico*	*valor-P*
Positivo		1,38			
Manogalactana	3,0	0,82	1,1670	3,354	**0,3265**
Extrato PE	3,0	1,25			

Tabela 4 - Avaliação do Volume Tumoral (21 dias)					
Grupo	*Dose (mg/kg)*	*Média (cm3)*	*F*	*F crítico*	*valor-P*
Positivo		6,39			
Manogalactana	3,0	6,17	0,0253	3,354	**0,975**
Extrato (PE)	3,0	5,83			

A figura 5 apresenta a taxa de inibição do crescimento do tumor dos animais tratados com 3,0mg/kg de manogalactana e extrato. As taxas de inibição foram calculadas em relação ao controle positivo a partir do volume e massa tumoral dos grupos teste.

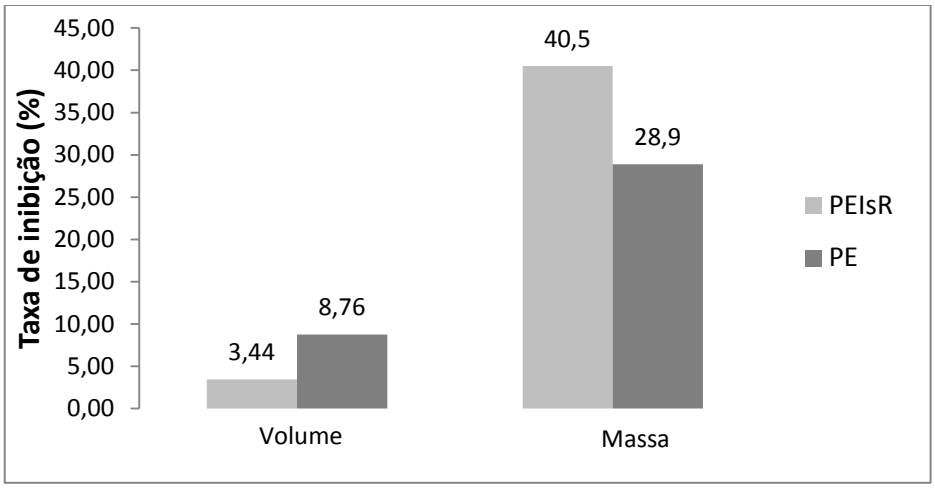

Figura 5 – Taxa de inibição (%) de crescimento tumoral com as doses de 3,0mg/kg de manogalactana (PEIsR) e 3,0mg/kg de extrato (PE1) em relação ao grupo controle positivo, considerando o volume e massa tumorais.

Foram observados valores de inibição do volume tumoral de 3,44 e 8,76%, após tratamento intraperitoneal por 10 dias de manogalactana e extrato, respectivamente, na avaliação 10 dias após o término do tratamento (21º dia a contar da indução tumoral). Em relação ao peso tumoral essa inibição foi de 40,5% para tratamento com manogalactana e 28,9% para tratamento com extrato, porém, apesar dessas taxas serem numericamente relevantes, as médias relativas aos pesos tumorais dos grupos a partir dos quais estas inibições foram calculadas, não apresentavam diferenças significativas.

Discussão

As atividades antitumorais de diversos extratos ou frações de extratos de polissacarídicos fúngicos foram descritas por diversos autores nos últimos anos[4,6,7].

No presente estudo, o extrato (PE) não apresentou efeito antitumoral significativo quando avaliado após 21 dias da indução tumoral e esse resultado diverge de outros encontrados na literatura. Dalonso *et al*.[6] testaram 4 frações de *Pleurotus sajor-caju* oriundas de corpos frutíferos, com duas delas (FI e FII) apresentando redução de 86 e 85% no número de células neoplásicas de Tumor ascítico de Erlich acumuladas no líquido ascítico. Cha *et al*.[4] verificaram efeito anticâncer em frações extraídas de *Pleurotus nebrodensis* frente ao S180, em camundongos tratados com 20mg/kg por 10 dias, onde o tempo de sobrevida dos animais aumentou até 27%.

Outros autores também utilizaram extratos para avaliação da atividade antitumoral. Em 2013, estudo de Borges *et al*. avaliou extrato de cultura submersa de *Pleurotus djamour* frente ao S180 tratado com 30mg/kg por 10 dias via intraperitoneal, que resultou em taxa de inibição tumoral de 94%[23]. Assis *et al*.[7] avaliaram extrato de caldo de cultivo de *Pleurotus-sajor caju*, usando a mesma metodologia deste estudo, com resultados antitumorais significativos para as doses de 3, 10, 30 e 100mg/kg sem diferenças significativas entre as taxas de inibição do tumor das doses utilizadas nos grupos, tendo o presente experimento optado por utilizar 3,0mg/kg de extrato PE, cuja taxa de inibição foi de 86%.

Ao longo do tempo, a purificação e elucidação das estruturas contidas nos extratos, bem como a avaliação de efeitos imunobiológicos, têm contribuído para o melhor entendimento dos mecanismos da atividade antitumoral desses compostos.[13].

Kong *et al*[24]. testaram polissacarídeo (WPOP-N1) de *Pleurotus ostreatus* e observaram uma taxa de inibição de 63% no crescimento de S180, em animais tratados via oral com 400mg/kg, bem como aumento no nível de secreção de TNF-α no soro de camundongos. Esse mesmo estudo observou aumento na capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais quando tratados com o polissacarídeo.

Um estudo de 2013, que utilizou a mesma metodologia de produção de EPS e purificação da manogalactana deste trabalho, testou sua atividade antinociceptiva

nas doses de 0,1, 0,3, 1,0 e 3,0mg/kg, pelo teste de contorsão abdominal e teste de edema de pata induzido por carragenina. Os resultados mostraram uma inibição de 54,2% na dose de 0,1mg/kg da nocicepção e efeito antiedematogênico de 70%, concluindo que a fração PEIsR é capaz de modular a síntese de mediadores inflamatórios[16]. Este mesmo estudo serviu de base para as doses de manogalactana que foram utilizadas para o efeito antitumoral no presente estudo.

Uma manogalactana de extrato semi-purificado de *Agaricus bisporus* estimulou a produção das citocinas monocíticas pró-inflamatórias IL-1β e TNF-α[25] e outra isolada de corpos frutíferos de *pfle* (cogumelo híbrido) mostrou significativa ativação de macrófagos, timócitos e esplenócitos, sugerindo que este heteropolissacarídeo possa ser usado como modificador da resposta biológica[9].

Com relação ao efeito antitumoral, até o presente momento não foram encontrados estudos com a manogalactana isolada. Jeff *et al*[26]observaram efeito antitumoral contra o S180 *in vitro* de duas manogalactoglucanas de *Lentinus edodes*. Este estudo citado acimasugere que as manogalactoglucanas devam ser exploradas como agentes antitumorais e utilizados na indústria como inibidores do crescimento tumoral.

No presente estudo, o polissacarídeo purificado manogalactana, não apresentou efeito antitumoral significativo em nenhuma condição avaliada, o que pode ter relação com a ausência da associação do polissacarídeo com proteínas. A purificação do polissacarídeo pode levar à perda da imunogenicidade do composto, uma vez que proteínas são mais imunogênicas que carboidratos. As taxas de inibição do S180 observadas em grupos tratados com extratos ou polissacarídeos combinados à proteína são maiores se comparados às substâncias purificadas. Um estudo de Zhuang *et al*.[27] testou uma fração de *Pleurotus sajor-caju* contendo manogalactana associada à proteína (FA-2) que apresentou 74,6% de inibição do S180. Em outro estudo, Jeff *et al*.[13] trataram camundongos inoculados com S180 por 10 dias, uma vez ao dia por via intragástrica, com 100mg/kg de LE-MGG, uma manogalactoglucana purificada oriunda de corpos frutíferos de *Lentinus edodes* e na avaliação após 21 dias encontraram taxa de inibição do crescimento tumoral de 45,9%.Além disso, o aumento da dose para tratamento com a manogalactana poderia ter sido necessárianeste estudo para evidenciar um possível efeito antitumoral.

Observou-se também, uma grande discrepância entre os resultados obtidos no presente estudo e outros relatos da literatura, no que diz respeito ao crescimento do Sarcoma 180 no grupo controle positivo, tendo estes últimos, médias de massa e volume tumorais bastante superiores.Estes achados podem sugerir que a impossibilidade de demonstração de inibição tumoral pela manogalactana purificada, neste estudo, esteja relacionada a um comportamento biológico tumoral menos agressivo.

Tabela 5 – Valores médios de massa e volume do tumor e intervalo de tempo entre a indução do Sarcoma 180 e a avaliação de diferentes grupos controle positivo.

Autores	*Massa(g) e desvio/erro padrão*	*Volume (cm3)*	*Tempo (dias)*
Assis *et al*., 2013	17*	75*	21
Kong *et al*., 2014	3,71± 0,81	-	28
Borges *et al*., 2013	6,64± 1,19	35,3± 12,16	21
Zhuang *et al*., 1993	-	18,98 ± 8,74 20,7 ± 4,10	21
Este estudo	0,265± 0,05	1,75± 0,43	11
Este estudo	1,38± 0,31	6,39± 1,60	21

**Valores de desvio padrão não apresentados*

Esta disparidade poderia estar relacionada ao processo de manutenção prévia do tumor (*in vivo* ou *in vitro)*, informação que não é evidenciada nos artigos, bem como estar associada à própria natureza e comportamento deste tipo específico de tumor.Outra possibilidadeseria a imunoedição do câncer, conceito que caracteriza a dualidade do sistema imune em desempenhar duplo papel, podendo suprimir o crescimento ou promover progressão do tumor de acordo com a adaptação das células no microambiente tumoral, o que leva a tumores similares tornarem-se mais ou menos imunogênicos dependendo do hospedeiro e do sistema imune [28].

Apesar disso, não é possível descartar a inexistência de fato da atividade antitumoral da manogalactana purificada, considerando que os resultados obtidos na

etapa de avaliação após 11 dias da indução tumroral, o efeito significativo foi de aumento do volume do tumor nos grupos testes.

Como perspectiva futura, uma abordagem molecular para avaliação de citocinas, por exemplo, poderia ajudar a elucidar o mecanismode relação entre a manogalactana, o sistema imune e o tumor, melhorando a compreensão e avaliação do efeito deste polissacarídeo sob o tumor.

Conclui-se que, como não foi possível demonstrar no presente estudoa ação antitumoral da manogalactana sobre o Sarcoma 180, novas pesquisas serão necessárias para elucidar o potencial deste polissacarídeo como elemento terapêutico em casos de neoplasias malignas.

Referências

1 KOMURA, D.; RUTHES, A.; CARBONERO, E; GORIN, P.; IACOMINI, M. Water-soluble polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* var. *florida* mycelial biomass. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.70, p. 354-359, 2014.

2 ZONG, A.; CAO, H.; WANG, F. Anticancer polysaccharides from natural resources: a review of recente research. **Carbohydrte Polymers**, v. 90, p.1395-1410, 2012.

3 OMS -Organização Mundial da Saúde. Disponível em<http://www.who.int/countries/bra/es/>. Acesso em 10 de outubro de 2014.

4 CHA. Y.; ALAM, N.; LEE, J. *et al*. Anticancer and immunopotentianting activities of crude polysaccharides from *Pleurotus nebrodensis* on mouse sarcoma 180. **Mycology**, v.40, p. 236-243, 2012.

5 ZHANG, M. CUI, S.W.; CHEUNG, P.; WANG, Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. Trends in food Science, v.18, p. 4-19, 2007.

6 DALONSO, N.; SOUZA, R.; SILVEIRA, M. L.; RUZZA, A. A.; WAGNER, T. M.; WISBECK, E.; FURLAN, S. A. Characterization and antineoplasic effect of extracts obtained from *Pleurotus sajor-caju* fruiting bodies**.** **Appl Biochemestry and Biotechnology**, v.160, n.8, p.2265-2274, Apr., 2010.

7 ASSIS, I.; CHAVES, M.B.; SILVEIRA, M.L.L.; GERN, R.M.M.; et al. Production of bioactive compounds with antitumor activity agaisnt sarcoma 180 by *Pleutorus sajor-caju*. **Journal of Medicine Food**, v. 16, p. 1004-1012, 2013.

8 FACCHINI, J.M.; ALVES, E.; AGUILERA, C. *et al*. Antitumor activity of *Pleurotus ostreatus* polysaccharide fractions onEhrlich tumor and Sarcoma 180. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 68, p. 72-77, 2014.

9 MAITY, P.; PATTANAYAK, M. MAITY, S. *et al*. A partially methylated mannogalactan from hybrid mushroom *pfle 1p*: purification, structural characterization and study of immunoactivation. **Carbohydrate Research**, v. 395, p. 1-8, 2014.

10 ROSADO, F.R. CARBONERO, E.R.; CLAUDINO, R.F. *et a*l. The presence of patially 3-O- methylated mannogalactan from the fruit bodies of edible basidiomycetes *Pleurotus ostreatus 'florida'* Berk. and *Pleurotus ostretoroseus* Sing. **FEMS Microbiology Letters**, v.221, p. 119-124, 2003.

11 ZHANG, A.; XU, M.; FU, L.; SUN, P. Structural elucidation of a novel mannogalactan isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus geesteranus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 236-240, 2013.

12 SUN, Y.; LIU, J. Purification, structure and immunobiological activity of a water-soluble polysaccharide from the fruiting body of *Pleurotus ostreatus.***Bioresource Technology**, v. 100, p. 983–986, 2009.

13 JEFF, I.; LI, S.; PENG, X. KASSIM, R.; LIU, B.; ZHOU, Y. Purification, strctural elucidation and antitumor activity of a novel mannogalactoglucan from the fruiting bodies of *Lentinus edodes*. **Fitoterapia**, v. 84, p. 338-346, 2013.

14 FURLAN, S.A., VIRMOND, L.J., MIERS, D.A., BONATTI, M., GERN, R.M.M., JONAS, R. Mushroom strains able to grow at high temperatures and low pH values. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, p. 689-692, 1997.

15 CAVAZZONI, V., ADAMI, A. Exopolysaccharides produced by mycelial edible muschrooms. **Italian Journal of Food Science**, v. 1, p. 9- 15, 1992.

16 AGOSTINI, Franciane. **Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva de uma fração purificada de polissacarídeos de *Pleurotus sajor-caju*.** Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente), Universidade da região de Joinville, 2013.

17 SILVEIRA, M. L. L.; SMIDERLE, F. R.; AGOSTINI, F. *et al*. Exopolysaccharide produced by *Pleurotus sajor-caju*: its chemical structure and anti-inflammatory activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 90-96, 2015.

18 MATSUZAKI, P., AKISUE, G., OLORIS, S.C.S., GÓRNIAK , S., DAGLI, M.L.Z. Effect of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on the Ehrlich tumor in its ascitic form. **Life Sciences**, v. 74, p. 573- 579, 2003.

19 AJITH, T.A.,JANARDHANAN, K.K. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 157-162, 2003.

20 MISAKI, A., KAWAGUCHI, K., MIYAJI, H., NAGAE, H., HOKKOKUS,S., KAKUTA, M., SASAKI, T. Struture of pestalotan, a highly branched (1-3)-□-D-Glucan elaborated by *Pestalotia sp*. 815, and the enhancement of its antitumor activity by polyol modification of the side chains. **Carbohydrated Research**, v. 129, p. 209-227, 1984.

21 LEE, Y., KIM, H., LEE, M., KIM, J., HAN, J., HONG, E., KWON, M., LEE, M. Oral Administracion of *Agaricus blazei* (H1 Strain) inhibited tumor growth in sarcoma 180 inoculation model. **Experimental Animals**, v. 52, p. 371-375, 2003.

22 RORABACHER, D.B. Statistical treatment for rejection of deviant values: critical values of Dioxon‟s "Q" parameter and related sub range rations at the 95% confidence level.**Analytical Chemistry**, v. 63, n. 2, p. 139-146, 1991.

23 BORGES, G.M.; BARBA, F.F.M.; SCHIEBELBEIN, A.P.; et al. Extracellular polysaccharide production by a strain of *Pleurotus djamour* isolated in the South of Brazil and antitumor activity on Sarcoma 180. **Brazilian Journal f Microbiology**, v.44, n.4, p 1059-1065, 2013.

24 KONG, F.; LI, F.; HE, Z.; JIANG,Y. SUN, X.,TONG, H. Antitumor and macrophage activation induce by álcali-extracted polysaccharide from *Pleurotus ostreatus.***International Journal of Biologica Macromolecules**, v.69, p 561-566, 2014.

25 SMIDERLE, F.R.; RUTHES, A. ARKEL, J. et al. Polysaccharides from *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* show similarities in their structures and their immunomodulatory effects on human monocytic THP-1 cells. **BMC Complementary & Alterntive Medicine**, v. 11, p.58, 2011.

26 JEFF, I.B.; YUAN, X.; SUN, L. Purification and *in vitro* anti-proliferative effect of novel neutral polysaccharides from *Lentinus edodes*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.52, p. 96-106, 2013.

27 ZHUANG, C., MIZUNO, T., SHIMADA, A., ITO, H., SUZUKI, C., MAYUZUMI, Y., OKAMOTO, H., MA, Y., LI, J. Antitumor protein-containing polysaccharides from a chinese mushroom fengweingu or houbitake, *Pleurotus sajor-caju (Fr.) sings*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemestry**, v. 57, p. 901-906, 1993.

28SCHREIBER, R.D.; OLD, L.J.; SMYTH, M.J. Cancer immunoediting: integrating immunity´s roles in cancer supression and promotion.**Science**, v.331, p.1565, 2011.

6 CONCLUSÃO

Não foi possível demonstrar, no presente estudo, a atividade antitumoral da manogalactana purificada de caldo de cultivo de *Pleurotus sajor-caju*no tratamento do Sarcoma 180 *in vivo*. Consequentemente, também não foipossível determinar a dose mais eficiente de manogalactana para diminuição do desenvolvimento tumoral.

Os resultados significativos para efeito antitumoral descritos na literatura através da administração doextrato de caldo de cultivo (PE) de *Pleurotus sajor-caju* também não foram reproduzidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elservier, 2012. 539p.

AGOSTINI, Franciane. **Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva de uma fração purificada de polissacarídeos de *Pleurotus sajor-caju*.** Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente), Universidade da região de Joinville, 2013.

AJITH, T.A.,JANARDHANAN, K.K. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 157-162, 2003.

ALMEIDA, José Ricardo Chamhun. **Farmacêuticos em oncologia: uma nova realidade**. São Paulo: Atheneu, 2004. 358p.

ANESTAKIS, D.; PETANIDIS, S.; KALYVAS, S. *et al*. Mechanims and applications of interleukins in câncer immunotherapy**. International Journal of Molecular Sciences**, v.16, p. 1691-1710, 2015.

ASSIS, I.; CHAVES, M.B.; SILVEIRA, M.L.L.; GERN, R.M.M.; et al. Production of bioactive compounds with antitumor activity agaisnt sarcoma 180 by *Pleutorus sajor-caju*. **Journal of Medicine Food**, v. 16, p. 1004-1012, 2013.

BARBA, Fabiana Figueredo Molin de. **Estudo da atividade antitumoral de substâncias bioativas de *Pleurotus djamour* sobre Sarcoma 180 *in vivo*.** Dissertação (Mestrado em saúde e meio ambiente), Universidade da região de Joinville, 2010.

BONATTI, M. Estudo da composição de cogumelos das espécies Pleurotus ostreatus e Pleurotus sajor-caju cultivados em palhade bananeira. **Revista saúde e meio ambiente**, v.4, p.31-35, 2002.

BORCHERS, A.; KEEN, C.; GERSHWIN, E. Mushrooms, Tumors and Immunity: an update. **Experimental Biology and Medicine**, v.229, p. 393-406, 2004.

BRENTANI, M.M., COELHO, F.R.G., KOWALSKI, L.P. **Bases de oncologia**. 2 ed. São Paulo: Tecmed, 2006. 452p.

BUCCHI, D.F. **Efeitos do medicamento homeopático: Método Canova em camundongos normais e portadores do tumor Sarcoma 180.** Dissertação (mestrado em Biologia Celular) Universidade Federal do Paraná. 132 p. Curitiba, 2002.

BURKHOLDER, B.; HUANG, R.; BURGESS, R. *et al*. Tumor-induced perturbations of cytokines and imune cell networks. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1845, p. 182-201, 2014.

CARBONERO, E.R.; GRACHER, A.H.; SMIDERLE, F.R. *et al.* A β-glucan from de fruit bodies od edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. **Carbohydrate Polymers,** v.66, p. 252-257, 2006.

CARLILE, M.; WATKINSON, S. **The Fungi**. San Diego: Academic Press, 1994.

CAVAZZONI, V., ADAMI, A. Exopolysaccharides produced by mycelial edible muschrooms. **Italian Journal of Food Science**, v. 1, p. 9- 15, 1992.

CHA. Y.; ALAM, N.; LEE, J. *et al*. Anticancer and immunopotentianting activities of crude polysaccharides from *Pleurotus nebrodensis* on mouse sarcoma 180. **Mycology**, v.40, p. 236-243, 2012.

CHAVES, Mariane Bonati. **Estudo de diferentes formas de condução do processo de produção de polissacarídeos extracelulares por *Pleurotus spp.*** Tese (Doutorado em engenharia química), Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

CORTHAY, A. Does the imune system naturally protect against câncer? **Frontiers in immunology**, v. 5, 2014.

CRUZ-MERINO,L.; GRANDE-PULIDO, E.;TAMARIT-ALBERO, A. Cancer and imune resposnse: old and new evidence for future challenges.**The oncologist**, v.13, p. 1246-1254, 2008.

DALONSO, N.; SOUZA, R.; SILVEIRA, M. L.; RUZZA, A. A.; WAGNER, T. M.; WISBECK, E.; FURLAN, S. A. Characterization and antineoplasic effect of extracts obtained from *Pleurotus sajor-caju* fruiting bodies**. Appl Biochemestry and Biotechnology**, v.160, n.8, p.2265-2274, Apr., 2010.

DISIS, M. Mechanism of action of immunotherapy. **Seminars in oncology**, v.41, n.5, p. S3- S13, 2014.

EL ENSHASY,H.; HATTI-KAUL, R. Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications. **Trends in Biotechnology**, v.31, p.668-677, 2013.

FACCHINI, J.M.; ALVES, E.; AGUILERA, C. *et al*.Antitumor activity of *Pleurotus ostreatus* polysaccharide fractions onEhrlich tumor and Sarcoma 180. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 68, p. 72-77, 2014.

FAUCI, A.; Braunwald, E.; Isselbacher, K.; Wilson, J.; Martin, J.; Kasper, D.; Hauser, S.; Longo, D. **Harison Medicina Interna**. 14. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 1998. 3066 p.

FURLAN, S.A., VIRMOND, L.J., MIERS, D.A., BONATTI, M., GERN, R.M.M., JONAS, R. Mushroom strains able to grow at high temperatures and low pH values. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, p. 689-692, 1997.

FURLAN, S.A.; GERN, R.M.M.; WISBECK, B. *et al*. Possibilities of *Pleurotus* applications in food, health and environmental technologies. **Bioprocesses in Food Industry**, p.482-495, 2008.

GATES, R.A.;FINK, R.M. **Segredos em enfermagem oncológica**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 652p.

INCA – Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro: Ministério da saúde, 2011.

INCA – Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Disponível em <www.inca.gov.br>. Acesso em 13 de setembro de 2014.

JEFF, I.; LI, S.; PENG, X. KASSIM, R.; LIU, B.; ZHOU, Y. Purification, strctural elucidation and antitumor activity of a novel mannogalactoglucan from the fruiting bodies of *Lentinus edodes*. **Fitoterapia**, v. 84, p. 338-346, 2013.

JEFF, I.B.; YUAN, X.; SUN, L. Purification and *in vitro* anti-proliferative effect of novel neutral polysaccharides from *Lentinus edodes*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.52, p. 96-106, 2013.

KOMURA, D.; RUTHES, A.; CARBONERO, E; GORIN, P.; IACOMINI, M. Water-soluble polysaccharides from Pleurotus ostreatus var. florida mycelial biomass. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.70, p. 354-359, 2014.

KURASHIGE, S., MITSUHASHI, S. Macrophage activities in sarcoma 180 bearing mice and EL4 bearing mice. **Gann Gan**, v. 73, p. 85- 90, 1982.

LEAL, Fábio. Medicina complementar e alternativa: uma prática comum entre os pacientes. **Revista Associação de Medicina Brasileira**, 2008.

LEE, Y., KIM, H., LEE, M., KIM, J., HAN, J., HONG, E., KWON, M., LEE, M. Oral Administracion of Agaricus blazei (H1 Strain) inhibited tumor growth in sarcoma 180 inoculation model. **Experimental Animals**, v. 52, p. 371-375, 2003.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.; COX, M. **Princípios de bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 839p.

LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T; JULICH, W. The Pharmacological potencial of mushrooms. **eCAM**, v. 2, p.285-299, 2005.

MAITY, P.; PATTANAYAK, M. MAITY, S. *et al*. A partially methylated mannogalactan from hybrid mushroom *pfle 1p*: purification, structural characterization and study of immunoactivation. **Carbohydrate Research**, v. 395, p. 1-8, 2014.

MATSUZAKI, P., AKISUE, G., OLORIS, S.C.S., GÓRNIAK , S., DAGLI, M.L.Z. Effect of Pfaffia paniculata (Brazilian ginseng) on the Ehrlich tumor in its ascitic form. **Life Sciences**, v. 74, p. 573- 579, 2003.

MISAKI, A., KAWAGUCHI, K., MIYAJI, H., NAGAE, H., HOKKOKUS,S., KAKUTA, M., SASAKI, T. Struture of pestalotan, a highly branched (1-3)-□-D-Glucan elaborated by *Pestalotia sp*. 815, and the enhancement of its antitumor activity by polyol modification of the side chains. **Carbohydrated Research**, v. 129, p. 209-227, 1984.

NING, X.; LUO, Q.; LI, C. Inhibitory Effects of a Polysaccharide Extract from the Chaga Medicinal Mushroom, *Inonotus obliquus*(Higher Basidiomycetes), on the Proliferation of Human Neurogliocytoma Cells. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 16, p. 29–36, 2014.

OMS-Organização Mundial da Saúde. Disponível em <http://www.who.int/countries/bra/es/>. Acesso em 10 de outubro de 2014.

PAHO – Pan American Health Organization. Disponível em <www.paho.org>. Acesso em 14 de outubro de 2014.

PANDOLFI, F.; PAGLIARI, D.; CIANCI, R. *et al.* The imune response to tumors as a tool toward immunotherapy. **Clinical and Developmental Immnunology**, p.12, 2011.

POLLOK, Raphael. **Manual de oncologia clínica da UICC**. 8.ed. São Paulo: Willy, 2006.

ROMAGNOLI, G.G.; ZELANTE, B.B.; TONIOLO, P.A. et al. Dendritic cell-derived exosomes may be a tool for câncer immunotherapy by converting tumor cells into immunogenic targets. **Frontiers in immunology**, v. 05, 2015

RORABACHER, D.B. Statistical treatment for rejection of deviant values: critical values of Dioxon‟s “Q” parameter and related sub range rations at the 95% confidence level.**Analytical Chemistry**, v. 63, n. 2, p. 139-146, 1991.

ROSADO, F.R.; CARBONERO, E.R.; KEMMELMEIER, C. *et al*. A partially 3-O-methylated (1→4) linked α-D-galactan and α-D-mannan from *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. **FEMS Microbiology Letters**, v. 212, p.261-265, 2002.

ROSADO, F.R. CARBONERO, E.R.; CLAUDINO, R.F. *et a*l. The presence of patially 3-O- methylated mannogalactan from the fruit bodies of edible basidiomycetes *Pleurotus ostreatus ‘florida’* Berk. and *Pleurotus ostretoroseus* Sing. **FEMS Microbiology Letters**, v.221, p. 119-124, 2003.

ROSS, I. K. Fungal cell walls. **Encyclopedia of life sciences**, 2001.

SHIM, S.M.; LEE, J.S.; LEE, T.;LEE, Y. Antitumor and Immunostimulating activities of Elfvigia applanata hot water extract onsarcoma 180 tumor-bearing ICR mice. **Mycobiology,** v.40, p. 47-52, 2012.

SILVA, Daniel. Medicinal mushrooms Phellinus linteus as an alternative cancer therapy (review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, v.1, p. 407-411, 2010.

SILVA, Penildon. **Farmacologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2002. 1374p.

SILVEIRA, M.L.L.; SMIDERLE, F.R.; MORAES, C.P; BORATO, D. et al. Structural characterization ans anti-inflammatory of a linear β-D-glucan isolated from *Pleurotus sajor-caju*. **Carbohydrate Polymers,** v. 113, p. 588-596, 2014.

SILVEIRA, M. L. L.; SMIDERLE, F. R.; AGOSTINI, F. *et al*. Exopolysaccharide produced by *Pleurotus sajor-caju*: its chemical structure and anti-inflammatory activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 90-96, 2015.

SMIDERLE, F.R.; OLSEN, L.M.; CARBONERO, E.R.; MAICON, R.; BAGGIO, C.S.; IACOMINI, M. A 3-O-methylated mannogalactan from *Pleurotus pulmonarius*: Structureand antinociceptive effect. **Phytochemistry**, v. 69, n. 15, p. 2731-2736, 2008.

SMIDERLE, F.R.; RUTHES, A. ARKEL, J. et al. Polysaccharides from *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* show similarities in their structures and their immunomodulatory effects on human monocytic THP-1 cells. **BMC Complementary & Alterntive Medicine**, v. 11, p.58, 2011.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Patologia**. São Paulo: Manole, 1998. 535p.

SUN, Y.; LIU, J. Purification, structure and immunobiological activity of a water-soluble polysaccharide from the fruiting body of *Pleurotus ostreatus.***Bioresource Technology**, v. 100, p. 983–986, 2009.

TRABULSI, Luiz Rachid. **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 586p.

VAZ, A. TAKEI, K.; BUENO, E. **Imunoensaios: fundamentos e aplicações.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 372p.

WHO – World Health Organization. Disponível em <www.who.int>.Acesso em 10 de outubro de 2014.

WISBECK, E. **Estudo do cultivo submerso de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 para a produção de biomassa e exopolissacarídeos**. 2003. 175 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

WORKMAN, P.; ABOAGYE, E. O.; BALKWILL, F.; BALMAIN, A. et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. **British Journal of Cancer,** v. 102, p. 1555 – 1577, 2010.

YANG, A.; XU, J.; FU, Q. et al. Antitumor activity of a polysaccharide from *Pleurotus eryngii* on mice bearing renal câncer. **Carbohydrate Polymers**, v.95, p. 615-620, 2013.

ZHANG, M. CUI, S.W.; CHEUNG, P.; WANG, Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. Trends in food Science, v.18, p. 4-19, 2007.

ZHANG, A.; XU, M.; FU, L.; SUN, P. Structural elucidation of a novel mannogalactan isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus geesteranus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 236-240, 2013.

ZHUANG, C., MIZUNO, T., SHIMADA, A., ITO, H., SUZUKI, C., MAYUZUMI, Y., OKAMOTO, H., MA, Y., LI, J. Antitumor protein-containing polysaccharides from a chinese mushroom fengweingu or houbitake, Pleurotus sajor-caju (Fr.) sings. **Bioscience, Biotechnology and Biochemestry**, v. 57, p. 901-906, 1993.

ZONG, A.; CAO, H.; WANG, F. Anticancer polysaccharides from natural resources: a review of recente research. **Carbohydrte Polymers**, v. 90, p.1395-1410, 2012.

ZUCKERBERG, C. Ultraestrutura of Sarcoma 180. **Cancer Res**., v. 33, p. 2278-2282, 1973.

ANEXOS