

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIEL DE LIMA BELLAN

AVALIAÇÃO “IN VITRO” DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE POLISSACARÍDEO
OBTIDO DA ESPÉCIE *Lentinus edodes*

CURITIBA

2013

DANIEL DE LIMA BELLAN

AVALIAÇÃO “IN VITRO” DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE POLISSACARÍDEO
OBTIDO DA ESPÉCIE *Lentinus edodes*

Monografia apresentada à disciplina Estágio
Em Biologia como requisito parcial à
conclusão do curso Ciências Biológicas,
Modalidade Bacharelado, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná

Orientadora: Prof^a Dra. Célia Regina
Cavichiolo Franco

Coorientador: Prof^o Dr. Edvaldo da Silva
Trindade

CURITIBA

2013

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas tiveram papel fundamental para que esta monografia fosse escrita e concluída.

Primeiramente agradeço a minha família pelo apoio dado ao longo de toda a faculdade. A distância que nos separa é grande, e a saudade é maior ainda, mas o amor que sinto por vocês e de vocês me dá forças para continuar trilhando meu caminho.

Agradeço a minha namorada pela paciência, amizade, conforto nas horas difíceis e pelo amor.

A Stellee Marcela Petris Biscaia, por toda a ajuda, ensinamentos e amizade ao longo desses três anos de convívio. Tenho orgulho por trabalhar ao lado de alguém de tamanha dedicação ao que faz como você.

A minha orientadora e mãe científica, Célia Regina Cavichiolo Franco, por toda sua sabedoria, incentivo, conselhos e alegria que carrega consigo e transmite para todos que têm a sorte de conviver com ela.

A meu co-orientador, Edvaldo da Silva Trindade, pelo incentivo, conselhos e ajuda.

Aos amigos de laboratório, tanto aos que continuam como aos que já não estão mais lá. Agradeço a amizade, ajuda e aos momentos de descontração que passamos juntos.

Aos amigos, os de faculdade e os anteriores a ela. André, Bruna Karla, Bruna Soley, Emanuel, Izabela e Laura. Obrigado por serem parte tão importante da minha vida.

Aos bons professores dos quais adquiri conhecimento ao longo desses anos.

Agradeço ao CNPq pelo financiamento do projeto.

Agradeço à Universidade Federal do Paraná, por permitir a passagem pelos melhores anos da minha vida.

E por fim, a todos que de alguma forma fizeram parte desses anos universitários e ajudaram a me tornar uma pessoa melhor.

“Até mais, e obrigado pelos peixes.”

- Douglas Adams

Sumário

RESUMO	V
ABSTRACT	VI
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. MÉTODOS	16
3.1 CULTIVO CELULAR	16
3.2 POLISSACARÍDEO	17
3.3 VIABILIDADE CELULAR – VERMELHO NEUTRO	17
3.4 CITOTOXICIDADE CELULAR – MTT	18
3.5 PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	18
3.6 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	19
3.7 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO	19
4. RESULTADOS.....	21
4.1 CITOTOXICIDADE CELULAR – MTT	21
4.2 VIABILIDADE CELULAR – VERMELHO NEUTRO	22
4.3 PROLIFERAÇÃO CELULAR POR CRISTAL VIOLETA	22
4.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	23
4.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL EMPREGANDO-SE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	24
6. CONCLUSÕES	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

RESUMO

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que possuem em comum sua origem a partir da perda do controle do ciclo celular, resultado de mutações que se somam nos estágios iniciais do tumor. É considerado atualmente um problema de saúde mundial, com registro de mais de 12,4 milhões de novos casos em 2008, resultando em aproximadamente 7,6 milhões de óbitos. De 80% a 90% dos casos de câncer têm origem a partir de fatores sociocomportamentais, como alto consumo de gorduras, falta de atividade física, ingestão de álcool, uso de tabaco, obesidade, exposição excessiva ao sol e interações sociais e culturais. Nas três últimas décadas o câncer vem alterando o perfil epidemiológico do Brasil. Atualmente é a segunda maior causa de mortes da população brasileira, com previsão do aparecimento de 489 mil novos casos em 2011. A remoção cirúrgica, a radioterapia e a quimioterapia são os tratamentos mais usuais contra o câncer, tendo, porém uma enorme quantidade de efeitos colaterais. Tendo isso em vista, é crescente o interesse na busca de tratamentos utilizando compostos naturais contra a doença, os quais possuem diversos relatos na literatura de efeitos imunomoduladores e antitumorais. O presente trabalho buscou avaliar o potencial biológico de uma beta-glucana extraída do fungo *Lentinus edodes*, composto aqui denominado de P4, utilizando para isso ensaios *in vitro* com a linhagem celular B16F10 (melanoma murino). Os experimentos foram realizados com diferentes concentrações e tempos de tratamento. O ensaio de MTT analisa citotoxicidade celular através da ação da desidrogenase mitocondrial, a qual converte um composto salino (MTT) em cristais de formazan; após o tratamento com o polissacarídeo em estudo, evidenciou-se que este não causa citotoxicidade celular nenhuma das concentrações e tempo analisados. Pelo método de Vermelho Neutro avaliou-se a viabilidade celular, pela capacidade das células captarem, por endocitose, este corante; o polissacarídeo utilizado não alterou a viabilidade das células, sendo que os tratamentos ficaram próximos aos valores do controle. Para verificar possíveis alterações na proliferação celular, o método de análise com Cristal Violeta foi utilizado. Após o tratamento com o polissacarídeo, não foram evidenciadas alterações nesse mecanismo celular em consequência da exposição ao composto utilizado neste estudo. Todos os experimentos acima descritos foram feitos com as concentrações de 10 e 100µg/mL, com tempo de tratamento de 72h. Para avaliar possíveis alterações morfológicas e ultraestruturais, causadas em resposta à exposição ao polissacarídeo, empregou-se a análise de imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura. Para este experimento, células foram tratadas por 48h com o composto nas concentrações de 5, 10, 50 e 100µg/mL. Evidenciou-se que as células expostas aos tratamentos sofreram modificações, como aumento de expansões membranares e inibição de contato. O método de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio (ERONs) avaliou a capacidade oxidativa das células tratadas com o composto aqui empregado, apresentando significativo aumento desta capacidade comparada ao controle, em ambas as concentrações utilizadas, 10 e 100µg/mL. Os resultados obtidos com este estudo evidenciaram efeitos promissores com o modelo *in vitro* e apontam para possíveis atividades antitumorais desta beta-glucana, logo se faz necessário prosseguir com estudos *in vivo* para confirmar o potencial desse composto extraído de cogumelo.

ABSTRACT

Cancer is the name given to a set of more than 100 diseases that have in common their origin from the loss of cell cycle control, the result of mutations that add up in the early stages of the tumor. It is currently considered a worldwide health problem, with more than 12.4 million new cases in 2008, resulting in approximately 7.6 million deaths. 80% to 90 % of cancers originate from environmental factors such as high fat intake, lack of physical activity, alcohol consumption, tobacco use, obesity, excessive sun exposure and social and cultural interactions. In the last three decades cancer has altered the epidemiology of Brazil. It is currently the second leading cause of deaths of the population, with the appearance of 489 000 new cases in 2011. The surgical removal, radiation therapy and chemotherapy are the most common treatments for cancer, but all of them possess a huge amount of side effects. There is growing interest in finding treatments using natural compounds against this disease, which have many reports in the literature, working as immunomodulators and with antitumor effects. The present study sought to assess the biological potential of a beta- glucan extracted from the fungus *Lentinus edodes*, compound here called P4, using to this in vitro assays with cell line B16F10 (murine melanoma). The experiments were performed with different concentrations and treatment times. The MTT assay analyzes cellular cytotoxicity through the action of mitochondrial dehydrogenase, which converts a salt compound (MTT) into formazan crystals; after treatment with the polysaccharide used in this study, it showed not cause cytotoxicity at any concentration and time frame. Using the Neutral Red method, we evaluated the cell viability, the ability of the cells by endocytosis to capture this dye; the polysaccharide used did not alter cell viability; the treatments showed results that were close to baseline (control). To study possible alterations in cellular proliferation, the method of analysis with crystal violet was used. After treatment with the polysaccharide, no changes in cellular mechanism as a result of exposure to the compound used in this study were observed. All experiments described above were carried out with concentrations of 10 and 100µg/mL with treatment time of 72 hours. To assess possible morphological and ultrastructural alterations induced in response to exposure to the polysaccharide, we used the analysis of images obtained by Scanning Electron Microscopy. For this experiment, cells were treated for 48h with the compound at concentrations of 5, 10, 50 and 100µg/mL. It was evident that the cells exposed to the treatments were changed, showing much more membrane expansions and increased contact inhibition. The method of Reactive Nitrogen and Oxygen Species (ERONs) evaluated the oxidative capacity of treated cells with the compound employed here. The results evidence significant increase in oxidative capacity of the treated cells when compared to the control, at both concentrations, 10 and 100µg/mL. The data obtained from this study showed promising effects in the *in vitro* model and point to possible antitumor effects of the beta – glucan tested, then it is necessary to continue with the *in vivo* studies to confirm the potential of the compound extracted from mushroom.

1. INTRODUÇÃO

Antes classificada como uma doença de países desenvolvidos, o câncer é hoje um problema de saúde mundial. Esta patologia abriga um conjunto de mais de 100 enfermidades, que possuem em comum a alteração do controle do ciclo celular, resultando num crescimento desordenado de células, as quais tendem a invadir outros tecidos e órgãos vizinhos (INCA, 2011).

A origem de um câncer pode ser traçada a partir de uma única célula inicial, a qual sofreu alterações que resultaram na perda do controle do ciclo celular, gerando outras células com a mesma característica, as quais vão acumular mais mutações, dando origem a um tumor primário, o qual pode ser benigno, não recebendo a denominação câncer, ou maligno, invadindo tecidos e órgãos vizinhos e sendo então nomeado como câncer. A capacidade metastática de um câncer representa a principal causa do potencial de fatalidade em pacientes acometidos por essa doença (ALBERTS, 2010).

O crescimento anormal e descontrolado de células em um tecido ou órgão recebe o nome de neoplasia (grego para “novo crescimento”). Os tumores malignos são os que possuem a maior capacidade de diferenciar-se do tecido de origem, e através do sistema linfático e da circulação sanguínea podem espalhar-se para outras partes do corpo (IARC, 2008). A Tabela 1 apresenta a diferenciação entre os tipos de tumor.

Tabela1. Principais diferenças entre tumores malignos e benignos. (Fonte: INCA,2011).

Tumor benigno	Tumor maligno - Câncer
Formado por células bem diferenciadas (semelhantes às do tecido normal); estrutura típica do tecido de origem	Formado por células anaplásicas (diferentes do tecido normal); atípico; falta diferenciação
Crescimento progressivo; pode regredir; mitoses normais e raras	Crescimento rápido; mitoses anormais e numerosas
Massa bem delimitada, expansiva; não invade nem infiltra tecidos adjacentes	Massa pouco delimitada, localmente invasivo; infiltra tecidos adjacentes
Não ocorre metástase	Metástase freqüentemente presente

O aumento da atenção dada a essa patologia nas últimas décadas acompanha o crescimento do número de casos detectados, os quais mais do que dobraram nos últimos 30 anos. Este fato explica-se em parte pela maior expectativa de vida da população em geral, bem como por melhorias nos sistemas de detecção das diversas formas de câncer.

Em 2008 (dado mais atual disponível), mais de 12,4 milhões de novos casos foram detectados (6.672.000 em homens e 5.779.000 em mulheres), sendo que mais de 7,6 milhões de pessoas morreram acometidas por essa doença. O câncer de pulmão foi o que mais incidiu no sexo masculino, e o câncer de mama foi o mais recorrente entre o sexo feminino (IARC,2008).

Dados mostram que a incidência das diferentes manifestações de câncer varia conforme a situação econômica dos países observados. Pulmão, mama, próstata e colorretal são as formas mais prevalentes dessa patologia em países desenvolvidos. Em países em desenvolvimento e subdesenvolvimento, as formas mais comuns de câncer ocorrem no estômago, fígado, cavidade oral e colo do útero (IARC, 2008).

Estimativas apontam que de 80% a 90% dos casos de câncer têm origem a partir de fatores sócio comportamentais, incluindo aqui diversos aspectos, como hábitos alimentares com alto consumo de gorduras e pobre em vegetais, falta de atividade física, consumo de álcool e tabaco, obesidade, exposição excessiva ao sol, interações sociais e culturais (IARC, 2008).

Nas três últimas décadas, o câncer vem alterando o perfil epidemiológico do país. Este processo tem se caracterizado pelo aumento dos agravos e da mortalidade de doenças não transmissíveis, por uma maior quantidade de idosos enfermos em detrimento a jovens, e por uma predominância da morbidade em relação à mortalidade, gerando grandes impactos no sistema de saúde e na economia. Atualmente é a segunda maior causa de mortes da população brasileira, tendo sido responsável por 17% dos óbitos com razão conhecida em 2007, com previsão do aparecimento de aproximadamente 489 mil novos casos em 2011, sendo estes os últimos dados disponibilizados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA,2011).

No Brasil, os tumores de pele do tipo não melanoma, próstata, pulmão e estômago são as variantes mais freqüentes de incidência de câncer entre os homens; pele do tipo não melanoma, mama, colo do útero e cólon são os mais comuns entre as mulheres (INCA, 2011).

Existem dois tipos de câncer de pele: o não melanoma e o melanoma.

O câncer de pele do tipo não melanoma é o tumor mais incidente em seres humanos, responsável por aproximadamente 95% das neoplasias de pele detectadas, apresentando um crescimento no número de casos na ordem de até 8% ao ano desde 1960 (DEMERS *et al*, 2005)

Entre os tumores de pele, o tipo não melanoma possui a maior incidência e a menor mortalidade. As linhagens que originam essa patologia são variadas devido à heterogeneidade da pele, sendo que as mais comuns são o carcinoma basocelular e o carcinoma epidermóide, responsáveis por 70% e 25% dos diagnósticos, respectivamente (INCA, 2011).

No Brasil, o tumor de pele do tipo não melanoma corresponde a 25% dos casos de câncer maligno detectados, sendo mais comum em pessoas com mais de 40 anos, portadoras de pele clara ou com doenças cutâneas prévias. A estimativa é de que 134.170 novas ocorrências dessa patologia foram registradas em 2012, sendo 62.680 em homens e 71.490 em mulheres (INCA, 2013).

O melanoma representa apenas 4% dos tipos de câncer de pele detectados no país, porém é o mais grave, pois possui alta capacidade metastática, dificultando o tratamento quando detectado tardiamente (INCA,2011).O câncer do tipo melanoma tem origem nos melanócitos, células responsáveis pela produção de pigmentos chamados melanina, coincidentemente as que possuem a função de proteger o DNA de possíveis mutações causadas pela incidência solar (GRAY-SCHOPFER *et al*, 2007).

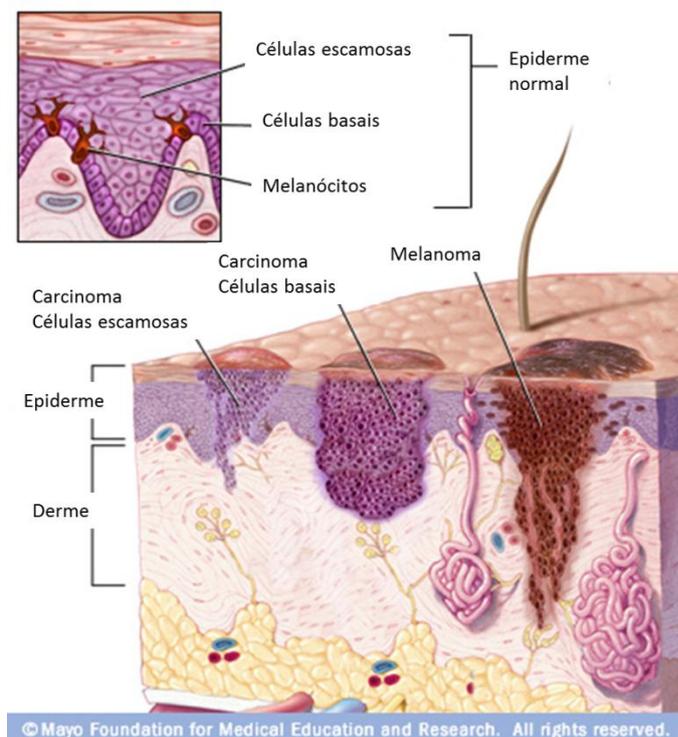


Figura1. Células originárias dos principais tipos de câncer de pele: células basais - carcinoma basocelular; células escamosas - carcinoma epidermóide; e melanócitos – melanoma. (FONTE: Modificado de NOVAES,2011, Apud BISCAIA, SMP; 2012).

Alguns dos fatores conhecidos do desencadeamento do melanoma e de sua progressão são: o desenvolvimento da chamada *fase de crescimento vertical*, momento no qual as células do tumor primário passam a ser competentes para invadir camadas mais profundas da pele, dando origem ao processo de metástase (CLARCK *et al* apud BENNET,2008); a ativação por mutação somática do proto-oncogene BRAF, diretamente relacionado à sinalização do crescimento celular (DAVIES *et al*,2002); e o silenciamento do gene responsável pela expressão de *E-caderina*, um dos principais receptores de adesão celular (KUPHAL *et al*, 2005).

Diversos aspectos e comportamentos de risco estão relacionados com a incidência dos variados tipos de câncer de pele, entre eles: a complexidade da pele de cada indivíduo, sendo esta formada pela coloração, presença ou ausência de pelos e sardas; número de melanócitos; histórico familiar da patologia ou de outras enfermidades cutâneas; histórico de exposição ao sol; histórico de queimaduras provocadas pelo sol; e uso de proteção contra a radiação solar (FAGUNDO, *et al.*,2011).

Os tratamentos mais usuais contra o câncer baseiam-se na remoção cirúrgica do tumor, sua destruição através da radioterapia, e em muitas situações de metástase tumoral, o uso de quimioterapia (IARC, 2008).

Existem atualmente mais de 30 drogas citotóxicas utilizadas no tratamento de tumores malignos, as quais são normalmente administradas em conjunto, tentando induzir a morte das células cancerígenas. A falta de seletividade dessas drogas gera diversos efeitos colaterais, como destruição de células do sistema imune, surgimento de úlceras orais, diarreia, perda de cabelo, dano ao tecido nervoso e aos rins (IARC,2008).

Tendo em vista a grande quantidade de efeitos colaterais resultantes do tratamento contra o câncer, agentes imunoestimulantes são interessantes aliados no combate à doença, e apesar de ainda não possuírem o mecanismo definido, diversos compostos extraídos de fungos vêm demonstrando essa capacidade (RICHARD *et al.*, 2006).

Os efeitos antitumorais de polissacarídeos extraídos de fungos foram primeiramente identificados há mais de 100 anos, quando observações demonstraram que alguns desses compostos, de alguma forma, ajudavam na remissão de quadros clínicos de câncer (NAUTS, SWIFT & COLEY, 1946, *Apud* ZHANG *et al*, 2007).

Polissacarídeos compreendem um complexo de macromoléculas importantes com propriedades biológicas (LIU *et al.*, 2009) . Estudos *in vitro* sugerem que o β -D-glicano possui ação estimulante na produção de mediadores pró-inflamatórios e citocinas (IL-4, IL-6, IL-8 e TNF- α). Já, estudos *in vivo* demonstraram que ratos com deficiência em

diversos aspectos do sistema imunológico, como baixa produção de células T, células Natural Killer ou moléculas específicas como os interferon, interleucina-12 (IL-12) e TNF- α , apresentam alta incidência de desenvolvimento de tumores (FORTES *et al.*, 2006).

As β -glucanas, isoladas de bactérias, fungos e plantas são os polissacarídeos mais estudados quanto às atividades imunológicas e antitumorais. (BROWN, 2003). O β -glucano conhecido como lentinana, derivada de cogumelo e a “schizophyllan” de culturas filtradas do *Schizophyllum commune* têm sido empregados em pacientes, em sessões de imunoterapia. O mecanismo de ação sugerido envolve estímulo das células de defesa do hospedeiro, como macrófagos, neutrófilos e células *Natural Killer*, induzindo a eliminação das células tumorais (YAN, J. *et al.*, 1999). Além dos efeitos antitumorais, descreve-se também que as β -glucanas apresentam atividades antibacteriana, antiviral e anticoagulante (BOHN; BeMILLER, 1995).

Dados da literatura descrevem que tratamentos com polissacarídeos induzem alterações morfológicas e estruturais em diferentes linhagens. Os polissacarídeos nativos de *R. celastri* não induziram alterações em células HeLa. Em contrapartida a literatura relata que derivados sulfatados dos mesmos compostos induziram alterações sobre esta linhagem celular, efeitos dose-concentração dependentes. Observou-se redução da adesão celular, citoplasma basófilo, ocorrência de “blebs”, condensação celular e agregados celulares (CARNEIRO-LEÃO, 1997). Segundo Moretão *et al.* (2004) empregando-se arabinogalactana em células HeLa, ação dos polissacarídeos induziu a formação de uma intensa condensação celular, diminuição das células aderidas e a presença de “blebs”, num comportamento dose-dependente.

Sabe-se hoje que as atividades antitumorais desencadeadas por grande parte dos polissacarídeos estudados baseiam-se em quatro mecanismos básicos: a prevenção do surgimento do câncer através do consumo oral desses compostos; atividade direta contra o tumor, como por exemplo através do desencadeamento da perda de viabilidade celular; imunomodulação, tornando o sistema imune do paciente mais eficaz no combate à doença; e inibição da progressão do tumor, diminuindo ou impedindo a metástase (ZONG *et al.*, 2012).

Israilides e colaboradores (2007) buscaram avaliar a citotoxicidade celular de polissacarídeos extraídos do corpo e do micélio da espécie *Lentinus edodes*, a mesma utilizada no presente trabalho. Para tal, um dos métodos empregados foi o de MTT, sendo que os autores consideraram o resultado desse experimento como reflexo da viabilidade e proliferação celular. As concentrações utilizadas variaram de 10 a 800 μ g/mL, com o

tempo de tratamento de 48h, sendo que parte das amostras foram incubadas com o polissacarídeo lentinina (extraído do corpo do fungo) e parte com todo o extrato obtido a partir dos micélios dos cogumelos. As linhagens celulares empregadas foram as de câncer de mama (MCF-7) e fibroblastos humanos saudáveis cedidos por um voluntário, os quais foram empregados como controle. Os resultados encontrados apontam uma significativa diminuição dose-dependente da viabilidade e proliferação celular em ambas as linhagens e com ambas as preparações de polissacarídeos, porém o número de fibroblastos sempre foi maior do que o de MCF-7, o que pode representar uma atividade antitumoral (ISRILIDES *et al*, 2007).

Polissacarídeos extraídos de fungos também já mostraram diminuir a proliferação e o tamanho de tumores *in vivo* (REN *et al*, 2012). Yu e colaboradores (ano) extraíram e caracterizaram uma β -glucana (denominada de LT1) a partir do corpo frutífero de *Lentinus edodes*, procedendo então para avaliação de possíveis atividades antitumorais deste composto sobre um modelo *in vivo*, utilizando a linhagem celular de sarcoma 180. Para esse ensaio, $5 \cdot 10^6$ células cancerígenas foram injetadas de forma subcutânea em ratos. Após 24 h, três grupos foram separados e tratados ou não por 20 dias alternados: controle; um grupo tratado com lentinina (também extraído de *Lentinus edodes*; dosagem de 20mg/kg por dia); e outro com LT1 (doses de 10, 20 e 40 mg/kg por dia). Tanto a lentinina quanto o LT1 apresentaram diminuição da proliferação do tumor, com o composto LT1 reduzindo o crescimento do mesmo em 61,3% (YU *et al*, 2010).

Segundo NOVAES *et al.* (2011) (*Apud* BISCAIA, SMP; 2012), uma série de polissacarídeos extraídos de cogumelos apresentaram resultados promissores como adjuvantes no tratamento de câncer (ou seja, reforçando a ação de outro tratamento) em várias publicações entre 1990 a 2011. Alguns desses estudos que utilizaram moléculas da família das beta-glucanas, mesma da utilizada neste trabalho, seus benefícios e seus mecanismos de ação são mostrados na tabela abaixo.

Tabela 2.Estudos publicados entre 1990 e 2011 evidenciaram benefícios e os mecanismos de ação do emprego de polissacarídeos do tipo beta-glucana extraídos de cogumelos em modelos tumorais. (FONTE: Modificado de NOVAES,2011, Apud BISCAIA, SMP; 2012).

REFERÊNCIAS	BENEFÍCIOS	MECANISMOS DE AÇÃO
Fujimiya et al. (1998)	Atividade antitumoral	Inibe diretamente o crescimento tumoral in vitro por induzir processo apoptótico, aumentando expressão do antígeno Apo2.7 nas membranas mitocondriais de células tumorais e citotoxicidade seletivas em células tumorais.
Kodama et al(2003)	Reprime a progressão do câncer, impede o progresso metastático, diminui a expressão de marcadores tumorais e aumenta atividade de células NK em todos os pacientes	Efeito antitumoral em ratos portadores de tumor, devido ao aprimoramento do sistema imune pela ativação de macrófagos, células T e natural killer (NK)
Novaes et al(2005a) Novaes et al(2005b) Fortes e Novaes et al(2006), Fortes et al(2008), Fortes e Novaes (2011)	Aprimora os efeitos do sistema imune	Aumenta imunidade humoral e celular, o número e tamanho de células fagocíticas, estimula a produção de citocinas por células T e aumenta o número de células NK
Zhang et al(2006)	Dependente da dose, reduz proliferação e viabilidade de células de câncer de mama MCF-7 (crescimento das células cancerosas diminuiu em 50%)	Dependente do tempo, induz G1 do ciclo celular em aproximadamente 90% das células por diminuir a regulação da ciclina D1 e a expressão da Celina E em células de câncer de mama MCF-7. Induz apoptose por alteração no DNA em células subG1. Induz esgotamento da proteína Bcl-2 antiapoptótica.
Demiret et al(2007)	Estimula proliferação e ativação de monócitos do sangue periférico in vivo em pacientes com câncer de mama avançado	Estimula resposta imune inata por ativação de monócitos/macrófagos (CD95, CD45RA, CD14+)
Vetvicka et al(2008)	Inibe crescimento de células tumorais in vivo e afeta a expressão de muitos genes importantes em células de câncer de mama	Beta-Glucano derivado de levedura causa significativa estimulação de atividade fagocítica, bem como a potencialização da síntese e liberação de interleucina (IL)-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, e necrose tumoral fator alfa.
Jiang et al(2010)	Inibe proliferação celular e suprime o comportamento metastático de células de câncer de mama MDA-MB-231	Inibição de proliferação celular e ciclo celular na fase G2/M nas células de câncer de mama altamente invasivas MDA-MB-231; ligado a supressão da secreção do ativador plasminogênio uroquinase (uPA) dessas células. Inibição da adesão, migração e invasão celular.

A capacidade imunomoduladora de um polissacarídeo depende de vários fatores, como a dosagem, a via e a frequência de administração, a forma de extração e o mecanismo de ação desse composto (RICHARD et al.2006).

A melhor compreensão de possíveis efeitos antitumorais de polissacarídeos em linhagens celulares cancerígenas pode trazer vantagens para o combate ao câncer, melhorando a resposta ao tratamento convencional e a qualidade de vida do paciente.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar possíveis atividades antitumorais do polissacarídeo beta-glucana extraído do fungo *Lentinus edodes*, empregando para isso diferentes concentrações e tempos de tratamento, tendo como modelo a linhagem celular de melanoma murino B16F10.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcançar o objetivo geral, propusemos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar a viabilidade, através dos métodos de Vermelho Neutro;
- Avaliar a citotoxicidade através do método de MTT;
- Avaliar a proliferação celular através do uso do corante cristal violeta;
- Avaliar possíveis alterações morfológicas e ultraestruturais ocorridas nas células após o tratamento empregando-se da Microscopia Eletrônica de Varredura.
- Avaliar alterações na capacidade oxidativa das células através da metodologia ERONS (Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio);

3. MÉTODOS

3.1 CULTIVO CELULAR

Para todas as análises, as células B16F10 (advindas do Banco de Células do Rio de Janeiro, BCRJ; Figura 2) foram cultivadas em garrafas (Jet Biofil e TPP), com meio DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Lonza, CAT 12-604Q, USA), suplementado com 10% de SFB - Soro Fetal Bovino (GIBCO, CAT 10270-106, USA), 10mM de tampão HEPES, 0,25µg/mL de antibióticos penicilina-estreptomicina em 0,85% salina (GIBCO, CAT 15140148, USA), e então foram mantidas em incubadora com 5% de CO₂ a 37° C, em atmosfera úmida.

Para o desenvolvimento dos experimentos, as células foram desaderidas das garrafas de cultivo (Jet Biofil e TPP) através da exposição à tripsina (GIBCO) por 5 minutos, coletadas em tubos de 15 mL (Jet Biofil e TPP), centrifugadas a 1800rpm por 3 minutos, ressuspensas em meio DMEM, contadas em Câmara de Neubauer e plaqueadas conforme a necessidade do protocolo experimental realizado. Todos os tratamentos com os polissacarídeos foram adicionados 24 horas após o plaqueamento das células. A Figura 2 apresenta uma foto retirada de uma cultura de células B16F10.

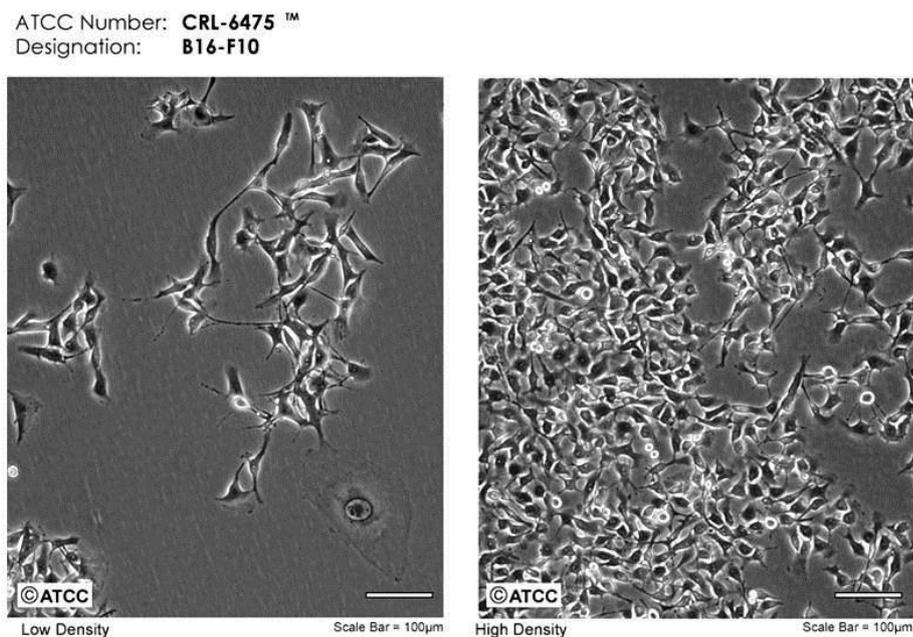


Figura 2. Linhagem celular B16F10. Fonte: ATCC.

3.2 POLISSACARÍDEO

O polissacarídeo utilizado neste projeto foi extraído de um fungo da espécie *Lentinus edodes*, isolado, purificado, caracterizado e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Marcelo Iacomini, docente do Departamento de Bioquímica da UFPR e pela Prof^a. Dr^a. Elaine Carbonero, docente do Departamento de Química - *Campus Catalão*, da Universidade Federal de Goiás. Este polissacarídeo, é uma beta-glucana (Figura 3), foi isolado de *Lentinus edodes*, fornecido pela Empresa Cogumelo Sol de Minas. Este composto foi denominado P4 nos ensaios experimentais realizados neste trabalho.

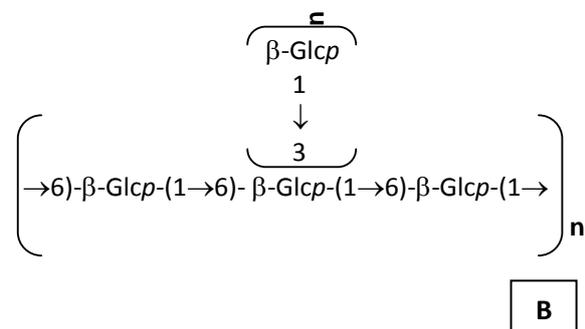


Figura 3. Em **A** está representada a imagem do cogumelo *Lentinus edodes*; e em **B** está representado a fórmula química do polissacarídeo utilizado neste trabalho (Fonte: OLIVEIRA, 2011, *Apud* BISCAIA, SMP).

3.3 VIABILIDADE CELULAR – VERMELHO NEUTRO

O método de Vermelho Neutro foi realizado de acordo com as metodologias descritas por Borenfreund e Puerner (1984); Fotakis e Timbrell (2006) e Chaimet *et al.* (2006).

Este método analisa a viabilidade celular através da capacidade endocítica da célula, a qual irá executar maior ou menor captação do corante de acordo com a integridade da membrana plasmática. O composto endocitado fica armazenado no citosol, e através de uma solução de eluição (Etanol / Ácido Acético Glacial; 50%/1% em água ultrapura) é possível realizar a leitura de absorvância das amostras.

Após os procedimentos de cultivo celular, citados no item 3.1, 2000 células foram plaqueadas em placas de 96 poços. Depois de 24 horas, as células foram tratadas com o polissacarídeo P4, nas concentrações de 10 e 100 µg/mL; com tempo de tratamento de 72 horas.

Duas horas antes do término do tempo de tratamento, as células foram incubadas com o corante vermelho neutro (SIGMA, N6634), em uma concentração de 100 µg/mL.

As células foram então lavadas com PBS, e o corante foi eluído com 100µL da solução de eluição. Procedeu-se à leitura da absorbância das amostras, em leitora para microplacas (BIOTEC, EPOCH).

3.4 CITOTOXICIDADE CELULAR – MTT

O método do MTT foi realizado de acordo com a metodologia descrita por MOSSMAN *et al.*(1983), REILLY *et al.*(1998), e FOTAKIS e TIMBRELL (2006).

No ensaio de MTT, a citotoxicidade celular é avaliada através da atividade das enzimas desidrogenases mitocondriais. Estas enzimas têm a capacidade de clivar o anel tetrazólio do corante utilizado, formando um cristal insolúvel de formazan de cor roxa. Após a solubilização com DMSO (dimetil-sufóxido), obtém-se uma solução cuja absorbância pode ser medida, sendo que a intensidade da cor mensurada será diretamente proporcional a quantidade de células viáveis.

Após os procedimentos de cultivo celular, citados no item 3.1, 2000 células foram plaqueadas em placas de 96 poços. Depois de 24 horas, as células foram tratadas com o polissacarídeo P4, nas concentrações de 10 e 100µg/mL; com tempo de tratamento de 72 horas.

Três horas antes do término do tempo de tratamento, adicionou-se MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide - SIGMA M5655) em uma concentração de 0,45mg/mL, procedendo-se então o armazenamento das placas em incubadora para metabolização, até o término do período de tratamento.

Todo o líquido presente nas placas foi retirado, e adicionou-se então 100µL de DMSO, permitindo a eluição dos cristais de formazan. Foi realizada então a leitura de absorbância, utilizando-se uma leitora de microplacas (BIOTEK, EPOCH).

3.5 PROLIFERAÇÃO CELULAR

Este ensaio foi realizado conforme Franco *et al.*(2001).

Após os procedimentos de cultivo celular, citados no item 3.1, 2000 células foram plaqueadas por poço em placas de 96 poços (TPP).

Depois de 24 horas, as células foram tratadas com o polissacarídeo P4 nas concentrações de 10 e 100µg/mL; com um tempo de tratamento de 72 horas.

Após o período de tratamento as células foram fixadas com paraformaldeído 2% por 30 minutos, lavadas 2x com PBS, coradas com 100µL da solução de cristal violeta 0,2% em etanol 5%, durante 5 minutos, e então lavadas 10x com PBS.

Procedeu-se a eluição do corante utilizando uma solução de citrato de sódio 0,1M em etanol 50% por 10 minutos, e então à leitura da absorbância das amostras, utilizando uma leitora de microplacas (BIOTEK, EPOCH).

3.6 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para este ensaio, as células B16F10 foram cultivadas de acordo com o item 3.1. Após a confluência as células foram tripsinizadas (enzima Tripsina, GIBCO) por 5 minutos, contadas em câmara de Neubauer, e então 10.000 células foram plaqueadas por poço, em lamínulas circulares(EMS) (13mm de diâmetro), em placas de 24 poços (TPP).Após 24h estas foram expostas ao polissacarídeo P4, nas concentrações de 5, 10, 50 e 100µg/mL, por um período de 48h.Estas células foram lavadas quatro vezes em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,4 a 37°C. Após foram fixadas em solução de Karnovski (glutaraldeído 2,0%, paraformaldeído 4,0%, CaCl₂ 1mM em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2-7,4) por 1 hora. A seguir estas foram novamente lavadas em tampão cacodilato, pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% (diluído em tampão Cacodilato de sódio 0,1M – pH 7,4) por 1 hora. Após a pós-fixação, as células foram mais uma vez lavadas em tampão cacodilato 0,1M. Posteriormente foram desidratadas por concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90%, duas vezes 100%), por um período de 10 minutos em cada concentração. Submetidas ao ponto crítico no aparelho (CPD 010 (Critical Point Dryer) 030 - Balzers), metalizadas com ouro no aparelho (SCD 030 - Balzers), sendo analisadas no microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM 6360 – LV SCANNING ELECTRON MICROSCOPE).

3.7 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO

A sonda H₂DCFDA (diclorofluoresceínadiacetato) difunde-se passivamente nas células, é desacetilada (DCFH₂) (Figura 4) e subsequentemente oxidada via reação catalisada por H₂O₂/ peroxidase/ Fe²⁺/ citocromo c e, possivelmente diretamente por outras ERONs, originando 27-diclorofluoresceína (DCF) fluorescente (Fig. 4B) (HAUGLAND, 1996; BENOVA *et al.*, 1998; ROYALL e ISCHIROPOULOS,1993).

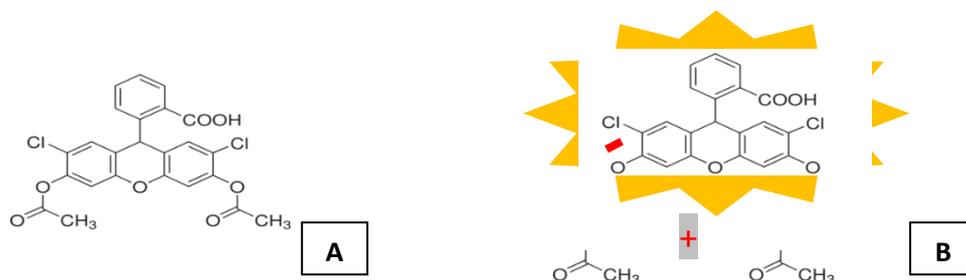


Figura 4. **A.** Molécula: H₂DCFDA (diclorofluoresceínadiacetato) **B.** 27-diclorofluoresceína (DCF). A molécula é oxidada, originando 27-diclorofluoresceína (DCF) fluorescente.

Para esta técnica, as células B16F10 foram cultivadas conforme item 3.1. Após confluência, as células foram desaderidas e plaqueadas 1.000 (10³) células em cada poço

de uma placa de 96 poços. Após 24h foram tratadas com o polissacarídeo P4 nas concentrações de 10 e 100ug/mL, por um período de 72h.

Após o tratamento foi retirado o meio de cultura dos poços, e adicionado 200 µl de meio de cultura novo contendo H₂DCFDA (10 mM preparado em DMSO; concentração final do DMSO = 0,1%) em cada poço. Então foi incubado durante 15 min (37° C e 5% CO₂). Retiramos esta solução, lavamos com PBS e ressuspendemos em 250 uL de PBS para realizar a leitura em espectrofluorímetro TECAN (Figura 10.B) (λ de excitação = 488 nm; λ de emissão = 530 nm). Durante todos os procedimentos, as células ficaram protegidas da luz para evitar perda de fluorescência.

As análises foram realizadas comparando o controle com os tratados. Este experimento foi realizado em triplicata, por 3 experimentos independentes.

4. RESULTADOS

4.1 CITOTOXICIDADE CELULAR – MTT

Para determinação da possível atividade antitumoral dos polissacarídeos foi realizado um ensaio de citotoxicidade, utilizando o método de viabilidade celular do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio). Esse método se baseia na dosagem da atividade metabólica de células viáveis utilizando ensaio colorimétrico. Os sais tetrazolium (MTT) são reduzidos através de uma reação enzimática que envolve a oxidação do NADH/NADPH catalisada pelo complexo succinato-tetrazoliumredutase presente somente em células viáveis. Quando reduzidos os sais tetrazolium formam o sal formazan que é hidrofóbico e colorido (solubilizado pela adição de DMSO), podendo ser quantificado por espectrofotometria.

A Figura 5 apresenta o resultado de dois experimentos independentes de citotoxicidade celular através do método de MTT compilados em um gráfico. Após 72h de tratamento, o polissacarídeo P4, na concentração de 10µg/mL, resultou em um significativo aumento da atividade da desidrogenase mitocondrial das células tratadas em relação ao controle. Este resultado nos indica que não há comprometimento da viabilidade após exposição destas células em ambas as concentrações analisadas.

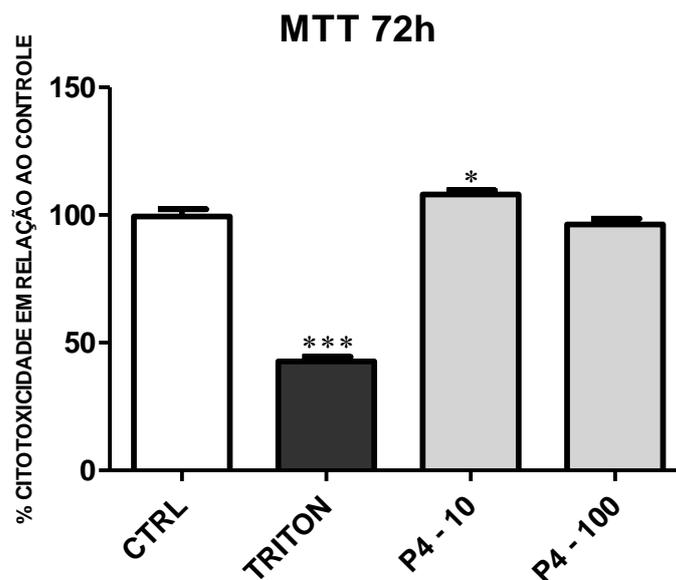


Figura 5. Ensaio de citotoxicidade celular através do método de MTT. As células B16F10 foram expostas ao polissacarídeo P4, nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL por 72 horas. A análise estatística foi realizada com ANOVA de uma via e pós teste de Tukey (Valor de significância: * < 0,05; ***<0,0001).

4.2 VIABILIDADE CELULAR – VERMELHO NEUTRO

Este método consiste em avaliar a capacidade das células endocitarem, por fase fluída, o corante vermelho neutro e para tanto há uma correlação direta da integridade física e funcional da membrana plasmática, somente presente em células viáveis com a capacidade de captação deste corante (endocitose). Após a endocitose o corante fica acumulado no interior das células, e com uma solução de eluição, o corante eluído pode ser quantificado por medida de absorbância.

A Figura 6 apresenta o resultado de dois experimentos independentes de viabilidade celular através do método de vermelho neutro compilados em um único gráfico. Após 72h de tratamento o polissacarídeo P4, nas concentrações de 10µg/mL e 100µg/mL, não induziu perda da viabilidade celular nas concentrações e tempo analisado. Os valores encontrados ficaram semelhantes ao valor de referência (células controle).

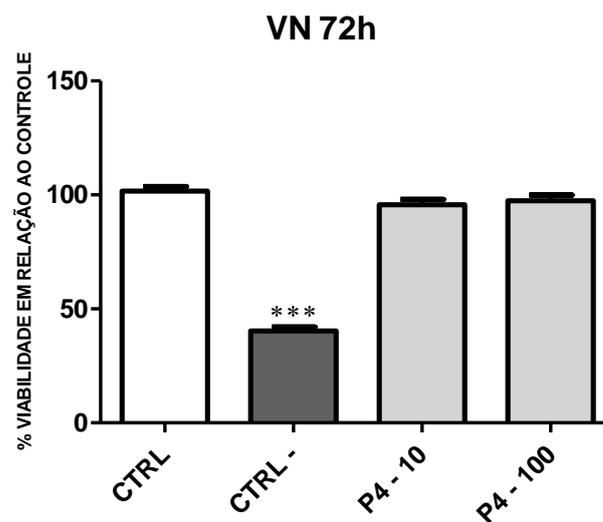


Figura 6. Ensaio de viabilidade celular através do método de VN. As células B16F10 foram expostas ao polissacarídeo P4, nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL por 72 horas. A análise estatística foi realizada com ANOVA de uma via e pós teste de Tukey (Valor de significância:***<0,0001).

4.3 PROLIFERAÇÃO CELULAR POR CRISTAL VIOLETA

A Figura 7 apresenta o resultado de dois experimentos independentes de proliferação celular através do método de cristal violeta compilados em um único gráfico. Os tratamentos com o polissacarídeo P4 nas concentrações de 10µg/mL e 100µg/mL, por 72h, evidenciaram que após a exposição das células a este polissacarídeo não se observa modulação deste sobre a dinâmica de proliferação celular.

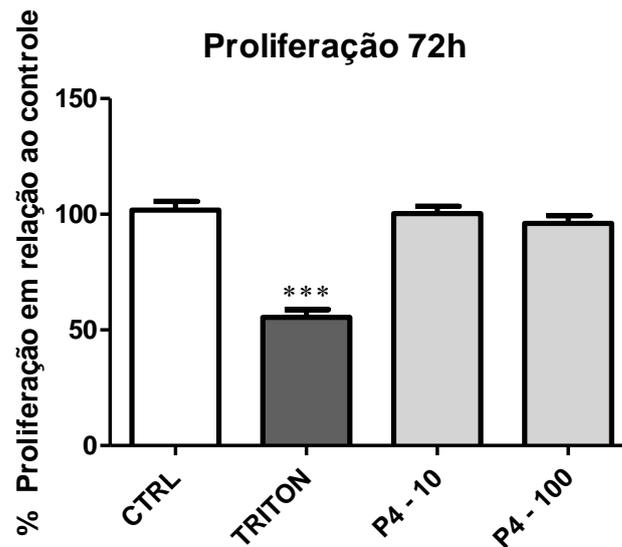


Figura 7. Ensaio de viabilidade celular através da quantificação da proliferação celular. As células B16F10 foram expostas ao polissacarídeo P4, nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL por 72 horas. A análise estatística foi realizada com ANOVA de uma via e pós teste de Tukey A análise estatística foi realizada com ANOVA de uma via e pós teste de Tukey (Valor de significância: ***<0,0001).

4.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

O resultado do ensaio de espécies reativas de oxigênio, representados na Figura8, demonstra que as células tratadas com o polissacarídeo P4 aumentaram significativamente a quantidade de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, sugerindo assim que o tratamento aumenta a capacidade celular de reagir com substâncias como radicais livres, demonstrando assim uma capacidade antioxidante significativa.

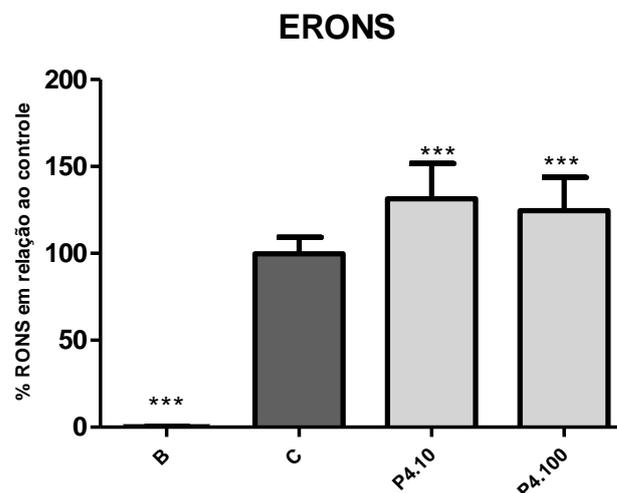


Figura 8. Ensaio de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. As células B16F10 foram expostas ao polissacarídeo P4, nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL por 72 horas e depois expostas a adiclorofluoresceínadiacetato e oxidada a 27-diclorofluoresceína (DCF) fluorescente, mensurada por fluorímetro. A análise estatística foi realizada com ANOVA de uma via e pós teste de Tukey (significância *** = p<0,0001).

4.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL EMPREGANDO-SE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para avaliar alterações morfológicas e ultraestruturais induzidas na linhagem B16F10 após exposição ao composto beta-glucana extraído do fungo *Lentinus edodes* empregou-se a técnica de MEV.

Pode-se observar na Figura9, imagens (1A,1B e 1C), características morfológicas e ultraestruturais de células controle da linhagem B16F10. Estas apresentam morfologias distintas, observa-se células arredondadas (\rightleftarrows) e com expansões do corpo celular na forma de filopódios(Σ). Estas células não apresentam inibição de contato (\star) e empilham-se umas sobre as outras, característica de células tumorigênicas.

Pode-se de forma evidente observar nas imagens 2A,2B e 2C que as células expostas ao composto, na concentração de 5 μ g/mL, demonstraram alterações morfológicas. Ao redor de todo o corpo celular existem expansões membranares (\triangleright) de forma arborescente. As células estão mais espriadas por sobre o substrato, com maior expansão do corpo celular (\rightleftarrows). Pode-se observar nas imagens 2A e 2B uma maior presença de expansões membranares na forma de filopódios (Σ).

Células com características semelhantes a estas descritas para a concentração de 5 μ g/mL foram evidenciadas após o tratamento com 100 μ g/mL do composto, imagens 5A,5B e 5C. Observam-se expansões membranares arborescentes (\triangleright), imagem 5A e 5C, além de uma grande expansão do corpo celular na imagem 5C (\rightleftarrows). É possível identificar também um grande número de células arredondadas (\rightleftarrows)(Imagens 5A e 5B) e desaderidas do substrato.

Nas imagens 3 e 4 (A,B e C) observa-se semelhante morfologia e ultraestrutura. As células estão justapostas (\blacktriangleright) e formam uma monocamada, sem que haja o empilhamento de uma sobre as outras (\rightarrow). Observa-se que estas emitem projeções membranares na forma de filopódios (Σ) e estas expansões são as que não respeitam inibição de contato. Vê-se por sobre o cultivo, agregados celulares (\blackrightarrow), imagens 4A,B e C.

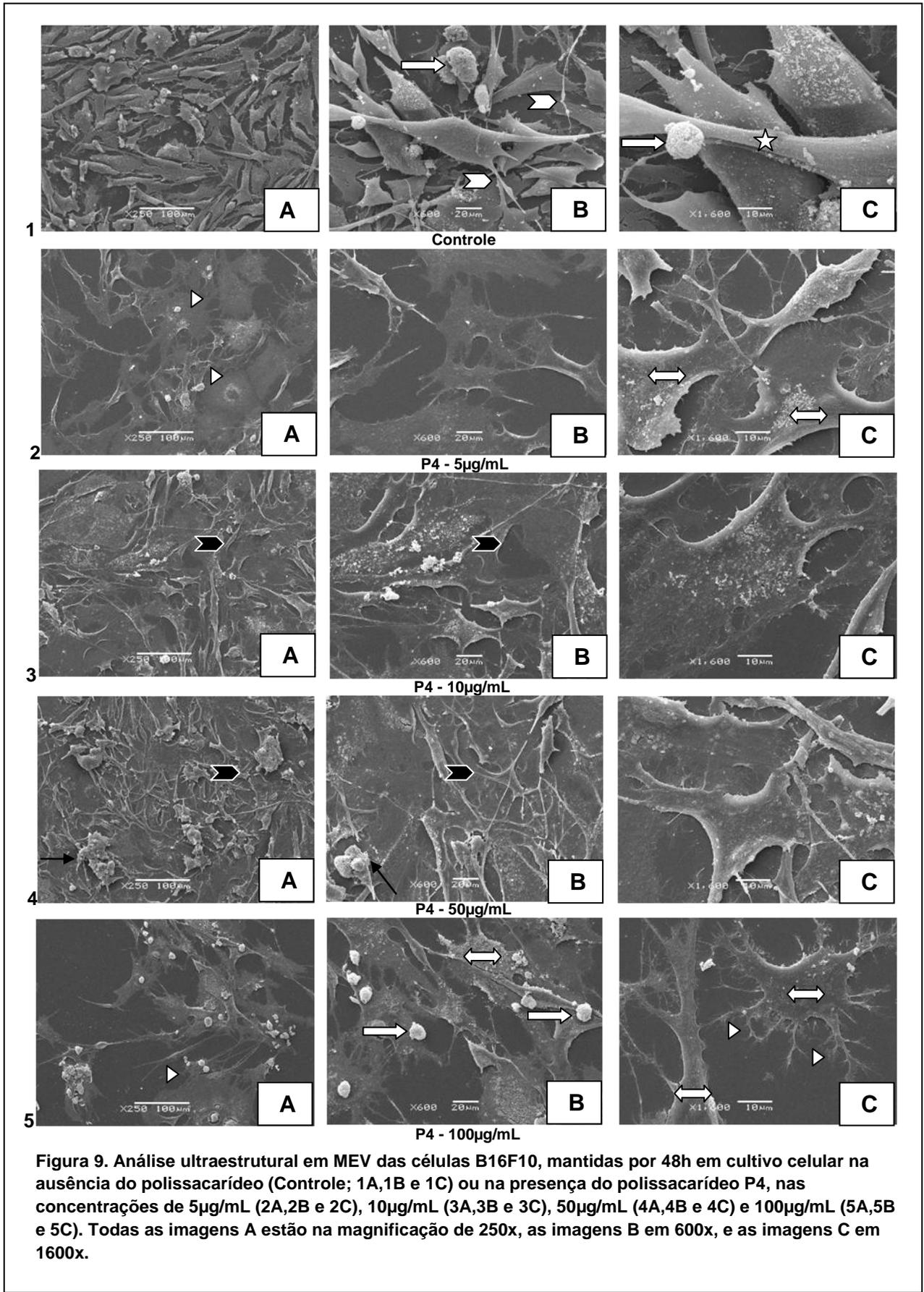


Figura 9. Análise ultraestrutural em MEV das células B16F10, mantidas por 48h em cultivo celular na ausência do polissacarídeo (Controle; 1A,1B e 1C) ou na presença do polissacarídeo P4, nas concentrações de 5µg/mL (2A,2B e 2C), 10µg/mL (3A,3B e 3C), 50µg/mL (4A,4B e 4C) e 100µg/mL (5A,5B e 5C). Todas as imagens A estão na magnificação de 250x, as imagens B em 600x, e as imagens C em 1600x.

	Células Arredondadas		Expansão de Corpo Celular
	Filopódios		Inibição de Contato
	Ausência de Inibição de Contato		Agregados celulares
	Expansões de Membrana Arborescentes		Células Justapostas

5. DISCUSSÃO

Polissacarídeos são compostos considerados moléculas farmacologicamente ativas, podendo ser utilizados pela indústria farmacêutica na elaboração de novos medicamentos naturais (DREYFUSS et al., 2009). Neste contexto, a procura de novos compostos, novos alvos e novas formulações passam a ser estudo altamente prioritário. A chance de sucesso aumenta a partir de estudos prévios que indicam atividade antiproliferativa e antitumoral.

Os experimentos de viabilidade e citotoxicidade celular foram utilizados nesse trabalho com o objetivo de determinar se o polissacarídeo não afetaria a integridade das células. Foram empregados os métodos colorimétricos do Vermelho Neutro (VN) e do MTT. Através destes métodos há uma correlação direta da integridade física e funcional da membrana plasmática e do metabolismo mitocondrial.

No presente trabalho fica evidente nas figuras 5 e 6 que não foi encontrado ação citotóxica (MTT) comprometimento da viabilidade celular (VN), e modulação da proliferação celular após exposição da linhagem B16F10 a beta-glucana nas concentrações e tempo impostos. Resultados semelhantes foram descritos segundo Biscaia *et al* 2012, que realizou estudos *in vitro* empregando-se polissacarídeos extraídos de fungos dos gêneros *Pleurotus*, *Lentinus* e *Agaricus* em linhagem B16F10 então encontrou comprometimento da viabilidade e citotoxicidade celular nos tempos e concentrações analisadas.

Isso pode sugerir que o polissacarídeo aqui avaliado não possui esse tipo de atividade antitumoral direta, assim como também pode ser um indicativo de que ele não é citotóxico para outras linhagens celulares, o que é positivo, pois pode abrir caminho para ensaios *in vivo*.

Apesar da ausência de modulação da citotoxicidade, viabilidade e proliferação celular encontrada neste trabalho, há na literatura ensaios semelhantes que detectaram alterações nesses mecanismos celulares em resposta à exposição a outros polissacarídeos. Fortes e Novaes (2011) descrevem atividades citotóxicas de uma beta-glucana contra células tumorais humanas, câncer de mama e sarcoma 180, em experimentos *in vivo* utilizando ratos. Zhang *et al* (2006) sugere que alguns polissacarídeos inibem a proliferação celular através do bloqueio de importação de proteínas no núcleo, em um experimento *in vitro* utilizando células da linhagem MCF-7

(câncer de mama). Zhang *et al* (2009) relata ação antiproliferativa de lectina em hepatoma e células MCF-7.

O presente trabalho na Figura 9 descreve alterações morfológicas e estruturais quando se compara as imagens 1A,1B e 1C (células controle), com as células tratadas 2, 3 e 4 (A,B e C). Observa-se células maiores, mais espalhadas, apresentando inúmeras projeções membranares, com perda parcial da característica de empilhamento celular, além de uma maior justaposição.

Biscaia *et al* 2012, detectou resultados semelhantes com estudos *in vitro* empregando-se polissacarídeos extraídos de fungos dos gêneros *Pleurotus*, *Lentinus* e *Agaricus* em linhagem B16 F10, tratadas por 24, 48 e 72h, nas concentrações de 1, 10, 100 µg/mL.. A exposição aos compostos resultou em modificações morfológicas e ultraestruturais, com células mais espalhadas, respeitando inibição de contato e emitindo expansões membranares.

Em estudos utilizando polissacarídeos ácidos isolados de diferentes fontes verificou-se que estes foram capazes de promover aumento na produção de óxido nítrico, ânion superóxido, fator de necrose tumoral alfa e interleucina 6, assim como a ativação do fator NF-κβ (SCHEPETKIN *et al.*, 2009), biomoléculas que possuem atividade antioxidante (YANG *et al*, 2007). Resultados semelhantes foram encontrados no presente trabalho. Na Figura 8 ao se avaliar espécies reativas de oxigênio, os resultados evidenciam que após exposição desta linhagem ao composto beta-glucana de forma significativa estas modularam positivamente a capacidade oxidante.

O presente trabalho apresenta resultados interessantes, mas preliminares, que necessitam ser explorados em estudos posteriores que possam apontar, através de técnicas *in vitro* e *in vivo*, o possível papel promissor deste composto na modulação da resposta da progressão tumoral. Desta forma estes resultados motivam a equipe científica a dar continuidade em estudos mais aprofundados com curva de dose e tempo, primeiramente em estudos com maior detalhamento e abrangência metodológica empregando-se estudos *in vitro* e posteriormente se faz imprescindível avaliação em modelo *in vivo*.

6. CONCLUSÕES

Podemos concluir com este trabalho que empregando-se os ensaios de viabilidade celular, citotoxicidade e proliferação celular através das técnicas de vermelho neutro, MTT, e cristal violeta respectivamente, nas concentrações e tempo analisados, o composto beta-glucana extraído do fungo *Lentinus edodes* sobre a linhagem B16F10 não interferiu sobre estes eventos em todos os ensaios realizados. Os valores encontrados ficaram próximos ao valor de referência (células controle).

Concluimos que através das análises ultraestruturais em MEV, após os diferentes tratamentos de 5,10,50 e 100µg/mL, as células apresentaram evidentes alterações ultraestruturais, tornando-as mais espreiadas, com inúmeras expansões membranares, respeitando maior inibição de contato. Somente na concentração de 100µg/mL observou-se maior número de células arredondadas e desaderidas do substrato.

Resultado interessante foi observado com o ensaio de espécies reativas de oxigênio (ERONS). Conclui-se que após exposição destas células às concentrações de 10 e 100µg/mL evidenciou-se aumento significativo da capacidade antioxidante desta linhagem.

Os resultados de maior grau de espreiamento celular, evidente diminuição de empilhamento de células, maior justaposição entre estas, formando uma monocamada, acrescido do resultado de significativo aumento da capacidade antioxidante desta linhagem B16F10, motivam o grupo a seguir com demais ensaios *in vitro* e *in vivo* que possam responder e comprovar cientificamente estes e demais resultados promissores sobre linhagens tumorigênicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4 ed. São Paulo: Artmed. 2006.

Bennett, D. C. How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events. **Pigment cell & melanoma research**, v. 21, n. 1, p. 27-38, 2008.

BOHN, J.A.; BeMILLER, J.N. (1 α 4)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 28, p. 3-14, 1995.

BISCAIA, S.M.P. Atividades biológicas de células de melanoma murino (b16f10) por polissacarídeos obtidos dos gêneros *Pleurotus*, *Lentinus* e *Agaricus*. 2012. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular)- Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná. 2012.

BROWN, G.D.; HERRE, J.; WILLIAMS, D.L.; WILLMENT, J.A.; MARSHALL, A.S.J.; GORDON, S. Dectin-1 mediates the biological effects of β -glucans. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 197, n. 9, p. 1119–1124, 2003.

CARNEIRO-LEÃO, A.M.A.; BUCHI, D.F.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J.; OLIVEIRA, M.B.M. Cytotoxic effects against HeLa cells of polysaccharide from the lichen *Ramalinacelastri*. **Journal of Submicroscopy, Cytology and Pathology**, Bologna, v. 24, n. 4, p. 1-5, 1997.

Davies, H.; Bignell, G. R.; Cox, C.; Stephens, P.; Edkins, S.; Clegg, S.; Teague, J.; Woffendin, H.; Garnett, M. J.; Bottomley, W.; Davis, N.; Dicks, E.; Ewing, R.; Floyd, Y.; Gray, K.; Hall, S.; Hawes, R.; Hughes, J.; Kosmidou, V.; Menzies, A.; Mould, C.; Parker, A.; Stevens, C.; Watt, S.; Hooper, S.; Wilson, R.; Jayatilake, H.; Gusterson, B. A.; Cooper, C.; Shipley, J.; Hargrave, D.; Pritchard-Jones, K.; Maitland, N.; Chenevix-Trench, G.; Riggins, G. J.; Bigner, D. D.; Palmieri, G.; Cossu, A.; Flanagan, A.; Nicholson, A.; Ho, J. W. C.; Leung, S. Y.; Yuen, S. T.; Weber, B. L.; Seigler, H. F.; Darrow, T. L.; Paterson, H.; Marais, R.; Marshall, C. J.; Wooster, R.; Stratton, M. R.; Davis, N. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 949-954, 2002.

Demers, A.A.; Nugent, Z. Mihalciou', C. et al. Trends of nonmelanoma skin cancer from 1960 through 2000 in a Canadian population. **J Am Acad Dermatol**, v.53,p.320–328, 2005;.

DREYFUSS, J. L.; REGATIERI, C. V.; JARROUGE, T. R.; CAVALHEIRO, R. P.; SAMPAIO, L. O.; NADER, H. B. Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, p.409-429, 2009.

Dubas, L. E.; Ingraffea, A. Nonmelanoma skin cancer. **Facial plastic surgery clinics of North America**, v. 21, n. 1, p. 43-53, 2013.

Fagundo, E.; Rodríguez-García, C.; Rodríguez, C.; González, S.; Sánchez, R.; Jiménez, A. Analysis of Phenotypic Characteristics and Exposure to UV Radiation in a Group of

Patients With Cutaneous Melanoma. **ActasDermo-Sifiliográficas**, v. 102, n. 8, p. 599-604, 2011.

FORTES, R. C.; TAVEIRA, V. C.; NOVAES, M. R. C. G.. The immunomodulator role of β -D-Glucans as co-adjuvant for cancer therapy. **Rev. Bras. Nutr. Clin.**, 21(2): 163-168., 2006.

Gordon, R. Skin Cancer: An Overview of Epidemiology and Risk Factors. In: **Seminars in oncology nursing**. WB Saunders, 2013. p. 160-169.

Gray-Schopfer, V.; Wellbrock, C.; Marais, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851-857, 2007.

Israilides, C.; Kletsas, D.; Arapoglou, D.; Philippoussis, A.; Pratsinis, H.; Ebringerová, A.; Hríbalová, V.; Harding, S. E. *In vitro* cytostatic and immunomodulatory properties of the medicinal mushroom *Lentinula edodes*. **Phytomedicine**, v. 15, n. 6, p. 512-519, 2008.

INCA, **Incidência e Mortalidade por câncer no Brasil**. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=322>. Acesso em: 30 de novembro de 2013.

THULER, L.C.S. ABC do cancer: abordagens básicas para o controle do câncer. **Instituto Nacional do Câncer**. Rio de Janeiro. INCA, 2011.

Kuphal, S.; Palm, H. G.; Poser, I.; Bosserhoff, A. K. Snail-regulated genes in malignant melanoma. **Melanoma research**, v. 15, n. 4, p. 305-313, 2005.

LEVIN, B.; BOYLE, P. World Cancer Report 2008. **World Health Organization**. Lion, 2008.

LIU, Y.; LIU, C.; TAN, H.; ZHAO, T.; CAO, J.; WANG, F. Sulfation of a polysaccharide obtained from *Phellinus linteus* and potential biological activities of the sulfated derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 370–375, 2009.

MARUYAMA, S.; AKASAKA, T.; YAMADA, K.; TACHIBANA, H. Cistanche salsa extract acts similarly to protein-bound polysaccharide-K (PSK) on various types of cell lines. **Journal of Traditional Medicines**, Beijing, v. 25, p. 166-169, 2008.

MORETÃO, M.P. Propriedades Biomoduladoras da Arabinogalactana (ARAGAL) de *Anadenanthera colubrina* (Angico Branco). Curitiba, 2004. Tese de 89 Doutorado em Ciências Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

NOVAES, MRC Gs, Valadares F, Reis, MC, Goncalves D R, Marilia da Cunha Menezes, MC. The effects of dietary supplementation with Agaricales mushrooms and other medicinal fungi on breast cancer: Evidence-based medicine. **CLINICS**, 66(12):2133-2139, 2011.

SCHEPETKIN, I.A.; XIE, G.; KIRPOTINA, L.N.; KLEIN, R.A.; JUTILA, M.A.; QUINN, M.T. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Opuntia polyacantha*. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 8, p. 1455 – 1466, 2008.

Thetsrimuang, C.; Khammuang, S.; Chiablaem, K.; Srisomsap, C.; Sarnthima, R. Antioxidant properties and cytotoxicity of crude polysaccharides from *Lentinus polychrous*. *Lév. Food Chemistry*, v. 128, n. 3, p. 634-639, 2011.

YAN, J.; VETVICKA, V.; XIA, Y.; COXON, A.; CARROLL, M.C.; MAYADAS, T.N.; ROSS, G.D. β -Glucan, a "specific" biologic response modifier that uses antibodies to target tumors for cytotoxic recognition by leukocyte complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *Journal of Immunology*, Baltimore, n. 163, p. 3045–3052, 1999.

YANG, X.; ZHAO, Y.; LV, Y.; YANG, Y.; RUAN, Y. Protective effect of polysaccharide fractions from *Radix A. Sinensis* against tert-Butylhydroperoxide induced oxidative injury in murine peritoneal macrophages. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 40, n. 6, p. 928 – 935, 2007.

Yu, Z.; Ming, G.; Kaiping, W.; Zhixiang, C.; Liquan, D.; Jingyu, L.; Fang, Z. Structure, chain conformation and antitumor activity of a novel polysaccharide from *Lentinus edodes*. *Fitoterapia*, v. 81, n. 8, p. 1163-1170, 2010.

Zhang, M.; Cui, S. W.; Cheung; P. C. K.; Wang, Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science & Technology*, v. 18, n. 1, p. 4-19, 2007.

Zong, A.; Cao, H.; Wang, F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. *Carbohydrate polymers*, v. 90, n. 4, p. 1395-1410, 2012.

Wasser, S. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 60, n. 3, p. 258-274, 2002.