

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
ASSOCIAÇÃO AMPLA UEPG/UNICENTRO**

FELIPE DE OLIVEIRA MENDONÇA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL DE *Cordyceps militaris*
EM MEIO À BASE DE MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM
CAMUNDONGOS COM MELANOMA**

**PONTA GROSSA
2022**

FELIPE DE OLIVEIRA MENDONÇA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL DE *Cordyceps militaris*
EM MEIO À BASE DE MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM
CAMUNDONGOS COM MELANOMA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Giovani Marino Favero.

PONTA GROSSA

2022

M539 Mendonça, Felipe de Oliveira
Avaliação do efeito antitumoral de *Cordyceps militaris* em meio à base de melão de cana-de-açúcar em camundongos com melanoma / Felipe de Oliveira Mendonça. Ponta Grossa, 2022.
41 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Giovani Marino Favero.

1. Câncer. 2. Células b16f10. 3. Cogumelo. 4. Melão - cana. I. Favero, Giovani Marino. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. III.T.

CDD: 615.321



Ingressa com recursos públicos da UEPG por meio de

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



Associação Ampla entre a

Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta Grossa

ATA DE EXAME DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO 05/2022 DO MESTRANDO FELIPE DE OLIVEIRA MENDONÇA, REALIZADA NO DIA 14 DE JULHO DE 2022, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos quatorze dias do mês de julho de dois mil e vinte e dois, às 13h30, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em sessão aberta, na sala M115, Auditório do PPGCF, sob a presidência do Professor Doutor Giovani Marino Fávero, reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas do mestrando **FELIPE DE OLIVEIRA MENDONÇA**, na linha de pesquisa: Avaliação Clínico/Laboratorial de Processos Fitopatológicos, constituída pelo Professor Doutor Giovani Marino Fávero, demais Doutores (membros titulares): Felipe de Lara Janz (UEPG/PR) e Mauro Ricetti Paes (UNI-CESUMAR/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem o exame de defesa de dissertação de Mestrado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores, para arguição.

O título do trabalho foi: "AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL DE *CORDYCEPS MILITARIS* EM MEIO À BASE DE MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM CAMUNDONGOS COM *MELANOMA MURIN*".

Encerrada a defesa, a banca considerou APROVADO a Dissertação, considerada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. O aluno deverá entregar, no prazo de até 30 (trinta) dias, a versão definitiva da Dissertação de Mestrado, com as modificações sugeridas pelos membros da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário):

Alteração de título: sim não

Novo título: Avaliação do efeito antitumoral de Cordyceps militaris em meio à base de cana-de-açúcar em camundongos com melanoma.

Giovani Marino Fávero (UEPG/PR)

Presidente


Felipe de Lara Janz (UEPG/PR)
Titular


Mauro Ricetti Paes (UNI-CESUMAR/PR)
Titular

Ponta Grossa, 14 de julho de 2022.

Dedico esta dissertação aos meus pais, Miguel e Selma, à minha irmã Arlete Daiany que sempre me incentivaram e me apoiaram em todas as escolhas da minha vida e à minha avó Maria Rosa (*in memoriam*) por todo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por sempre me dar forças para encarar todas as dificuldades da vida.

À Profa. Dr. Juliana Bonametti Olivato, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UEPG, pelos conselhos e incentivo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Giovani Marino Favero, pela oportunidade concedida a mim, para que eu pudesse entrar no Mestrado, além da confiança. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney, por ceder as amostras teste para que eu pudesse realizar os experimentos.

Ao Prof. Dr. Leandro Cavalcante Lipinski, pela amizade e todo auxílio técnico com os animais.

À técnica do Laboratório Multiusuários da UEPG (LABMU-SEBISA), Janaína Emiliano, pelo auxílio no processo de cultura celular.

À técnica do laboratório de Farmacognosia da UEPG, Luciane Mendes Monteiro, pela parceria, as longas horas de conversa no laboratório e a prontidão no auxílio com materiais.

À querida técnica de Biotério do Núcleo Avançado de Estudos da Vida (NAEVI) da UEPG, Marilene Terezinha Barbosa, por todas as conversas, amizade e apoio, além de todo auxílio com os animais.

À minha querida amiga Maria Luísa Cerri, pelo preparo das amostras para os experimentos farmacológicos, além da amizade e as palavras de incentivo.

À minha querida amiga Ana Beatriz Klosowski, pelos conselhos, pelas orações, por compartilhar seus conhecimentos e pelas colaborações no desenvolvimento deste trabalho.

À minha querida amiga Camila Dias Machado, pelas conversas, à nossa amizade, por compartilhar seus conhecimentos e pelas colaborações no desenvolvimento deste trabalho.

À minha querida aluna de Iniciação Científica, Gabriela Ruva Fagundes, que cedeu seu tempo para poder me ajudar, sendo com quem pude compartilhar bons momentos e vários aprendizados ao longo deste Mestrado.

Aos prof. Dr. Felipe de Lara Janz e prof. Dr. Mauro Ricetti Paes, pela disposição em contribuir construtivamente para a melhoria deste trabalho.

Aos meus amigos, Bruna Maria Palotino Ferreira, Marilú Swiech, Ketlin Bonnet Bomfim e Vanessa de Fátima Bueno pelo incentivo e nossa amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UEPG, que tornaram possível a realização desta dissertação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de pesquisa de suma importância para realização deste estudo.

Aos meus pais, Miguel de Oliveira Mendonça e Selma Ap^a de Oliveira Mendonça e minha irmã Arlete Daiany pelo apoio e incentivo em sempre estudar, mais e mais.

Aos professores da UEPG, pelo ensino, dedicação e as excelentes aulas durante a pós-graduação e, em especial a professora Dr^a Dionizia Xavier Scomparin por me apresentar o mundo da pesquisa científica, durante a iniciação científica, na graduação.

E, a todos que de alguma forma colaboraram direta e indiretamente para a execução deste trabalho, muito obrigado!

“Por mais longa que seja a caminhada o
mais importante é dar o primeiro passo.”

(Vinícius de Moraes)

RESUMO

O melanoma cutâneo é um tipo de câncer que pode ser letal, com um pior prognóstico quando não é tratado no início dos primeiros sintomas da doença. O fungo medicinal do tipo *Cordyceps militaris* é uma fonte abundante de produtos naturais, constituído de diversos componentes ativos (polissacarídeos, adenosina, ergosterol etc.) e em especial a cordicepina, tendo efeito antioxidante. Embora as diversas formas de tratamento tenham sido bem estabelecidas na literatura, ainda não se sabe se existe efeito antitumoral no extrato de *Cordyceps militaris* em meio alternativo à base de melação de cana-de-açúcar em modelo experimental *in vivo*. Portanto, nosso objetivo foi mensurar o efeito do sobrenadante com *Cordyceps militaris* sobre a diferenciação biométrica e a progressão tumoral em camundongos com melanoma murino, além de avaliar se essas atividades antitumorais possuem impacto farmacológico na pesquisa clínica/laboratorial. Para isso, utilizamos quatro grupos de animais implantados com células B16F10 onde dividiu-se, três grupos: tratados com injeções diárias de uma das três doses distintas do sobrenadante e um grupo: controle (sem tratamento) e avaliamos dados quantitativos utilizando o software GraphPad Prism® (versão 7.05). Após análises da progressão da massa corporal, identificamos que a partir da terceira semana, o grupo tratado com a alta concentração do sobrenadante, obteve o menor peso em relação ao grupo controle e manteve a tendência de aumento, de forma gradual, da massa corporal. Além disso, observamos que os três diferentes grupos tratados, mostraram um crescimento tumoral mais lento, a partir do quarto dia de tratamento, independente da dose, quando comparados com o grupo não tratado. Nossos resultados indicam que administração das doses baixa e média ($p < 0,008$ e $p < 0,01$, respectivamente) dos sobrenadantes se mostraram significativamente distinguíveis na diminuição do volume tumoral final, quando comparados ao grupo de animais controle. Por fim nosso estudo mostra pela primeira vez que pode ser relevante investigar que o sobrenadante de *Cordyceps militaris* em meio à base de melação de cana-de-açúcar é promissor para gerar outros, possíveis, tratamentos relevantes para o desenvolvimento e progressão tumoral.

Palavras-Chave: Câncer. Células B16F10. Cogumelo. Melação de cana.

ABSTRACT

Cutaneous melanoma is a type of cancer that can be lethal, with a worse prognosis when it is not treated at the onset of the first symptoms of the disease. The medicinal fungus of the *Cordyceps militaris* type is an abundant source of natural products, consisting of several active components (polysaccharides, adenosine, ergosterol, etc.) and cordycepin, which has an antioxidant effect. Although the different forms of treatment have been well established in the literature, it is not yet known whether there is an antitumor effect of *Cordyceps militaris* extract in an alternative medium based on sugarcane molasses in an *in vivo* experimental model. Therefore, our objective was to measure the effect of *Cordyceps militaris* supernatant on biometric differentiation and tumor progression in mice with murine melanoma, in addition to evaluating whether these antitumor activities have a pharmacological impact on clinical/laboratory research. For this, we used four groups of animals implanted with B16F10 cells, which were divided into three groups: treated with daily injections of one of the three different doses of the supernatant and a group: control (no treatment) and we evaluated quantitative data using the GraphPad Prism software. ® (version 7.05). After analyzing the progression of body mass, we identified that from the third week onwards, the group treated with the high concentration of supernatant obtained the lowest weight in relation to the control group and maintained the trend of gradually increasing body mass. Furthermore, we observed that the three different treated groups showed slower tumor growth from the fourth day of treatment, regardless of dose, when compared to the untreated group. Our results indicate that administration of low and medium doses ($p < 0.008$ and $p < 0.01$, respectively) of the supernatants were significantly distinguishable in the reduction of the final tumor volume, when compared to the group of control animals. Finally, our study shows for the first time that it may be relevant to investigate that *Cordyceps militaris* supernatant in sugarcane molasses-based medium is promising to generate other, possible, treatments relevant to tumor development and progression.

Keywords: Cancer. B16F10 cells. Mushroom. Cane molasses.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1	MELANOMA	12
2.1.1	Modelos experimentais para estudos de melanoma	13
2.1.2	Tratamentos de melanoma	14
2.2	GÊNERO E ESPÉCIES DE <i>Cordyceps</i> SPP.	15
2.2.1	<i>Cordyceps militaris</i>	16
2.2.2	Melaço e meio de cultivo líquido de <i>C. militaris</i>	17
3	OBJETIVOS	19
3.1	OBJETIVO GERAL	19
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4	MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1	SUBSTÂNCIA TESTE	20
4.2	CULTURA CELULAR DA LINHAGEM B16F10	20
4.3	AVALIAÇÃO <i>in vivo</i>	22
4.3.1	Manutenção dos camundongos	22
4.3.2	Aspectos éticos	22
4.3.3	Implantação das células tumorais	23
4.3.4	Tratamento e grupos experimentais	24
4.3.5	Parâmetros biométrico e macroscópico	26
4.3.6	Análise estatística	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1	EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	28
5.1.1	Massa corporal dos camundongos com melanoma	28
5.1.2	Análise do volume tumoral	30
6	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS	36
	ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	40

1 INTRODUÇÃO

Melanoma é o mais letal tipo de câncer na pele e mesmo que comumente seja referido como “câncer de pele”, o melanoma é uma malignidade dos melanócitos, ou seja, o aumento do crescimento do número de células que produzem unidades produtoras de melanina, o pigmento em toda epiderme, inclusive nos órgãos internos (SUN *et al.*, 2019). As células malignizadas movem-se do tumor primário e são capazes de atingir uma série de fases do processo de metástase (LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017).

Como consequência do aumento do processo de neoplasias, aberrações genéticas – tais como, favorecimento de subpopulações com diferentes capacidades celulares, proliferação anormal, capacidade de invasão – são mais prováveis de acionar o processo metastático, acarretando um grande obstáculo clínico (CHIBA *et al.*, 2017; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Avanços científicos dos últimos anos trouxeram um relevante aumento na sobrevivência de pacientes com melanoma metastático, em razão do desenvolvimento de inúmeras imunoterapias convencionais (inibidores de PD-1 e CTLA-4, por exemplo) mas, mesmo que existam progressos no tratamento de melanoma metastático, ele ainda é um grande desafio (DOMINGUES *et al.*, 2018). Desta forma, a busca de possíveis novas terapias que solucionem esses obstáculos é de grande relevância.

Nesse contexto, os cogumelos são um grupo promissor de fungos medicinais com bioatividades antitumorais, pois eles apresentam biomoléculas com citotoxicidade seletiva em diversas células tumorais, influenciam o ciclo celular, reduzem a migração e invasão celular, modulam a proliferação e progressão das células tumorais, produzindo efeitos benéficos no tratamento oncológico (KHAN *et al.*, 2019; RAMACCIATO *et al.*, 2007).

Por meio das possíveis fontes de obtenção, o fungo medicinal do tipo *Cordyceps militaris* é uma fonte abundante de produtos naturais, constituído de diversos tipos de componentes ativos (polissacarídeos, adenosina, ergosterol etc.) e, a cordicepina (efeito antioxidante), visto que há outra espécie de *Cordyceps* spp. (GU *et al.*, 2007; WON; PARK, 2005). *C. militaris* apresenta propriedades antioxidantes, com maior efeito inibitório sobre a peroxidação lipossômica (processo que contribui para degradação celular), alterações na sinalização celular, danos em proteínas e citotoxicidade (ASHRAF *et al.*, 2020).

A forma de frutificação deste cogumelo, necessita de diferentes fases de luz, além de longo tempo e, como alternativa este trabalho propõe utilizar o sobrenadante, feito de forma simples e ágil, para o alcance de componentes bioativos, com possível efeito antitumoral. O melaço é uma fonte abundante de carboidratos (sacarose), além de vitaminas e minerais, sendo uma ótima fonte de nutrientes para produção de compostos bioativos de *C. militaris*.

Neste contexto, o presente trabalho buscou explorar as possíveis atividades antitumorais de *Cordyceps militaris* extraído do cultivo em meio à base de melaço de cana-de-açúcar, a partir do meio líquido, em camundongos com melanoma experimental. A proposta de utilizar o sobrenadante com *C. militaris* em meio à base de melaço de cana em modelo de melanoma murino *in vivo* é inédita na literatura científica. Esse modelo de melanoma foi empregado evidenciando atividades antitumorais promissoras e expandindo o conhecimento das possíveis propriedades farmacológicas desse sobrenadante.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MELANOMA

O câncer é uma doença instigante, apavorante e o principal problema de saúde pública a nível mundial, definido pela multiplicação e disseminação desordenada de células anormais, em diversos tecidos. Por não ser causado por alguma entidade estranha ao nosso corpo, como acontece em doenças infecciosas, por exemplo, os agentes de extermínio são as células humanas que foram seletivamente recrutadas, e transformadas em organismos patológicos desenvolvedores de tumores, ocorrendo processos neoplásicos, ou seja, as células perdem a capacidade de diferenciação e toma-se poder de invasão e metástases (HAUSMAN, 2019).

Desta forma, metástases são as principais causas de morte relativas ao câncer, pois há um deslocamento da doença de um órgão ou parte dele para outro, que pode não ser diretamente ligado a ele. Entre os tipos de cânceres, o melanoma cutâneo é uma neoplasia que tem crescimento rápido, infiltrativo e é altamente lesivo (ISOLA; EDDY; CHEN, 2016).

O melanoma é considerado o câncer de pele com maior agressividade, sendo um dos tumores com maior taxa de letalidade no estágio avançado e dentre os fatores que podem levar a essa neoplasia, pode-se citar: histórico familiar, doença genética pela sensibilidade à radiação ultravioleta, imunossupressão etc. (SIEGEL *et al.*, 2021).

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), em 2020 os casos de melanoma no estado do Paraná atingiram um percentual bruto de incidência de 4,09 para cada 100 mil homens e 5,35 para cada 100 mil mulheres. A principal forma terapêutica para o melanoma cutâneo é cirúrgica, com a ressecção da lesão e com dissecação do linfonodo, pois pode levar a remissão completa do paciente.

Como adjuvantes ao tratamento podem ser utilizadas radioterapia, terapias imunológicas sistêmicas, terapias direcionadas a moléculas e quimioterapia, mas pouco satisfatórias e com diversos efeitos colaterais (WADA-OHNO; ITO; FURUE, 2019). A etiologia do melanoma é complexa, assim como em outras neoplasias, onde o fator genético é o mais prevalente, mas há diversos fatores de risco, com aberrações epigenéticas e exposição a agentes ambientais (solar e luz ultravioleta) em excesso (MACKIE; FREUDENBERGER; AITCHISON, 1989).

O melanoma maligno forma-se nos melanócitos que se transformam em células cancerosas após alterações celulares e moleculares, sendo um evento complexo. Pois, a difusão dos melanócitos originam-se na crista neural e no período de desenvolvimento embrionário se diferenciam em melanoblastos, após invasão da derme, penetram nos vasos sanguíneos e linfáticos e aderem ao tecido alvo, a epiderme (WALKER; HAYWARD, 2002).

Células de melanoma apresentam índices menores de apoptose (morte celular programada) espontânea *in vivo*, ou seja, dentro de um organismo vivo em comparação a outras células neoplásicas, sobretudo demonstram objeção quando induzidas a apoptose por processos biológicos fora de um organismo vivo, em ambiente controlado por agentes químicos (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007; SOENGAS; LOWE, 2003).

2.1.1 Modelos experimentais para estudos de melanoma

Modelos experimentais que reproduzam o início, além da progressão de distúrbios humanos são primordiais na pesquisa biomédica e farmacêutica para poder preencher a lacuna entre a ciência básica e o tratamento de doenças. As linhagens celulares tumorais têm sido muito utilizadas por pesquisadores, pois elas permitem esclarecer quais processos ocorrem na doença de forma rápida, apesar de existir poucos modelos animais para metástase tumoral, a linhagem celular de melanoma de camundongo B16 é muito popular.

A linhagem celular B16F10, foi retratado pela primeira vez por Fidler (1973) e, é originária de um tumor espontâneo de melanoma em camundongos C57BL6/J. B16F10 é uma linhagem celular com alta capacidade metastática e com credibilidade na área da imunologia e fisiologia, sendo adequada para modelos de ensaios experimentais (LIU *et al.*, 2018).

É crescente a utilização dos modelos experimentais de melanoma murino, ou seja, com o implante das células tumorais de melanoma. O modelo para estudos *in vivo* são os modelos animais com camundongos e têm constituído avanços consideráveis no esclarecimento da patologia, simulando a doença humana, e atendendo a requisitos histopatológicos e imunológicos (CORICOVAC *et al.*, 2018).

Camundongos C57BL6/J, isogênicos são imunocompetentes e considerados como uma ferramenta útil para pesquisas de melanoma, pois conseguem originar o

melanoma murino e as metástases em curto período após a inoculação, devido à sua interação entre melanócitos, células imunes e células B16F10 (LIU *et al.*, 2018).

2.1.2 Tratamentos de melanoma

Em pacientes diagnosticados com melanoma primário, a remoção cirúrgica do(s) tumor(es) propicia a chance de cura definitiva. Já, o melanoma em estágio avançado é de difícil tratamento em razão da metástase, resistente à maioria dos diferentes tipos de tratamento.

Nos últimos anos, muito progresso foi feito acerca do tratamento do melanoma. Estudos, mostraram que o tratamento com Sorafenibe (BAY 43-9006), uma droga inibidora de multiquinases, resultou na inibição da proliferação de células de melanoma *in vitro* e *in vivo* (KARASARIDES *et al.*, 2004). Mas, no ensaio clínico randomizado (Fase 2) com Sorafenibe, pouca ou nenhuma atividade antitumoral foi vista em pacientes com melanoma avançado (EISEN *et al.*, 2006).

A imunoterapia de bloqueio de checkpoint imunológico utiliza o próprio sistema imunológico do paciente para atacar as células cancerosas obtendo uma forte resposta antitumoral, imunidade e sobrevivência a longo prazo (EGGERMONT, 2013). Nesse sentido, o uso de interferon (IFN), interleucina-2 (IL-2) e Bacillus- Calmette-Guerin (BCG) foram relatados para o tratamento de melanoma (RIBAS; WOLCHOK, 2018; EDDY; CHEN, 2020).

Inicialmente, essas imunoterapias não eram específicas, porém, recentemente, aumentou a utilização de imunoterapias direcionadas com anticorpos monoclonais que bloqueiam moléculas de checkpoint imunológico, como proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4), proteína 1 de morte celular programada (PD-1), além de ligante 1 de morte programada (PD-L1) e terapias de células T (EDDY; CHEN, 2020; BOMMAREDDY; SHETTIGAR; KAUFMAN, 2018; WALDMAN; FRITZ; LENARDO, 2020). Essas novas imunoterapias mostraram respostas imunes antitumorais consideráveis na sobrevivência, mas, eles beneficiam apenas um subconjunto de indivíduos.

2.2 GÊNERO E ESPÉCIES DE *Cordyceps* SPP.

Cordyceps spp. constituem um grupo de fungos e, é o mais diverso gênero classificado na família Clavicipitaceae quanto ao número de espécies, sua morfologia e a diversificação em seu hospedeiro, apresentando mais de 750 espécies identificadas. É conhecido como o fungo parasita do filo ascomicetes com a maioria das espécies atuando como endoparasitoides principalmente em insetos e alguns artrópodes, produzindo seus esporos em estruturas reprodutoras (SUNG *et al.*, 2011).

Todas as espécies de *Cordyceps* spp. desenvolveram em seu ciclo de vida o mecanismo de invadir seu hospedeiro, infectando insetos com seus esporos e crescem neles. Tradicionalmente, a maioria das espécies de *Cordyceps* spp. são cultivadas ou colhidas por seu micélio e ascocarpo (corpo frutificante do fungo) (OLATUNJI *et al.*, 2018).

Muitas espécies do gênero *Cordyceps* spp. são amplamente considerados e reconhecidos por terem inúmeras aplicações alimentícias e no uso medicinal. Inúmeras atividades farmacológicas têm sido atribuídas a esta espécie, como hipoglicemiante, anti-inflamatória, antitumoral, antibacteriana, antifúngica, ativação de macrófagos, antimicrobiana, antioxidante, imunoprotetora etc. (DAS *et al.*, 2010; REIS *et al.*, 2013).

Dentre as mais de 750 espécies de *Cordyceps* spp., apenas 35 espécies foram empregadas como tratamento na medicina popular onde, uma dessas espécies da medicina tradicional chinesa, japonesa e coreana é o *Cordyceps militaris*, sendo o segundo mais popular e estudado no gênero *Cordyceps* spp. (OLATUNJI *et al.*, 2018).

2.2.1 *Cordyceps militaris*

C. militaris é conhecido como 'fungo laranja da lagarta' (Figura 1), ele é usado nos países do leste asiático como medicina popular e tem sido considerado um substituto mais acessível para *C. sinensis*. A espécie *C. militaris* adaptou-se aos cultivos laboratoriais, tornando-se popular na pesquisa internacional, pois pode ser cultivado em meio líquido e/ou em meio sólido e adapta-se em várias fontes de carbono, por exemplo (CERRI, 2021).

Figura 1 – Detalhe do Fungo *Cordyceps militaris* em lagarta.



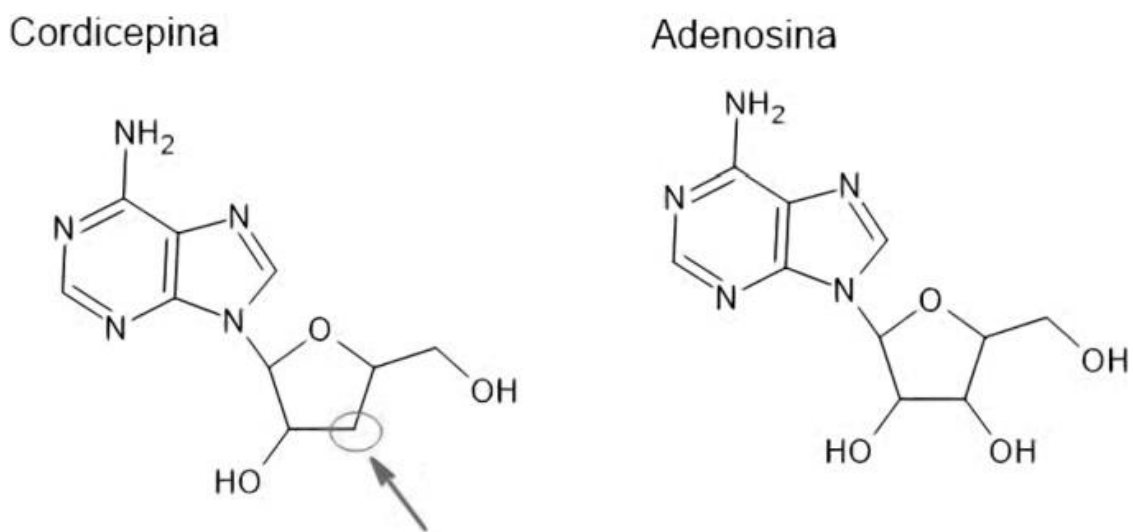
Fonte: ZHENG *et al.* (2011).

A principal molécula bioativa presente em *C. militaris* é a cordicepina, enquanto outros compostos bioativos como ergosterol, adenosina e vários polissacarídeos também foram isolados do fungo, sobretudo, a extração do *C. militaris* da natureza não é possível devido à sua necessidade de um hospedeiro e ambiente específicos para seu crescimento, porém a cultura em meio líquido, cultivada em laboratório, forma o micélio de forma rápida e tem menos possibilidades de ocorrer contaminação (ZHENG *et al.*, 2019; CUI, 2015).

A molécula bioativa cordicepina (C₁₀H₁₃N₅O₃), conhecida como 3'-desoxiadenosina, é um nucleosídeo de purina primeiramente isolado por Cunningham *et al.* (1951) com base em uma colônia de *C. militaris*, onde, a principal diferença entre

adenosina e cordicepina está na ausência de uma hidroxila no carbono 3 da ribose (Figura 2). Além disso, é considerada um antimetabólito, ou seja, por ser semelhante à um metabólito necessário, acontece a inibição. No organismo, ela pode ser reconhecida, mas não o suficiente para manter as funções normais em nível celular (replicação celular e apoptose - morte celular, por exemplo) (CERRI, 2021).

Figura 2 – Estrutura molecular da cordicepina e da adenosina com destaque para ausência da hidroxila na cordicepina.



Fonte: Cerri (2021).

2.2.2 Melaço e meio de cultivo líquido de *C. militaris*

Há duas maneiras de cultivo líquido comumente utilizadas para o *C. militaris*, por meio dos cultivos líquido submerso e líquido de superfície. O cultivo líquido submerso caracteriza-se pela troca de gases – aeração, de forma vigorosa por meio de agitadores, que podem variar de 110 a 300 rpm (SINGH TULI; SHARMA; SANDHU, 2014). Já, a metodologia do cultivo líquido de superfície é caracterizada em mantê-lo estático em uma incubadora de demanda bioquímica de oxigênio, obtendo-se maior quantidade de cordicepina (WONGSA *et al.*, 2020).

Nesse sentido, o melaço de cana é um líquido de consistência glutinosa (viscoso) e de cor escura, sendo um subproduto da indústria de sacarose. Por ter um valor acessível e por ter uma alta disponibilidade de produção, o melaço se tornou uma matéria prima de diversas formas de uso na indústria farmacêutica. Um estudo

utilizou o melaço de cana de açúcar como parte do meio de cultivo para produção de carotenoides por *Mucor circinelloides* (ANJOS, 2013).

No melaço, há alta quantidade de açúcar, sendo a sacarose como seu principal constituinte. Contendo percentual entre 2,5 e 4,5 % de compostos nitrogenados em sua composição e os componentes mais comuns são: ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina, guanina, glicina, leucina etc. (WOICIECHOWSKI *et al.*, 2013).

Estudos, utilizaram otimizações em meios de cultivo contendo melaço para *C. sinensis*, objetivando a produção de polissacarídeos; na composição do seu meio há: sacarose, sulfato de magnésio, extrato de levedura, cloreto de cálcio, cloreto de amônio, entre outros (HSIEH *et al.*, 2005; CHA *et al.*, 2007). Não foram encontradas otimizações de meios contendo alternativamente melaço fermentados pelo *Cordyceps militaris*, visando os potenciais efeitos da cordicepina nesse meio.

Nesse sentido, há uma urgência na investigação de possíveis novas terapias individuais com mais eficiência, que independentemente ou em associações possam gerar terapias que atuem de forma mais efetiva acerca do melanoma, estimulando o aumento da possibilidade de cura e o tempo de sobrevivência, portanto é importante tornar claro os eventos que ocorrem na gênese do tumor frente à otimização no uso de fungos medicinais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do sobrenadante em meio a base de melaço de cana-de-açúcar com fungo *Cordyceps militaris* sobre a progressão tumoral de camundongos com melanoma.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a diferenciação do parâmetro biométrico da massa corporal de camundongos tratados relacionando com animais não tratados.
- ✓ Avaliar o efeito antitumoral do parâmetro macroscópico de desenvolvimento do tumor durante todo o período experimental.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SUBSTÂNCIA TESTE

O presente estudo trata-se de uma pesquisa aplicada e experimental. Para o experimento, foi utilizado o sobrenadante da produção da Cepa *Cordyceps militaris* em meio a base de melação de cana, a partir de cultivo de 60 dias no meio.

Inicialmente, a manutenção do fungo foi feita em ágar dextrose de batata (PDA) a 25°C, por sete dias. Posteriormente, foi retirado da placa de PDA um disco de 5 mm de diâmetro, contendo o fungo e, foi inoculado com o meio líquido a base de melação. O meio líquido foi composto por: sacarose do melação diluído em água, extrato de levedura, fosfato de potássio e peptona, tendo o pH ajustado para 7 com ácido fosfórico, logo foi esterilizado em autoclave por 30 minutos a 121°C. As amostras permaneceram, sem iluminação, em estufa incubadora de demanda bioquímica de oxigênio por 60 dias, a 25°C (CERRI, 2021).

A partir do cultivo do fungo no meio à base de melação de cana, foi realizada uma filtração à vácuo em filtro de gramatura 80 g/m², separando-se o micélio do meio líquido. O meio líquido filtrado será designado de sobrenadante. A Cepa CMIB-202 encontra-se depositada na Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico (CMIB) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), sede Ponta Grossa/PR.

O sobrenadante, foi cedido pela equipe liderada pelo Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney, do departamento de Biotecnologia da UTFPR. A substância teste foi preservada em tubos do tipo falcon e mantidas sob refrigeração, doses do sobrenadante em diferentes concentrações (0,3 mL, 0,6 mL e 0,9 mL) foram filtradas em filtro polipropileno de 70 µm (EASYstrainers, Greiner Bio-One Brazil Ltda, Americana, SP, Brasil) no momento da aplicação nos camundongos.

4.2 CULTURA CELULAR DA LINHAGEM B16F10

A cultura de tecidos da linhagem tumoral melanoma murino B16F10, ATCC CRL-6475®, foram adquiridos da American Type Culture Collection (ATCC), USA. Estas células foram cultivadas no Laboratório de Farmacologia do Departamento Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

Todo o protocolo do trabalho foi realizado em condições assépticas, em capela de fluxo laminar com lâmpada ultravioleta (Biosafe PlusA2 classe 11, VECO®), com materiais estéreis. As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Vitrocell®, Campinas, São Paulo); suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) adquirido de Vitrocell®, Campinas, São Paulo. No cultivo foi utilizada uma solução de antibióticos a 1%, ou seja, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco®, ThermoFisher Scientific).

Inicialmente, as células de melanoma murino B16F10 eram estocadas e congeladas em freezer de ultrabaixa temperatura (-80° C), em pequenas alíquotas dentro de frascos criogênicos estéreis de 2 mL, fundo em “u” e com tampas de rosca interna (KASVI®). Para descongelá-las, o frasco criogênico foi retirado do ultra freezer e aquecido, sem agitação, em banho-maria a 37° C.

Concluído o descongelamento, o frasco criogênico era borrifado com álcool etílico 70% e seu conteúdo transferido para um tubo de centrifugação (tipo falcon) de 50 mL, de polipropileno e fundo cônico (KASVI®), com 10 mL de meio completo. O tubo foi centrifugado (Bio Eng BE-4004, Labstore®) por 5 minutos a 1.200 rotações por minuto (rpm). O sobrenadante foi desprezado e todo o excesso do tubo aspirado com auxílio de uma pipeta sorológica Pasteur.

Eram adicionados 10 mL de meio completo ao tubo. As células foram desprendidas suavemente, batendo-se o tubo na palma da mão, e transferidas para a garrafa de cultura celular. O conteúdo da garrafa era homogeneizado suavemente, observado em microscópio invertido (Carl Zeiss®) e, a seguir, a garrafa foi mantida em estufa (Isotemp - Fisher Scientific®) a 37°C, com uma atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂); as garrafas eram de polietileno estéreis de 175 cm e, mantidas com a tampa do tipo “vent.” entreaberta (KASVI®).

A garrafa era observada no microscópio invertido diariamente. O meio de cultura era trocado a cada 3 dias, se houvesse mudança acentuada do pH do meio (variação da coloração do róseo para o alaranjado). Esse era descartado e substituído por 10 mL do meio novo, com leve movimentação do conteúdo da garrafa, em seguida observado novamente em microscópio invertido. A garrafa foi colocada novamente na estufa de CO₂.

Estas células foram mantidas por expansão contínua para posterior realização do experimento *in vivo*.

4.3 AVALIAÇÃO *in vivo*

4.3.1 Manutenção do camundongos

Foram utilizados trinta e seis camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6, tanto fêmeas como machos, com aproximadamente 25 ± 6 gramas de peso e com 22 a 26 semanas de vida. Os animais foram alojados no Núcleo Avançado de Estudos da Vida (NAEVI) da UEPG, em sala climatizada a temperatura constante de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, sob ciclo de iluminação claro e escuro de 12 horas controlado automaticamente.

Foram mantidos em caixas plásticas de polipropileno padrão para camundongo (30 x20 x 13 cm) com tampas gradeadas, com um número máximo de 4 animais por caixa. As caixas eram limpas diariamente, com troca da maravalha e alimentação. A alimentação de livre acesso consistiu em ração padrão para camundongo (Nuvilab®) e água fresca, permanentemente.

4.3.2 Aspectos éticos

O manejo dos roedores obedeceu às normas de conduta com pesquisa animal e foram realizados após a autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UEPG. O protocolo experimental foi previamente submetido à análise e aprovado pela CEUA-UEPG, sob o número do processo 19.0000.24777-6. (ANEXO A).

4.3.3 Implantação das células tumorais

A linhagem de células B16F10 (melanoma murino) foram cultivadas de acordo com o descrito no item 4.2 até confluência (ocupação celular densa na superfície da garra), ou seja, a garrafa ficava repleta de células. O meio de cultura com aproximadamente 50% de confluência foi removido com o auxílio de uma pipeta sorológica Pasteur.

A seguir, foi adicionado 2 mL de solução de Tripsina-EDTA 0,25% (LCG Biotecnologia®) aquecida em banho maria a 37° C. As células eram desprendidas, batendo-se suavemente contra a palma da mão e observadas no microscópio invertido. Logo, as células foram ressuspensas, lavadas com meio RPMI- 1640, transferidas para um tubo de centrifugação (tipo falcon) de 50 mL e centrifugadas a 1.200 rpm por 5 minutos.

As células viáveis eram contadas em câmara de Neubauer espelhada (KASVI®) na concentração de 5×10^4 células (número de células para inoculação em cada animal de experimentação) para cada mL. Após, as células eram imediatamente inoculadas nos camundongos.

Os camundongos foram submetidos à contenção manual e a injeção foi feita via subcutânea (s.c.) na região dorsal direita, com seringa de 1 mL e agulha hipodérmica (13 x 0,3 mm) (Figura 3). Foi inoculado em cada camundongo 5×10^4 células B16F10 em 0,5 mL e, foram acompanhados diariamente, observando-se suas condições clínicas, desde o momento da inoculação até a sua morte.

Aos 14 dias de inoculação das células e visualização da formação de um tumor palpável, os animais foram divididos randomicamente em grupos experimentais.

Figura 3 – Detalhe da técnica de inoculação subcutânea das células de melanoma murino B16F10 na região dorsal do camundongo C57BL/6.



Fonte: O autor.

4.3.4 Tratamento e grupos experimentais

O tratamento com o sobrenadante do fungo *Cordyceps militaris* em meio a base de melaço de cana foi iniciado no 14º do implante tumoral, uma vez ao dia, no período da manhã, via intraperitoneal (i.p.), durante 11 dias consecutivos e utilizando

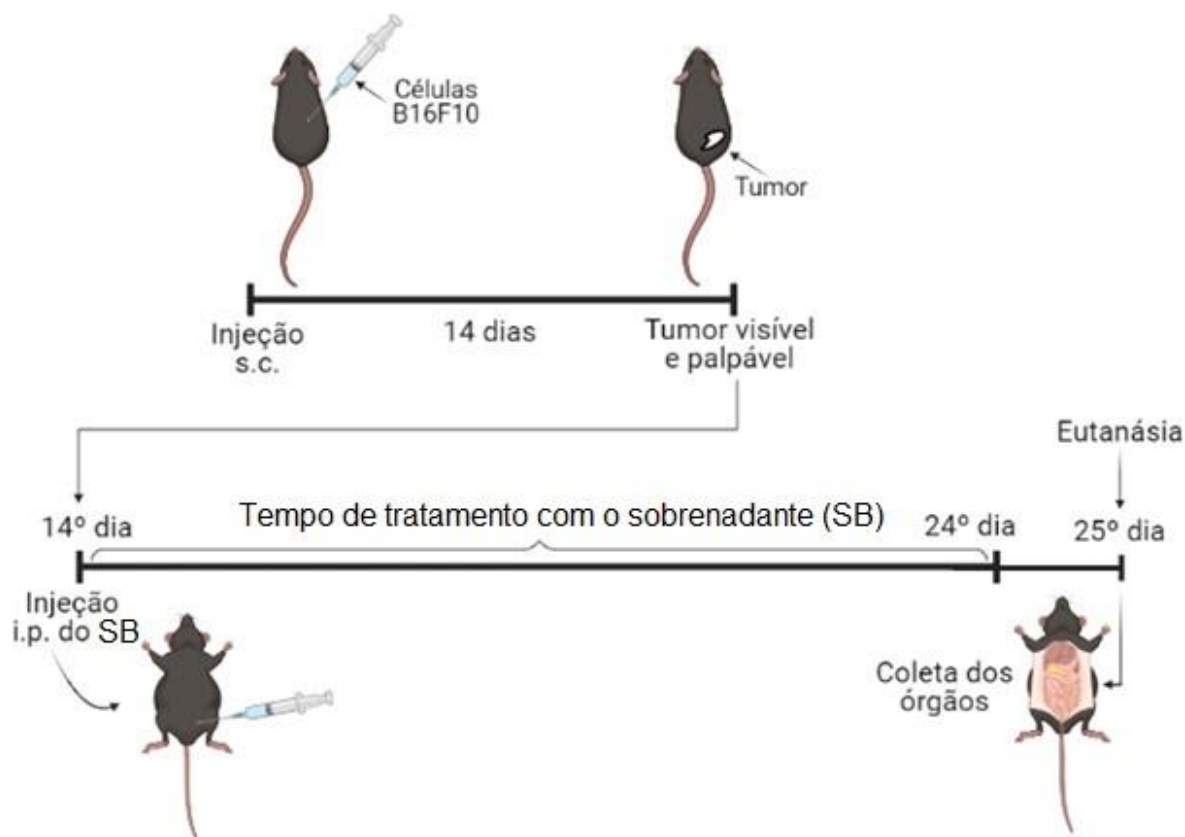
um n de 9 camundongos C57BL/6, por grupo. Os animais inoculados com 5×10^4 células B16F10 foram randomicamente divididos nos seguintes grupos experimentais:

- 1) Grupo Controle: camundongos que não recebiam o tratamento.
- 2) Grupo SB 0,3: camundongos que recebiam o tratamento (i.p.) do sobrenadante, na dose de 0,3 mL / animal / por dia.
- 3) Grupo SB 0,6: camundongos que recebiam o tratamento (i.p.) do sobrenadante, na dose de 0,6 mL / animal / por dia.
- 4) Grupo SB 0,9: camundongos que recebiam o tratamento (i.p.) do sobrenadante, na dose de 0,9 mL / animal / por dia.

Simultaneamente ao tratamento, os tumores dorsais foram medidos com auxílio de um paquímetro.

Os animais foram acompanhados por um período de 24 dias após a inoculação das células tumorais de melanoma (14 dias da inoculação + 11 dias de tratamento (iniciado no 14º dia)) e após este período, no vigésimo quinto dia, foram eutanasiados por anestesia inalatória com Isoflurano®, em seguida do deslocamento cervical e, logo depois, realizado a necrópsia e foram retiradas amostras dos tumores dorsais e os seguintes órgãos: fígado, pulmão e coração para posteriores análises histológicas (Figura 4).

Figura 4 – Linha do tempo referente à realização dos ensaios da avaliação *in vivo*.



Fonte: O autor.

4.3.5 Parâmetros biométrico e macroscópico

Seguidamente ao desenvolvimento visível e palpável do tumor dorsal implantado, em torno de 14 dias após a injeção das células B16F10, a massa corporal (g) e o volume tumoral (mm) foram mensuradas. A avaliação do parâmetro biométrico da massa corporal dos camundongos é um critério indispensável para determinar a estimativa do ganho e/ou perda da massa corporal em relação à resposta ao tratamento, ou seja, pode-se acompanhar o processo do desenvolvimento de caquexia, por exemplo (OTAKE *et al.*, 2010).

Foi calculado o ganho de peso dos camundongos durante o tratamento, através da diferença entre o peso da massa corporal final (no 24º dia) e o peso da massa corporal inicial (no 14º dia). A pesagem da massa corporal dos camundongos, foi realizada diariamente em balança digital (BEL Engineering®, Piracicaba, SP, Brasil), sempre no mesmo horário, durante todo o tratamento.

O parâmetro macroscópico do crescimento tumoral foi avaliado com o auxílio

de um paquímetro (calibrador deslizante), para as medidas no sentido longitudinal e transversal do tumor (duas medidas), por 11 dias, com início no décimo quarto dia até o fim do experimento. Foi calculado e obtido o volume tumoral, através da seguinte fórmula (KATO *et al.*, 1994):

$$\text{Volume tumoral (mm}^3\text{)} = 0,5 \times A \times B^2, \text{ onde:}$$

“A” é o diâmetro longitudinal e “B” é o diâmetro transversal.

4.3.6 Análise estatística

Foi utilizado o software de programa estatístico GraphPad Prism® (versão 7.05) para elaborar os gráficos (figuras 5, 6 e 7) deste trabalho, inclusive a média \pm erro padrão da média e a significância dos dados de 5% ($p < 0,05$). Para os ensaios, os resultados obtidos foram submetidos ao teste ANOVA de uma e/ou duas vias, com pós teste pelas técnicas sequenciais de Tukey (comparações múltiplas) ou Bonferroni.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

5.1.1 Massa corporal dos camundongos com melanoma

Inicialmente, as estimações do peso corporal de todos os camundongos com tumores dorsais inoculados com células B16F10 tratados com o sobrenadante ou sem tratamento, foram agrupados conforme os dois parâmetros de massas corporais: (1) peso inicial, correspondente ao dia da inoculação e (2) peso final, análogo ao dia da eutanásia (Tabela 1).

Essa comparação foi realizada a fim de identificar se a ocorrência de caquexia ou não, é diferente em animais de diferentes grupos experimentais. Foi realizado o teste de ANOVA de duas vias e pós teste de Bonferroni. Não foram encontradas diferenças na comparação das estimações de massas corporais desses dois tipos de parâmetros para o grupo com tumor dorsal sem tratamento e com tumor dorsal tratado com três diferentes doses do sobrenadante.

Tabela 1 – Massa corporal dos camundongos antes e após o período de tratamento

	Grupos experimentais*			
	CONTROLE	SB 0,3 mL	SB 0,6 mL	SB 0,9 mL
Peso inicial (g)	24,63 ± 1,17	26,92 ± 0,45	26,43 ± 0,73	21,72 ± 0,74
Peso final (g)	27,23 ± 2,13	27,64 ± 0,48	23,96 ± 1,13	20,34 ± 1,44

Fonte: O autor.

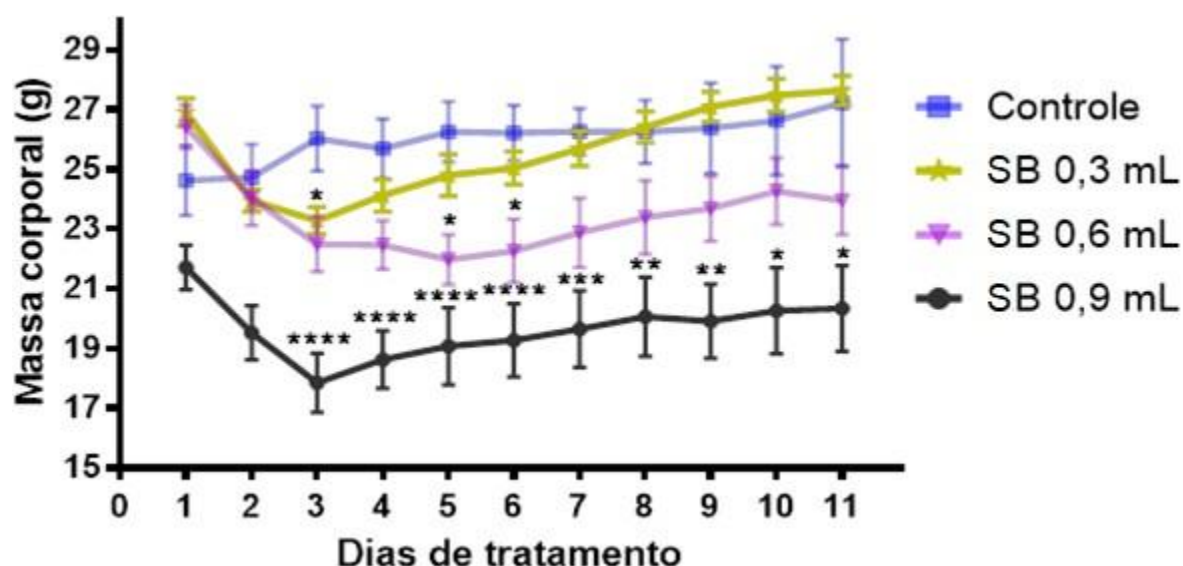
Nota: Dados expressos em média ± erro padrão da média. O asterisco “*” indica um n = 7, de animais por grupo.

Feita a comparação desses dois tipos de parâmetros de medida da massa corporal dentro de cada grupo experimental participantes, foi realizada a comparação da evolução diária da massa corporal entre os grupos experimentais, durante onze dias. Essa comparação foi realizada a fim de identificar se o peso corporal entre os grupos experimentais de camundongos varia conforme o decorrer dos dias e como o ganho de massa corporal afeta a resposta ao tratamento. Foi realizado o teste ANOVA de uma via e pós teste de Tukey.

Primeiramente, a comparação da evolução diária da massa corporal entre si mostrou que não ocorreu uma variação significativa em todos os grupos

experimentais. Quando se comparou a evolução do peso corporal entre os grupos experimentais Controle x SB 0,3 não foram encontradas diferenças significativas no decorrer dos dias. Quando se comparou a evolução do peso corporal durante os onze dias, foram encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais SB 0,6 x Controle no terceiro ($p = 0,03$), quinto ($p = 0,02$) e sexto ($p = 0,03$) dias. O grupo SB 0,9 diferencia do grupo Controle, no terceiro ($p = 0,0001$), quarto ($p = 0,0001$), quinto ($p = 0,0001$), sexto ($p = 0,0003$), sétimo ($p = 0,0003$), oitavo ($p = 0,002$), nono ($p = 0,003$), décimo ($p = 0,01$) e décimo primeiro ($p = 0,01$) dias (Figura 5).

Figura 5 – Efeito do tratamento com o sobrenadante sobre a evolução e variação da massa corporal de camundongos inoculados com células B16F10.



Fonte: O autor.

Legenda: Perfil da progressão da massa corporal de camundongos inoculados com 5×10^4 células B16F10 e tratados com sobrenadante. Determinação diária da massa corporal ao longo do período de tratamento, 11 dias, com diferentes doses do SB (0,3, 0,6 e 0,9 mL/animal/dia) ou sem tratamento. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média. O asterisco “*” indica que houve diferença significativa (em relação ao grupo controle: “tumor/sem tratamento”).

Por meio da análise de evolução diária da massa corporal dos camundongos, observamos que o grupo SB 0,9 mL manteve-se com diminuição até o fim do experimento. Esse resultado é capaz de distinguir o grupo não tratado com o grupo tratado com o sobrenadante na concentração 0,9 mL (por animal, por dia), trazendo condições favoráveis para esses animais durante os onze dias de tratamento, pois independente do crescimento tumoral, os animais ganharam e mantiveram o peso e, sugere-se que os animais estavam menos suscetíveis a complicações causadas pela neoplasia.

Poucos trabalhos mostraram resultados semelhantes ao nosso (NAKAMURA *et al.*, 2003). Além disso, a tendência de diminuição da massa corporal em camundongos com melanoma murino e tratados com extrato aquoso de *Cordyceps sinensis*, para esse estudo não foi estatisticamente significativo, diferente ao nosso (NAKAMURA *et al.*, 2003).

No parâmetro biométrico de massa corporal, existem indícios de caquexia, ou seja, uma complicação frequente em pacientes em estágios avançados de neoplasias (SILVA, 2006). Embora nossas análises usando o parâmetro de massa corporal tenham apresentado altos níveis de significância, os dados não foram ajustados em relação ao aumento progressivo do volume do tumor. Portanto, é possível que nossos resultados tenham sido influenciados por esse fator.

5.1.2 Análise do volume tumoral

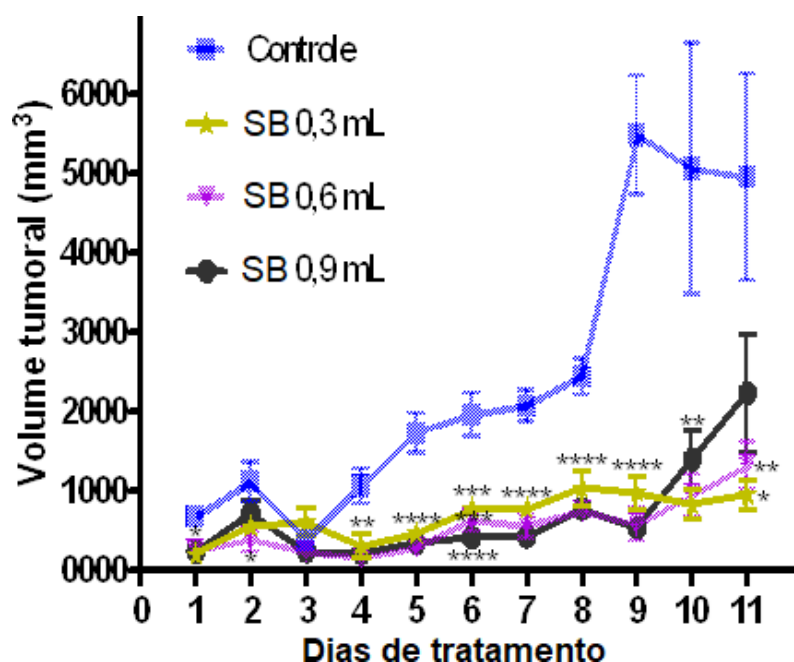
A partir do acompanhamento diário do desenvolvimento e da evolução dos tumores dorsais em relação a diferentes doses do sobrenadante e ao grupo controle, durante o período, de onze dias de tratamento, foi possível identificar padrões distintos para cada um dos grupos experimentais, ou seja, camundongos injetados com células de melanoma murino, independentemente de terem sido tratados ou não, apresentaram grande variação individual em relação ao desenvolvimento do tumor (Figura 6). Foi realizado o teste ANOVA de uma via e pós teste de Tukey.

Inicialmente, os três diferentes grupos experimentais submetidos ao tratamento com o sobrenadante mostraram que houve um crescimento tumoral mais lento, a partir do quarto dia, quando comparados com o grupo controle (não tratados). O grupo SB 0,9 diferencia do grupo Controle, no primeiro ($p = 0,02$), quarto ($p = 0,006$), quinto ($p = 0,0001$), sexto ($p = 0,0001$), sétimo ($p = 0,0001$), oitavo ($p = 0,0001$), nono ($p = 0,0001$) e décimo ($p = 0,006$) dias.

Quando se comparou a progressão do volume tumoral durante onze dias, foram encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais SB 0,3 x Controle no primeiro ($p = 0,01$), quarto ($p = 0,007$), quinto ($p = 0,0001$), sexto ($p = 0,0003$), sétimo ($p = 0,0001$), oitavo ($p = 0,0001$), nono ($p = 0,0001$), décimo ($0,002$) e décimo primeiro ($p = 0,008$) dias de tratamento, sendo que, este grupo manteve a tendência de redução significativa do volume do tumor em todos os dias, a partir do quarto dia de tratamento.

O grupo SB 0,6 diferencia do grupo Controle, no primeiro ($p = 0,03$), segundo ($p = 0,03$), quarto ($p = 0,003$), quinto ($p = 0,0001$), sexto ($p = 0,0001$), sétimo ($p = 0,0001$), oitavo ($p = 0,0001$), nono ($p = 0,0001$), décimo ($0,002$) e décimo primeiro ($p = 0,01$) dias, mostrando também, que este grupo manteve a tendência de redução significativa do volume do tumor em todos os dias, a partir do quarto dia de tratamento.

Figura 6 – Efeito do tratamento com sobrenadante sobre a progressão do volume tumoral de camundongos inoculados com células B16F10.



Fonte: O autor.

Legenda: Perfil da progressão do volume tumoral de camundongos inoculados com 5×10^4 células B16F10 e tratados com sobrenadante. Determinação diária do volume tumoral ao longo do período de tratamento, 11 dias, com diferentes doses do SB (0,3, 0,6 e 0,9 mL/animal/dia) ou sem tratamento. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média. O asterisco “*” indica que houve diferença significativa (em relação ao grupo controle: “tumor/sem tratamento”).

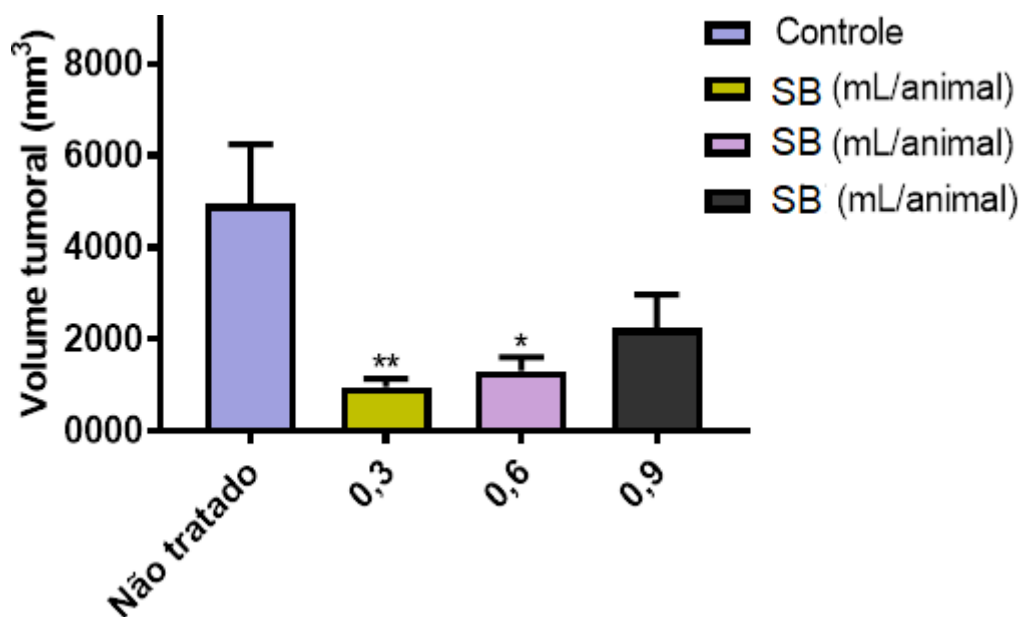
Feita a comparação desses parâmetros de medida do volume tumoral entre os grupos experimentais, foi realizada a comparação do volume tumoral final entre os grupos experimentais, ao final do tratamento. Essa comparação foi realizada a fim de identificar se volume da massa tumoral entre os grupos experimentais de camundongos varia no final do tratamento.

Antes de tudo, animais do grupo não tratados apresentaram volume de tumores maiores, em relação à média dos grupos tratados, ou seja, houve um aumento do volume tumoral em 170% (grupo controle), após 11 dias consecutivos.

A administração de 0,3, 0,6 ou 0,9 mL/animal/dia do SB por apenas 11 dias já

causou alterações no volume tumoral, uma vez que, quando comparados ao grupo de animais controle. Neste caso, as doses de sobrenadante 0,3, 0,6 e 0,9 mL (animal/dia) impediram o crescimento da massa tumoral dorsal dos camundongos, resultando em volumes 80, 73 e 54% menores em relação ao volume do tumor observado no grupo não tratados, respectivamente. Houve diferença estatisticamente significativa, na comparação dos seguintes grupos: SB 0,3 x Controle e SB 0,6 x Controle (Figura 7).

Figura 7 – Volume tumoral de camundongos inoculados com células B16F10 e tratados com doses distintas do sobrenadante, no final do tratamento.



Fonte: O autor.

Legenda: Os animais foram inoculados com 5×10^4 células B16F10 e tratados com diferentes doses do SB (0,3, 0,6 e 0,9 mL/animal/dia) por 11 dias consecutivos. Ao final dos períodos destes o volume tumoral foi determinado. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média. O asterisco “*” indica que houve diferença significativa (em relação ao grupo controle: “tumor/sem tratamento”). Teste estatístico ANOVA de uma via e pós teste de Tukey. ** $p < 0,008$ * $p < 0,01$.

Por meio da análise da progressão do volume tumoral, observamos que há redução do volume da massa tumoral nos três grupos tratados em diferentes doses do sobrenadante. Esse resultado é capaz de evidenciar qual o melhor tratamento, viável, dentre as três doses testadas, trazendo maior entendimento para um possível tratamento alternativo do melanoma murino, no futuro.

Outros trabalhos mostraram resultados similares aos nossos, porém com o uso do extrato fúngico da espécie *Cordyceps sinensis*, no estudo de WU, ZHANG e LEUNG (2007), utilizaram o tratamento com o extrato de acetato de etila do micélio *C. sinensis* através de injeção intraperitoneal, e observaram que o extrato inibiu o crescimento de tumores de melanoma induzidos por células B16 nos animais e diminuiu o volume tumoral em cerca de 62%. Enquanto o extrato aquoso de *C. sinensis* apresentou uma redução significativa de 53% da massa tumoral, quando comparado ao grupo controle em estudo realizado por Nakamura *et al.* (1999).

Além disso, a influência do tratamento de 37 dias com extrato de *C. militaris* reduziu o tamanho e a massa dos tumores em modelo de camundongo melanocítico,

para esse estudo os resultados foram similares aos nossos, apesar de que a aplicação do extrato, nesse estudo, foi por via subcutânea ao redor do tumor - não diretamente no tumor (RUMA *et al.*, 2014).

Neste estudo, focamos no papel do sobrenadante de *C. militaris* em meio à base de melão de cana-de-açúcar de uma linhagem de células B16F10 no crescimento tumoral, massa corporal e na possível ocorrência de metástases *in vivo*, em apenas 11 dias de tratamento. Conseqüentemente, novos estudos são necessários para melhorar a compreensão de uma neoplasia complexa, especialmente para possíveis novos tratamentos alternativos e de baixo custo, no futuro, favorecendo o aumento da sobrevida para câncer do tipo melanoma.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que o tratamento *in vivo* com o sobrenadante de *Cordyceps militaris* em meio à base de melaço de cana-de-açúcar nas doses 0,3 e 0,6 mL/animal/dia por 11 dias, foi efetivo na inibição parcial do crescimento do tumor induzido e a dose 0,9 mL/animal/dia favoreceu a manutenção da massa corporal dos animais quando comparado ao grupo controle, indicando que não houve condição de caquexia, além de o sobrenadante não ter sido considerado tóxico para os animais durante o período de tratamento.

Portanto, nossa investigação mostrou pela primeira vez que o sobrenadante de *Cordyceps militaris* em meio à base de melaço de cana-de-açúcar é promissor para gerar possíveis novas terapias e que atue de forma efetiva acerca do melanoma, promovendo, quem sabe, o aumento da possibilidade de cura e o tempo de sobrevivência.

REFERÊNCIAS

- ASHRAF, S. A.; ELKHALIFA, A. E. O.; SIDDIQUI, A. J.; PATEL, M.; AWADELKAREEM, A. M.; SNOUSSI, M.; ASHRAF, M. S.; ADNAN, M.; HADI, S. Cordycepin for Health and Wellbeing: A Potent Bioactive Metabolite of an Entomopathogenic Medicinal Fungus *Cordyceps* with Its Nutraceutical and Therapeutic Potential. **Molecules**, v. 25, n. 12, 2020.
- BOMMAREDDY, P. K.; SHETTIGAR, M.; KAUFMAN, H. L. Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 8, p. 498–513, 2018.
- MARIA LUÍSA CERRI. **Otimização da produção de cordyceps militaris em meio a base de melão de cana e quantificação de compostos bioativos**. 2021. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2021.
- CHA, S. H.; LIM, J. S.; YOON, C. S.; KOH, J. H.; CHANG, H. I.; KIM, S. W. Production of mycelia and exo-biopolymer from molasses by *Cordyceps sinensis* 16 in submerged culture. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 1, p. 165–168, 2007.
- CHIBA, K.; LORBEER, F. K.; SHAIN, A. H.; MCSWIGGEN, D. T.; SCHRUF, E.; OH, A.; RYU, J.; DARZACQ, X.; BASTIAN, B. C.; HOCKEMEYER, D. Mutations in the promoter of the telomerase gene TERT contribute to tumorigenesis by a two-step mechanism. **Science**, v. 29, n. 357 (6358), 2017.
- CUI, J. D. **Biotechnological production, and applications of Cordyceps militaris, a valued traditional Chinese medicine**, Taylor and Francis Ltd, 2015.
- DAS, S. K.; MASUDA, M.; SAKURAI, A.; SAKAKIBARA, M. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, 2010.
- DOMINGUES, B.; LOPES, J.; SOARES, P.; POPULO, H. Melanoma treatment in review. **Immuno Targets and Therapy**, v. 7, p. 35–49, 2018.
- EDDY, K.; CHEN, S. **Overcoming immune evasion in melanoma**, MDPI AG, 2020.
- EGGERMONT, A. M. M. Adjuvant therapy for high-risk melanoma. In: EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, SUPPLEMENT v. 11, n. 2, p. 106–108 2013.
- EISEN, T.; AHMAD, T.; FLAHERTY, K. T.; GORE, M.; KAYE, S.; MARAIS, R.; GIBBENS, I.; HACKETT, S.; JAMES, M.; SCHUCHTER, L. M.; NATHANSON, K. L.; XIA, C.; SIMANTOV, R.; SCHWARTZ, B.; POULIN-COSTELLO, M.; O'DWYER, P. J.; RATAIN, M. J. Sorafenib in advanced melanoma: a Phase II randomised discontinuation trial analysis. **British Journal of Cancer**, v. 95, n. 5, p. 581–586, 2006.
- FIDLER I. J. Selection of successive tumour lines for metastasis. **Nature: New biology**, n. 242, n 118, p. 148–149, 1973.
- GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. **Melanoma biology and new targeted therapy**, Nature Publishing Group, 2007.
- GU, Y. X.; WANG, Z. S.; LI, S. X.; YUAN, Q. S. Effect of multiple factors on

accumulation of nucleosides and bases in *Cordyceps militaris*. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1304–1309, 2007.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of cancer: The next generation**, 2011.

HAUSMAN, D. M. What is cancer? **Perspectives in Biology and Medicine**, v. 62, n. 4, p. 778–784, 2019.

HSIEH, C.; TSAI, M.-J.; HSU, T.-H.; CHANG, D.-M.; LO, C.-T. Medium Optimization for Polysaccharide Production of *Cordyceps sinensis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 120, n. 2, p. 145-147, 2005.

ISOLA, A. L.; EDDY, K.; CHEN, S. **Biology, therapy and implications of tumor exosomes in the progression of melanoma**, MDPI AG, 2016.

KARASARIDES, M.; CHILOECHES, A.; HAYWARD, R.; NICULESCU-DUVAZ, D.; SCANLON, I.; FRIEDLOS, F.; OGILVIE, L.; HEDLEY, D.; MARTIN, J.; MARSHALL, C.J.; SPRINGER, C. J.; MARAIS, R. B-RAF is a therapeutic target in melanoma. **Oncogene**, v. 23, n. 37, p. 6292–6298, 2004.

KATO, T.; SATO, K.; KAKINUMA, H.; MATSUDA, Y. Enhanced Suppression of Tumor Growth by Combination of Angiogenesis Inhibitor O-(Chloroacetyl-carbamoyl) fumagillol (TNP-470) and Cytotoxic Agents in Mice. **Cancer Research**, v. 54, n. 19, p. 5143–5147, 1994.

KHAN, T.; DATE, A.; CHAWDA, H.; PATEL, K. **Polysaccharides as potential anticancer agents — A review of their progress**, Elsevier Ltd, 2019.

LAMBERT, A. W.; PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. **Emerging Biological Principles of Metastasis**, Cell Press, 2017.

WOICIECHOWSKI, A. L.; CARVALHO, J. C.; SPIER, M. R.; *et al.* Emprego de 58 resíduos agroindustriais em bioprocessos alimentares. **Biociencia de alimentos**. v. 12, p.143–172, 2013.

MACKIE, R. M.; FREUDENBERGER, T.; AITCHISON, T. C. **Preventive Medicine PERSONAL RISK-FACTOR CHART FOR CUTANEOUS MELANOMA**. v. 2, n. 8661, p. 487–490, 1989.

MAYARA NUNES VITOR ANJOS. **Produção de astaxantina por mucor circinelloides utilizando melão de cana-de-açúcar como substrato alternativo sob a influência de luz azul recife**. 2013. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2013.

NAKAMURA, K.; KONOHA, K.; YAMAGUCHI, Y.; KAGOTA, S.; SHINOZUKA, K.; KUNITOMO, M. Combined Effects of *Cordyceps sinensis* and Methotrexate on Hematogenic Lung Metastasis in Mice. **Receptors and Channels**, v. 9, p. 329–334, 2003.

OLATUNJI, O. J.; TANG, J.; TOLA, A.; AUBERON, F.; OLUWANIYI, O.; OUYANG, Z. **The genus *Cordyceps*: An extensive review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology**, Elsevier B.V., 2018.

OTAKE, A. H.; MATTAR, A. L.; FREITAS, H. C.; MACHADO, C. M. L.; NONOGAKI, S.; FUJIHARA, C. K.; ZATZ, R.; CHAMMAS, R. Inhibition of angiotensin II receptor 1

limits tumor-associated angiogenesis and attenuates growth of murine melanoma. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 66, n. 1, p. 79–87, 2010.

PACHECO NUNES DA SILVA, M. Síndrome da anorexia-caquexia em portadores de câncer Anorexia-cachexia syndrome in cancer patients. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 1, p. 59-77, 2006.

Groppo, F., Ramacciato, J., Motta, R., Ferraresi, P. and Sartoratto, A. Antimicrobial activity of garlic against oral streptococci. **International Journal of Dental Hygiene**, v. 5, p 109-115, 2007.

REIS, F. S.; BARROS, L.; CALHELHA, R. C.; ĆIRIĆ, A.; VAN GRIENSVEN, L. J. L.D.; SOKOVIĆ, M.; FERREIRA, I. C. F. R. The methanolic extract of *Cordyceps militaris* (L.) Link fruiting body shows antioxidant, antibacterial, antifungal and antihuman tumorcell lines properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p. 91–98, 2013.

RIBAS, A.; WOLCHOK, J. D. **Cancer immunotherapy using checkpoint blockade**. Science. v. 359, n. 6382, p. 1350–1355, 2018.

RUMA, I. M. W.; PUTRANTO, E. W.; KONDO, E.; WATANABE, R.; SAITO, K. E. N.; INOUE, Y.; YAMAMOTO, K. I.; NAKATA, S.; KAIHATA, M.; MURATA, H.; SAKAGUCHI, M. Extract of *Cordyceps militaris* inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth of human malignant melanoma cells. **International Journal of Oncology**, v. 45, n. 1, p. 209–218, 2014.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; FUCHS, H. E.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2021. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 1, p. 7–33, 2021.

SINGH TULI, H.; SHARMA, A. K.; SANDHU, S. S. Optimization of fermentation conditions for cordycepin production using *Cordyceps militaris*. **Journal of Biological and Chemical Sciences**. v. 1, n. 1, p. 35–47, 2014.

SUN, Q.; LEE, W.; MOHRI, Y.; TAKEO, M.; LIM, C. H.; XU, X.; MYUNG, P.; ATIT, R. P.; TAKETO, M. M.; MOUBARAK, R. S.; SCHOBER, M.; OSMAN, I.; GAY, D. L.; SAUR, D.; NISHIMURA, E. K.; ITO, M. A novel mouse model demonstrates that oncogenic melanocyte stem cells engender melanoma resembling human disease. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019.

SUNG, G. H.; SHRESTHA, B.; HAN, S. K.; SUNG, J. M. Cultural characteristics of *Ophiocordyceps heteropoda* collected from Korea. **Mycobiology**, v. 39, n. 1, p. 1–6, 2011.

WADA-OHNO, M.; ITO, T.; FURUE, M. **Adjuvant Therapy for Melanoma**, Springer New York LLC, 2019.

WALDMAN, A. D.; FRITZ, J. M.; LENARDO, M. J. **A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice**, Nature Research, 2020.

WALKER, G. J.; HAYWARD, N. K. Pathways to Melanoma Development: Lessons from the Mouse. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 119, n. 4, p. 783-792, 2002.

WON, S. Y.; PARK, E. H. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. **Journal of**

Ethnopharmacology, v. 96, n. 3, p. 555–561, 2005.

WONGSA, B.; RAETHONG, N.; CHUMNANPUEN, P.; WONG-EKKABUT, J.; LAOTENG, K.; VONGSANGNAK, W. Alternative metabolic routes in channeling xylose to cordycepin production of *Cordyceps militaris* identified by comparative transcriptome analysis. **Genomics**, v. 112, n. 1, p. 629–636, 2020.

WU, J. Y.; ZHANG, Q. X.; LEUNG, P. H. Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Cordyceps sinensis* mycelium on various cancer cells in culture and B16 melanoma in C57BL/6 mice. **Phytomedicine**, v. 14, n. 1, p. 43–49, 2007.

ZHENG, H.; HAO, M.; LIU, W.; ZHENG, W.; YINGYING; FAN, S.; WU, Z. Foam fractionation for the concentration of exopolysaccharides produced by repeated batch fermentation of *cordyceps militaris*. **Separation and Purification Technology**, v. 210, p. 682–689, 2019.

ZHENG, P.; XIA, Y.; XIAO, G.; XIONG, C.; HU, X.; ZHANG, S.; ZHENG, H.; HUANG, Y.; ZHOU, Y.; WANG, S.; ZHAO, G. P.; LIU, X.; ST LEGER, R. J.; WANG, C. Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional chinese medicine. **Genome Biology**, v. 12, n. 11, 2011.

ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – PROPESP

Diretoria de Pesquisa

Comissão de Ética no uso de animais - CEUA

Ponta Grossa, 19 de fevereiro de 2020

CARTA DE APROVAÇÃO

Protocolo UEPG – Processo 19.0000.24777-6

Título –Projeto de pesquisa “Efeito antitumoral do fungo *Cordyceps militaris* em camundongos portadores de melanoma experimental.”.

Interessadas: Felipe de Oliveira Mendonça e Prof. Giovani Marino Favero

Data de Entrada – 3/12/2019

E-mail: gmfavero@uepg.br

A comissão de Ética no Uso de animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (CEUA-UEPG) certifica que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa acima especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA), estabelecidas pelo Conselho Nacional para fins de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal. Fica autorizada a utilização de 36 camundongos (machos +fêmeas) isogênicos da linhagem C57BL/6 com 60 dias de idade e peso aproximado de 22 g obtidos do Biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa no início dos experimentos para a execução desse projeto.

Prof.^a Dr.^a Chela Roberta Lehnen
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais/UEPG