



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE GURUPI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

VANESSA MENDES MATTJE

**IMPACTO DA DIETA COMPOSTA DE RAÇÃO SUPLEMENTADA
COM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ E COM MICÉLIO DE *Pleurotus* sp. EM MODELOS
MURINOS ASSOCIADA AO TRATAMENTO COM METOTREXATO**

Gurupi/TO
2019

VANESSA MENDES MATTJE

Impacto da dieta composta de ração suplementada com $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e com micélio de *Pleurotus* sp. em modelos murinos associada ao tratamento com Metotrexato

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Alex Sander Rodrigues Cangussu

Gurupi/TO
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

M444i Mattje, Vanessa Mendes.

Impacto da dieta composta de ração suplementada com FeSO₄.7H₂O e micélio de *Pleurotus* sp. em modelos murinos associada ao tratamento com Metotrexato. / Vanessa Mendes Mattje. – Gurupi, TO, 2019.

76 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Biotecnologia, 2019.

Orientador: Alex Sander Rodrigues Cangussu

1. Metotrexato. 2. *Pleurotus* sp.. 3. Imunossupressão. 4. Histopatologia. I. Título

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Rua Badejós, Chácaras 69 e 72 - CEP: 77402-970 - Caixa Postal 66 | Gurupi/TO
(63) 3311-1649 | www.uft.edu.br/ppgbiotec | ppgbiotec@uft.edu.br



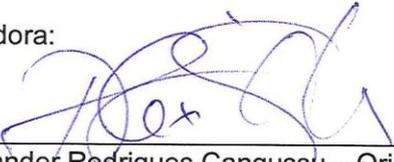
VANESSA MENDES MATTJE

Impacto da dieta composta de ração suplementada com $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e micélio de *Pleurotus* sp. em modelos murinos associada ao tratamento com Metotrexato.

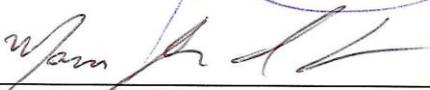
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em 12/04/2019 foi julgada adequada para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Data da aprovação: 12/04/2019.

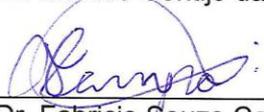
Banca Examinadora:



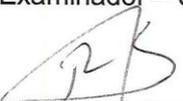
Prof. Dr. Alex Sander Rodrigues Cangussu – Orientador - UFT



Prof. Dr. Marcos Gontijo da Silva – Examinador - UFT



Prof. Dr. Fabricio Souza Campos – Examinador – UFT



Prof. Dr. Raimundo Wagner de Souza Aguiar – Examinador - UFT

Gurupi (TO).
2019.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. Com estas palavras de Marthin Luther King que dedico este trabalho ao Meu Pai Nilson e Mãe Martha (In Memoriam) que me ensinaram a importância do estudo sem poder ter ido adiante nele. E, não poderia deixar de dedicar ao Meu Filho Gabriel pela compreensão da minha ausência e ao Meu Irmão pelo companheirismo.

*“O próprio Senhor irá à sua frente e
estará com você; ele nunca o deixará, nunca o
abandonará. Não tenha medo! Não se
desanime!”*

(Deuteronômio 31:8)

AGRADECIMENTOS

À Deus por me orientar e guiar os meus passos e nunca me abandonar, Ele é o meu amor, amigo, consolador, ajudador, e detentor de toda inteligência e sabedoria, Quem me capacitou para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao meu orientador professor Alex Sânder R. Cangussu, por acreditar em mim e me aceitar como sua orientanda, num momento que eu pensei que estava perdida, que abriu-me as portas como um pai abre os braços para receber um filho. Só tenho a agradecer, agradecer por seus ensinamentos (pessoais e acadêmicos), orientações, palavras de incentivo, paciência e apoio nos momentos que mais precisei. Você é um ser humano e um profissional ímpar, minha grande inspiração em tudo que faço e pretendo fazer.

Ao professor Raimundo Wagner por me aceitar no seu laboratório, pelo incentivo, confiança e principalmente pela amizade desde a graduação. Tenho uma gratidão enorme a Deus em ter na minha vida, sempre abrindo as portas para os meus projetos e me aconselhando. Também aos laboratórios do IFTO *Campus* Gurupi.

Ao professor Marcos Gontijo pelos ensinamentos e pela ajuda.

Ao Centro Oncológico de Palmas localizado em Gurupi, pela doação do Quimioterápico (MTX) para desenvolver o projeto, em especial a enfermeira Amanda e a Camila por ter a sensibilidade de colaborar com a pesquisa e se tornando uma companheira, amiga e sempre disponível.

Ao IFTO pelo apoio à qualificação e a todos os meus amigos servidores/da vida, Haynara A. Cerqueira, Ludimilla Muniz, Márcio Xavier, Michelle Mota e Ana Terra pelo apoio e amizade.

A todos os servidores da UFT, em especial aos meus amigos Tullio T. Deusdará, Benedito Alburquerque, Naiane G. da Silva, Claudianny, Dalmarcia, Denis e Suetônio, que sempre estiveram dispostos a me ajudar.

A minha amiga Fabíula Gomes de Castro que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, incentivos, pelos ensinamentos, pela amizade verdadeira e por nunca me abandonar.

Aos meus amigos que estiveram comigo nesta caminhada e em tantas outras e que torceram sempre pela minha vitória, Deyvid Rocha Brito, Ana Paula A. Viana, Maria de Nazaré R. de Sousa, Rosimeire Morais Barbosa e Heltonney.

À minha família que amo muito, minha base e estrutura, não existem palavras para descrever tudo o que já fizeram e fazem por mim, em especial Minha Mãe Martha Mendes Ferreira (*In memorian*), ao Meu Pai Nilson Neri Mattje, a Minha Avó Silda I. Gölzer Mattje (*In memorian*), ao Meu Irmão Adriano Mendes Mattje e ao Meu Filho Gabriel Mattje Reis. Tenho muito orgulho da minha origem e dos ensinamentos que a minha família me deu.

Ao João Paulo Batista da Silva, pelo companheirismo, amor, apoio, paciência e carinho.

Ao programa de Pós-graduação Biotecnologia da UFT, Campus de Gurupi.

E, a todos que não citei nomes, o meu muito obrigada!

RESUMO

O Metotrexato (MTX) é um fármaco imunossupressor, antiproliferativo, quimioterápico, análogo do ácido fólico. O MTX parece estar envolvido com efeitos adversos graves como a conjuntivite, mucosite, toxicidade ao trato gastrointestinal, hepatotoxicidade aguda e crônica, toxicidade pulmonar, nefrotoxicidade e neurotoxicidade. O *Pleurotus* sp. é um cogumelo comestível que tem sido empregado como suplementos dietéticos contribuindo no reestabelecimento da saúde de pacientes. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o impacto da dieta composta de ração suplementada com *Pleurotus* sp. em camundongos *Swiss* em condições de tratamento com o MTX. A ração suplementada com micélios de *Pleurotus* sp. foi preparada a partir de 50% do substrato enriquecido com o fungo (desidratado e triturado) e 50% da ração *Biobase*® (controle) e incremento de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 1%, obtendo ao final uma ração em pellet para alimentação de camundongos. O grupo experimental foi constituído em quatro grupos, contendo seis (6) camundongos *Swiss*, sendo o G1 alimentados com ração controle e administrado 200 μL de PBS a 0,9%, G2 alimentados com ração controle e administrado 90mg.Kg⁻¹ de MTX, G3 alimentados com ração suplementada com *Pleurotus* sp. e administrado 200 μL de PBS a 0,9%, e o G4 alimentados com ração suplementada com *Pleurotus* sp. e administrado 90mg.Kg⁻¹ de MTX, todos por via intraperitoneal. O grupo teste e grupos controles foram avaliados quanto aos aspectos clínicos, massa corporal durante sete dias, quadro leucocitários e bioquímicos para função renal e hepática. As alterações histológicas foram avaliadas visando o entendimento da ação tóxica e ou benéfica da suplementação durante o tratamento com MTX. A composição da ração suplementada apresentou elevação quanto aos níveis de nitrogênio (26,6g/kg⁻¹), fosforo (6,0g/kg⁻¹) e potássio (6,5g/kg⁻¹), boro (26mg/kg⁻¹), ferro (485mg/kg⁻¹), além do aumento de 166,2% de proteína bruta. A importância do aumento da concentração centesimal presente na ração suplementada pode auxiliar nas propriedades nutricionais de *Pleurotus* sp. crescidos em arroz, entretanto, é necessário caracterizar e quantificar moléculas presentes em micélios para o entendimento do efeito benéficos e participação de outras moléculas. Os animais que foram alimentados com ração suplementada sob tratamento com MTX parece ter apresentado uma ligeira sinalização no número de leucócitos totais em relação ao grupo controle. Entretanto, não houve diferença estatística da expansão das áreas de polpas nos três grupos (G1, G3 e G4) que são aspectos de melhoria do sistema imunológico. Assim, é necessário confirmar estes dados em experimentos futuros confrontando com os dados obtidos até aqui. Portanto, este trabalho sinaliza que o uso de micélio de *Pleurotus* sp. adicionado na alimentação de

camundongos pode contribuir na melhoria dos transtornos fisiológicos provocados durante o tratamento com MTX.

Palavras-chaves: Metotrexato, *Pleurotus* sp., Imunossupressão, Histopatologia.

ABSTRACT

Methotrexate (MTX) is an immunosuppressive, antiproliferative, chemotherapeutic, analogue of folic acid. MTX appears to be involved with serious adverse effects such as conjunctivitis, mucositis, gastrointestinal tract toxicity, acute and chronic hepatotoxicity, pulmonary toxicity, nephrotoxicity, and neurotoxicity. *Pleurotus* sp. is an edible mushroom that has been employed as dietary supplements contributing in reestablishing the health of patients. Thus, the present study had the objective of evaluating the impact of the compound diet supplemented with *Pleurotus* sp. in Swiss mice under treatment conditions with MTX. The feed supplemented with *Pleurotus* mycelium sp. was prepared from 50% of the substrate enriched with the fungus (dehydrated and comminuted) and 50% of the Biobase® (control) diet and increment of 1% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, obtaining at the end a pellet feed for feeding mice. The experimental group consisted of four groups containing six (6) Swiss mice, G1 fed with control ration and administered 90 μL of 0.9% PBS, G2 fed control ration and administered 90 mg/Kg^{-1} of MTX, G3 fed with feed supplemented with *Pleurotus* sp. and administered 90 μL of 0.9% PBS, and the G4 fed with feed supplemented with *Pleurotus* sp. and administered 90 mg/kg^{-1} of MTX, all intraperitoneally. The test group and control groups were evaluated for clinical aspects, body mass for seven days, leukocyte and biochemical framework for renal and hepatic function. Histological changes were evaluated aiming at understanding the toxic and beneficial action of supplementation during treatment with MTX. The composition of the supplemented ration presented increase in the levels of nitrogen ($26.6\text{g}/\text{kg}^{-1}$), phosphorus ($6.0\text{g}/\text{kg}^{-1}$) and potassium ($6.5\text{g}/\text{kg}^{-1}$), boron ($26\text{mg}/\text{kg}^{-1}$), iron ($485\text{mg}/\text{kg}^{-1}$), and a 166.2% increase in crude protein. The importance of increasing the centesimal concentration present in the supplemented ration can aid in the nutritional properties of *Pleurotus* sp. grown in rice, however, it is necessary to characterize and quantify molecules present in mycelia for the understanding of the beneficial effect and participation of other molecules. Animals fed with supplemental feed under treatment with MTX appear to have shown a slight signaling in the number of total leukocytes relative to the control group. However, there was no statistical difference in the expansion of the pulp areas in the three groups (G1, G3 and G4) that are aspects of the immune system improvement. Thus, it is necessary to confirm these data in future experiments in comparison with the data obtained so far. Therefore, this work indicates that the use of *Pleurotus* mycelium sp. added in the diet of mice can contribute to the improvement of the physiological disorders caused during treatment with MTX.

Keywords: Methotrexate, *Pleurotus* sp., Immunosuppression, Histopathology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A) Estrutura química do ácido fólico e do B) Metotrexato.	17
Figura 2: Estrutura de um corpo de frutificação.	19
Figura 3: Polissacarídeos e suas possíveis ligações.	21
Figura 4: Etapas de produção da ração suplementada com micélios de <i>Pleurotus</i> sp. e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27
Figura 5: Fluxograma da parte experimental com modelos Murinos.	28
Figura 6: Obtenção das imagens através do software Leica Application Suite (versão 4.9.0).	32
Figura 7: Imagem do baço com filtro expondo a área da polpa esplênica, com aumento de 4x.	33
Figura 8: Efeito da ração suplementada de <i>Pleurotus</i> sp em camundongos <i>Swiss</i>	36
Figura 9: Alterações histopatológicas de fígado e rins de camundongos <i>Swiss</i> inoculados o fármaco MTX e alimentados com alimento suplementado com <i>Pleurotus</i> sp.	42
Figura 10: Imagens do baço dos três grupos de estudo (G1, G3 e G4), tratadas pelo programa ImageJ®, enfatizando a poupa esplênica.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividades farmacológicas de substâncias extraídas de cogumelos.....	22
Tabela 2: Teor de macro (g/kg^{-1}), micronutrientes (mg/kg^{-1}) e proteína bruta no alimento suplementar com <i>Pleurotus</i> sp., na ração suplementada com <i>Pleurotus</i> sp. e na ração controle.	35
Tabela 3: Média, desvio-padrão e valores de referência de parâmetros hematológicos de camundongos <i>Swiss</i> , alimentados com ração suplementada com <i>Pleurotus</i> sp. e ração controle.	39
Tabela 4: Média, desvio-padrão e valores de referência do parâmetro bioquímico de camundongos <i>Swiss</i> , alimentados com ração suplementada com <i>Pleurotus</i> sp. e ração controle.	40
Tabela 5: Intensidade de processos patológicos gerais em fígado, rim e baço - camundongos <i>Swiss</i> infectados sete dias após a alimentação e inoculação do MTX.....	43
Tabela 6: Médias das áreas das polpas dos baços de três grupos (G1, G3 e G4) de camundongos <i>Swiss</i>	43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1.	FÁRMACO METOTREXATO	17
2.2.	COGUMELOS COMESTÍVEIS	19
2.2.1.	<i>Pleurotus</i> sp.	20
2.2.2.	Cultivo do <i>Pleurotus</i> sp.	20
2.2.3.	Importância do <i>Pleurotus</i> sp.	21
3.	OBJETIVOS	25
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	25
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1.	IDENTIFICAÇÃO DO BASIODIMICETO E PRODUÇÃO DE BANCO DE CULTURA	26
4.2.	PREPARO DA RAÇÃO SUPLEMENTADA COM MICÉLIOS DE <i>PLEUROTUS</i> SP. 26	
4.2.1.	Determinação do teor de proteína bruta	27
4.2.2.	Determinação da presença de minerais da ração suplementada e ração controle	27
4.3.	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	28
4.3.1	Grupos experimentais	29
4.3.2	Ética em camundongos	29
4.4.	AVALIAÇÃO DA MASSA CORPORAL E CONSUMO DE RAÇÃO.....	30
4.4.5.	Análise Parasitológica de Fezes	30
4.4.6.	Dados Hematológicos, Leucocitários e Bioquímicos.....	31
4.4.7.	Análise dos parâmetros histológicos	31

4.4.8. Fotomicrografias.....	32
4.4.9. Análise da expansão de área polpa de baços de camundongos de grupos experimentais.	32
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	
5. RESULTADOS	35
5.1. TEOR DE PROTEÍNA E PRESENÇA DE MINERAIS DAS RAÇÕES (COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO).....	35
5.2. EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO NO COMPORTAMENTO DOS ANIMAIS	35
5.3. ANÁLISES MORFOLÓGICAS DOS TECIDOS COLETADOS.....	37
5.4. ANÁLISES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS	37
5.5. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS ÓRGÃOS COLETADOS	41
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÃO.....	48
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXO 01	69
ANEXO 02	70

1 INTRODUÇÃO

O fármaco Metotrexato (MTX), é um antimetabólito usado em paciente visando o tratamento do câncer e também de doenças autoimunes. Essa droga age inibindo o metabolismo do ácido fólico, e é utilizado para casos de leucemia linfoblástica aguda, tumores trofoblasticos em mulheres, osteosarcoma, coriocarcinoma, carcinomas de mama, pescoço, cabeça, ovários e bexiga (RAU *et al.* 2004; NEVES *et al.* 2009; OLIVEIRA, 2010). No entanto, o MTX causa efeitos adversos graves como: conjuntivite, mucosite, toxicidade ao trato gastrointestinal (KALANTZIS *et al.* 2005), hepatotoxicidade aguda e crônica (LAHARIE *et al.* 2008), toxicidade pulmonar (JAKUBOVIC *et al.* 2013), nefrotoxicidade (XAVIER & SANTOS, 2010) e neurotoxicidade (RUBNITZ *et al.* 1998; SHUPER *et al.* 2000; FILLEY & KLEINSCHMIDT, 2001; VEZMAR *et al.* 2003; VEZMAR *et al.* 2009). A causa dos efeitos adversos em alguns pacientes com o uso do MTX ainda não está totalmente elucidada, mas parece envolver um aumento do estresse oxidativo provocado pelo fármaco (HOWARD *et al.* 2009; KAGER, 2009; CARON *et al.* 2009; STENZEL *et al.* 2010).

Os cogumelos comestíveis têm apresentado potencialidade devido à sua composição química e características organolépticas sendo alternativa para o tratamento do câncer (YOULDEN *et al.* 2008; KALAC, 2013; SHARIF *et al.* 2017). Eles possuem propriedades distintas de compostos com atividades, tais como: compostos bioativos de alto valor medicinal, como lectinas (KUMARAN *et al.* 2017), polissacarídeos, fenólicos e polifenóis (YAHIA *et al.* 2017), terpenos (YAOITA *et al.* 2014), ergosteróis (BARROS *et al.* 2008) e compostos orgânicos voláteis (BARROS *et al.* 2013), que são considerados como agentes responsáveis pelas suas atividades saudáveis (VENDITTI *et al.* 2017). Além disso, é considerado antitumoral (ALONSO *et al.* 2017), imunomodulador (HSIAO *et al.* 2016), antioxidante (KIMATU *et al.* 2017), anti-hipercolesterolemia (ANANDHI *et al.* 2013), antivirais (YAN *et al.* 2015), antimicrobianos (SHAMEEM *et al.* 2017), anti-inflamatória (YUAN *et al.* 2017) e antidiabéticos (NYAM *et al.* 2017). Os cogumelos empregados em todo o mundo são o *Agaricus bisporus* seguido do *Pleurotus* sp. e da *Lentinula edodes* (CHEUNG, 2010).

O cogumelo do gênero *Pleurotus* sp. é caracterizado por possuir benefícios para a saúde, isso porque tem propriedades diversas de compostos com atividades, tais como: *anti-fúngica* (YE *et al.* 1999), *antigenotoxicidade* (WANG *et al.* 2005), *anti-oxidante* (ROUPAS *et al.* 2012), *anti-proliferativo* (ZHOU *et al.* 2013), *anti tumorigênico* (KIM *et al.* 2015),

atividade *anti-hiperlipídico*, *anti-hipertensiva*, *anti-nociceptiva*, *imune estimulação* (VAZ *et al.* 2011), *hipocolesterolêmicos* (HAN *et al.* 2011).

Outra molécula comumente encontrada em *Pleurotus* sp. é β -glucanas, que são à base da estrutura da parede celular de fungos, além de apresentar atividade antitumoral, antiinflamatória, antiviral, antioxidante, hepatoprotetora e imunomoduladora. Além disso, β -glucanas atuam nas células leucocitárias melhorando a atividade fagocitária e citotóxica pelo aumento da produção de moléculas pró-inflamatórias, tais como citocinas e quimiocinas (MENG *et al.* 2016). Relatos descrevem que β -glucanas podem estar envolvida em mecanismos que atua no combate a células cancerígenas pela regulação das vias de sinalização dos tumores (CHEN & SEVIOUR, 2007; LIU *et al.* 2015).

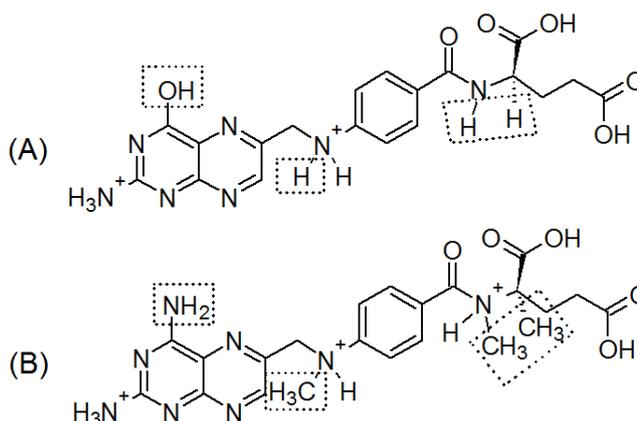
Desta forma, devido a relatos científicos sobre as propriedades de *Pleurotus* sp. no benefício da saúde, visamos neste trabalho avaliar o efeito de uma dieta simulando o tratamentos de enfermidade que provocam imunossupressão de pacientes. Assim, propomos uma prova de conceito em modelos murinos com suplementação de micélio *Pleurotus* sp. durante o tratamento com MTX.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Fármaco Metotrexato

O MTX é um análogo do ácido fólico possui na sua estrutura um anel pteridina, ácido p-aminobenzoico e ácido glutâmico. É um pó alaranjado cristalino de massa molar de $454,5\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_8\text{O}_5$. O MTX e o ácido fólico se diferem apenas na substituição de um grupo amino por um grupo hidroxila e na adição de um grupo metila entre os grupos pteroil e benzoila (Figura 1) (RUBINO, 2001; ABOLMAALI *et al.* 2013). O MTX é encontrado nos alimentos, na configuração reduzida, como, por exemplo, nos derivados de poliglutamatos, com 2 a 7 resíduos de ácido glutâmico, denominados como folatos (FREITAS *et al.* 2011).

Figura 1: A) Estrutura química do ácido fólico e do B) Metotrexato.



Fonte: (RUBINO, 2001; ABOLMAALI *et al.* 2013).

Assim, os folatos agem como cofatores em reações de transferência de carbono (LIMA *et al.* 2003). E, após a absorção, estes são reduzidos a ácido tetraidrofólico e/ou tetraidrofolato agindo como aceptor de unidades de carbono, promovendo coenzimas necessárias à síntese de timidilato e purinas (GUIMARÃES, 2003). O derivado N-5,10-metilenotetraidrofolato é considerado crucial na síntese de timidilato ao passo que os derivados N-5,10-metentetraidrofolato e N-10-formiltetraidrofolato são doadores de átomos de carbono para o crescimento do anel de purina (BRUNTON *et al.* 2006).

A enzima diidrofolato redutase (DHFR) é a responsável pela redução do folato à tetraidrofolato, essa enzima é o principal alvo do MTX. Resulta-se em depleção dos cofatores de tetraidrofolato, por apresentar maior afinidade pela enzima que os folatos naturais

(BRUNTON *et al.* 2006). O esgotamento dos folatos reduzidos (tetraidrofolatos) interfere nos mecanismos de síntese e reparo do DNA e replicação celular. O efeito imediato é uma interrupção abrupta na síntese de DNA, e traz uma consequente morte celular (LACASCE, 2009).

A administração do fármaco MTX pode ocorrer pelas vias oral, intravenosa, intramuscular ou intratecal com absorção ocorrendo principalmente na porção proximal do jejuno. O MTX é geralmente bem absorvido, com biodisponibilidade de 60% do fármaco. Contudo, doses acima de $2,16 \text{ mg/kg}^{-1}$ (conferir essa unidade, tenta colocar na mesma unidade que usamos nos camundongos) não são bem absorvidas devido à saturação do transportador de folato reduzido (*Reduced Folate Carrier* - RFC1). Os picos séricos são atingidos após uma a duas horas da administração, ocorre que a meia-vida sérica do MTX de três a dez horas para pacientes recebendo doses de até $0,81 \text{ mg/kg}^{-1}$, e de oito a quinze horas para pacientes em que são administradas doses maiores. As concentrações eritrocitárias são estáveis por até nove dias após a sua administração (BORCHERS *et al.* 2004).

O MTX pode causar efeitos adversos na maioria dos pacientes, como efeitos colaterais visivelmente bastante graves, com redução de apetite gerando debilidades inerentes à própria doença, variando dependendo da sensibilidade individual do tipo da doença e da dose administrada (PATEL *et al.* 2003).

As drogas imunossupressoras podem ser usadas em pesquisas para diminuir à resposta imune nesses animais (camundongos) (LALLO, 1998; LALLO *et al.* 2002; MITSUHASHI *et al.* 2006). O uso do fármaco MTX, na dose de 20 mg/kg por semana, em camundongos albinos *Swiss*, foi observado a indução de apoptose e aumento dos marcadores de estresse oxidativo nos hepatócitos, com aumento significativo na peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas, geração de radicais superóxido na mitocôndria e diminuição dos níveis de tióis (MUKHERJEE *et al.* 2013). Também foi demonstrado níveis maiores de lipoperoxidação, diminuição nos níveis de mieloperoxidase e glutatona oxidada (GSSG) (JAOHVIC *et al.* 2003). Além disso, o MTX em camundongos *Swiss* pode gerar aumento da expressão de genes relacionados a apoptose, como o BAX e a caspase 3, além de regular negativamente as proteínas anti-apoptóticas, a NF- κ B-dependente de Bcl-2, sugerindo que o estresse oxidativo induzido pelo MTX está relacionado à ativação de rotas da apoptose (MUKHERJEE *et al.* 2013).

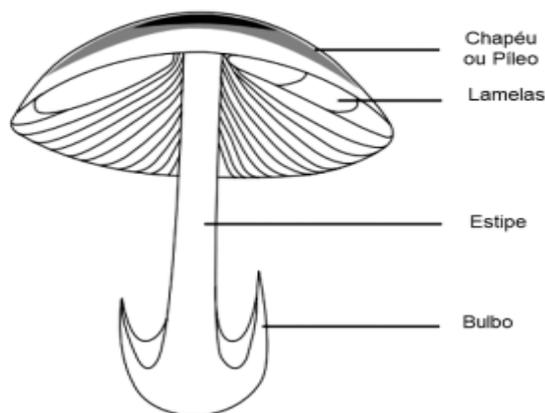
Desta forma, o uso de modelos murinos é usado para testar as estratégias de tratamento relacionado com a toxicidade a drogas específicas (BRESCIANI *et al.* 2013; PATEL *et al.* 2014). Assim o estudo em modelos murinos pode elucidar os mecanismos de

resposta do fármaco MTX.

2.2. Cogumelos comestíveis

Os cogumelos são as formas mais conhecidas pertencentes ao filo *Basidiomycota*, em sua maioria apresentando uma frutificação macroscópica, constituída por hifas modificadas que formam pseudotecidos, se diferenciam em auréola, anel, estipe, lamelas e bulbo basal (Figura 2) (COHEN *et al.* 2002; PUTZKE & PUTZKE, 2004). A estrutura chamada de cogumelo é, na verdade, apenas o corpo de frutificação do fungo, que após um período de crescimento é produzido pelo micélio estabelecido (MILES & CHANG 2004; MORADALI *et al.* 2007) (Figura 2).

Figura 2: Estrutura de um corpo de frutificação.



Fonte: Adaptado de MILES & CHANG (2004).

Os fungos pertencentes à classe dos Basidiomycetes e alguns Ascomycetes são os únicos produtores de cogumelos verdadeiros. O cogumelo pode ser denominado de corpo de frutificação, carpóforo, fruto ou basidiocarpo. Quando os cogumelos estão na fase de maturação, o píleo se abre, as lamelas são expostas e ocorre a disseminação dos esporos. Os esporos germinados dão origem às hifas, que formam o micélio primário, assim a união de micélios primários compatíveis gera um micélio secundário e/ou dicariótico, responsável pela formação dos cogumelos (CHANG & MILES, 1984; RAJARATHNAM, 1987; LECHNER e ALBERTÓ, 2011).

Os cogumelos estão presentes como micorrizas em plantas, também se caracterizam como componentes essenciais em ecossistemas florestais, na ciclagem de carbono, na biodegradação da lignina e celulose, na remoção de substâncias tóxicas do ambiente. Ele s

constituem pelo menos 12 mil espécies em todo o mundo e dessas, 2000 espécies são relatadas como comestíveis (SHARMA *et al.* 2017). Mais de 200 espécies de cogumelos são utilizadas como alimentos funcionais em todo o mundo (KALAC, 2013), no entanto, apenas cerca de 35 espécies foram cultivadas comercialmente (AIDA *et al.* 2009; SHARMA e GAUTAM, 2017).

2.2.1. *Pleurotus* sp.

O gênero *Pleurotus* sp. são classificados como pertencentes ao filo Basidiomycota, classe Basidiomycetes, ordem Agaricales e família Pleurotaceae (SARANGI *et al.* 2006). Apresentam várias aplicações ambientais e biotecnológicas e constituem um grupo de fungos com propriedades terapêuticas e de alto valor nutricional (COHEN *et al.* 2002). Este fungo possui grande interesse biotecnológico, não só pela sua capacidade de crescer em diversos resíduos agrícolas, mas também por produzir cogumelos de alta qualidade organoléptica (RAJARATHNAM & BANO, 1987) com um micélio branco. Além disso, é cultivado em substratos celulósicos não compostados (SAVOIE *et al.* 2007). Assim, o cultivo de *Pleurotus* sp. ocupa a terceira posição, atrás das espécies dos gêneros *Agaricus* e *Lentinulas* (CARDOSO *et al.* 2013). A maioria das espécies conhecidas do gênero *Pleurotus* sp. são comestíveis, sendo o *Pleurotus ostreatus* (Shimeji; cinza) um dos mais consumidos. Outras espécies que são encontradas: *Pleurotus ostreatus*, variedade flórida (*Hiratake*; branco), *P. ostreatoroseus* (Salmão) e *P. eryngii*.

O *Pleurotus* sp. é também conhecido como “cogumelo ostra”, contendo uma adequada fonte de carboidratos, contendo alta quantidade de fibras, além de proteínas com quase todos os aminoácidos essenciais, minerais e vitaminas (MATTILA *et al.* 2010). Esses fungos comestíveis e medicinais de podridão branca são saprófitos e capazes de utilizar lignina, celulose e hemicelulose como fonte de carbono e nutrientes. Essas características permitem que sejam cultivados em grande variedade de matérias lignocelulósicos, como resíduos agroindustriais, que podem ser utilizados também como substratos alternativos de baixo custo (RIBEIRO & OLIVEIRA, 2009) (KALAC, 2013).

2.2.2. Cultivo do *Pleurotus* sp.

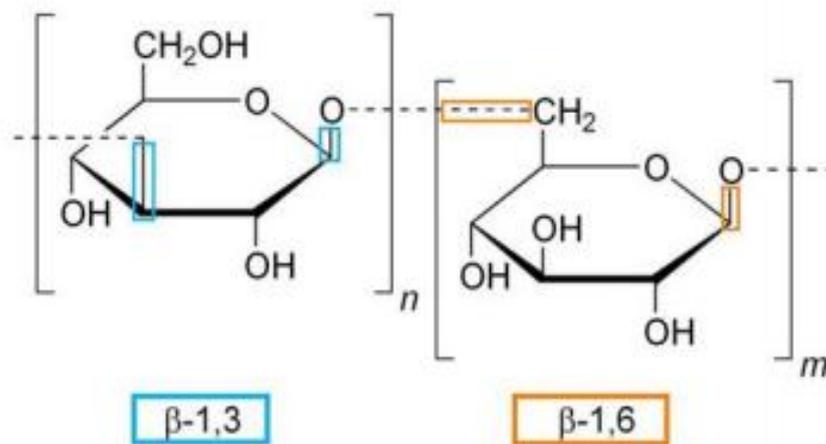
A produção do *Pleurotus* sp. já foi avaliada em diferentes substratos, por exemplo, resíduos de algodão (CHANG *et al.* 1981), palha de arroz (MEHTA *et al.* 1990) subprodutos

da produção de milho, casca de café (DIAS *et al.* 2003), palha de trigo (RAMOS *et al.* 2001) e a cana-de-açúcar (CARDOSO *et al.* 2013). Além disso, pode ser cultivado em diferentes tipos de palha de cereais, obtendo um rendimento melhor em ambientes com condições de clima temperados.

2.2.3. Importância do *Pleurotus* sp.

Benefícios medicinais têm sido relacionado ao uso de *Pleurotus* sp, com propriedade antitumoral, produzindo polissacarídeo lentinan, uma β -D-glucana (1 \rightarrow 3) ramificada em C-6 por unidades de glucopiranosose β (1 \rightarrow 6) (Figura 2) (KAPOOR, 2014). Atua também como adjuvante nas terapias antineoplásicas (SUN *et al.* 2014).

Figura 3: Polissacarídeos e suas possíveis ligações.



Relatos descrevem que a β -D-glucana que a atividade antitumoral é direta após estudo *in vitro* (KAWAGISHI *et al.* 1989, FINIMUNDY *et al.* 2013) ativando resposta imune específica e não específica (OOI & LIU 2000, DABA & EZERONYE 2003, ZHANG *et al.* 2013). Outras atividades científicas descritas sobre uso de *Pleurotus* sp. estão descrita na Tabela 1.

Tabela 1: Atividades farmacológicas de substâncias extraídas de cogumelos.

Efeito/doença	Substância	Espécie cogumelo	Mecanismo	Ano	Referência
Anticâncer (próstata)	Extrato não especificado	<i>Agaricus bisporus</i>	Indução da apoptose. Inibição da angiogênese, <i>in vivo</i>	2015	(TWARDOWS KI <i>et al.</i> 2015)
	Fração D	<i>Grifola frondosa</i>	Supressão da atividade de aromatase e da proliferação de células tumorais. Diminuição na produção de estrógeno.	2017	(ALONSO <i>et al.</i> 2017)
Anticâncer (mama)	Triterpenos	<i>Pleurotus eryngii</i>	Supressão da sinalização Akt/NF- κ B	2015	(XUE <i>et al.</i> 2015)
	Andosan	<i>Agaricus blazei</i>	Inibe a proliferação de células tumorais humanas <i>in vivo</i>	2016	(HETLAND <i>et al.</i> 2016)
Anticâncer (colorectal)	Antroquinolol	<i>Antrodia camphorata</i>	Indução da expressão de proteínas pró-apoptóticas e inibição PI3K/AKT	2016	(LIN <i>et al.</i> 2017)
	Extrato aquoso	<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Atividade antitumoral	2013	(FINIMUNDY <i>et al.</i> 2013)
	Extrato micelial	<i>Lentinula edodes</i>	Efeitos antiproliferativos via indução da apoptose	2016	(ISHIKAWA <i>et al.</i> 2016)
Anticâncer (cervical)	Caldo de cultura	<i>Taiwanofungus camphoratus</i>	Atividade antitumoral e efeitos préclínicos positivos	2017	(WANG <i>et al.</i> 2017)
	Andosan TM	<i>Agaricus blazei</i>	Aumento na produção de citocinas <i>in vitro</i> Redução na produção de IL-1- β (97%), TNF- α (84%), IL-17 (50%) e IL-2 (46%). Atividade antioxidante <i>in vivo</i>	2011	(HETLAND <i>et al.</i> 2011)
Anticâncer (pulmonar)	Heteropolissacarídeo	<i>Lentinula edodes</i>	Diminuição na produção de TNF α induzida por lipopolissacarídeos.	2016	(XU <i>et al.</i> 2016)
Imunomodulação	Vários extratos	Várias espécies	Aumento de sobrevivência e funções imunológicas melhoradas	2017	(MENG <i>et al.</i> 2016)
Imunomodulação	Vários extratos	Várias espécies	Efeitos sobre células NK,	2016	(LU <i>et al.</i> 2016)

(hipercolesterolemia)			macrófagos, células T e produção de citocinas. Ativação de vias mitogênicas por quinases (MAPK)		
Imunomodulação (câncer)		<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Aumento da resistência à insulina, devido ao aumento na concentração de adiponectina	2015	(NG <i>et al.</i> 2015)
Imunomodulação (doenças variadas)	Extrato não especificado	<i>Lentinula edodes</i>	Redução significativa na pressão sanguínea, glicose sanguínea, colesterol total e triglicérides (<i>in vivo</i>)	2016	(NG <i>et al.</i> 2015)
Diabetes (tipo II)		<i>Pleurotus eryngii var. ferulae</i>	Efeito hipolipidêmico e de controle de peso via mecanismo envolvendo absorção de colesterol <i>in vivo</i>	2017	(CHOI <i>et al.</i> 2017)
Doenças cardiovasculares	Polissacarídeo	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Protege contra a morte celular neuronal causada pela toxicidade do peptídeo beta-amiloide (A <i>beta</i>) e estresse oxidativo	2017	(ZHANG <i>et al.</i> 2016)
	Polissacarídeo	<i>Ganoderma lucidum</i>	Induz fator de crescimento (FGFR1) (<i>in vitro e in vivo</i>)	2017	(HUANG <i>et al.</i> 2017)
Saúde mental e cognição	AbM extrato	<i>Agarius blazei</i> Murill (AbM)	Decresce concentrações de aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase, normalizando as funções do fígado de pacientes com hepatite B	2008	(HSU <i>et al.</i> 2008)
	Lectin	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Antiviral e protetora do fígado em hepatite crônica	2017	(HE <i>et al.</i> 2017)
	Ganodermanol	<i>Ganoderma capense</i>	Inibição da protease HIV-1	2017	(TAN <i>et al.</i> 2017)
Hepatite B	Extrato aquoso enzimático	<i>Agaricus bisporus</i>	Age no estágio inicial da replicação viral	2016	(DELGADO-POVEDANO <i>et al.</i> 2016)

	Extrato não especificado	<i>Cordyceps</i> sp.	Inibe a proliferação e a diferenciação das células Th2 e reduz a expressão de citocinas, em células mononucleares do sangue periférico. Alivia inflamação crônica por aumentar as concentrações de IL-10 (<i>in vivo</i>)	2016	(WANG <i>et al.</i> 2016)
Antiviral (HIV)	Extrato não especificado	<i>Lentinula edodes</i>	Inibe a proliferação e a diferenciação das células Th2 e reduz a expressão de citocinas. Alivia inflamação crônica por aumentar as concentrações de IL-10 (<i>in vivo</i>)	2016	(KIM <i>et al.</i> 2016)
Antiviral (HCV)	Fibra	<i>Pleurotus sajor-caju.</i>	Atenuam sintomas relacionados à constipação sem efeitos colaterais significativos (<i>in vivo</i>)	2012	(PARAB <i>et al.</i> 2012)
Asma	Vários extratos	<i>Lignosus rhinocerusla</i>	Aumento da IgE	2014	(JOHNATHAN <i>et al.</i> 2016)
Constipação	Polissacarídeo	<i>Pleurotus tuberregium</i>	Aumento do bolo fecal	2014	(CHEN & CHEUNG 2014)

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Avaliar o impacto da dieta composta de ração suplementada com *Pleurotus* sp. em camundongos *Swiss* em condições de tratamento com o MTX.

3.2. Objetivos Específicos

- Produzir uma ração suplementada com micélio de *Pleurotus* sp. e determinar a composição de proteína bruta e o perfil de minerais presente na ração;
- Avaliar o quadro clínico de camundongos em condições de tratamento com o fármaco MTX e alimentados com a ração suplementada com *Pleurotus* sp.;
- Determinar parâmetros de ganho de peso e consumo de alimentos;
- Realizar análises morfológicas macro e microscópicas do fígado, baço e rins e dados parasitológicos, hematológicos, leucocitários e bioquímicos dos grupos experimentais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Identificação do Basiodimiceto e Produção de Banco de Cultura

O fungo basiodimiceto comestível foi armazenado no Laboratório de Biomoléculas e Vacina da Universidade Federal do Tocantins – UFT, Campus de Gurupi – TO. Foi realizado a multiplicação do isolado fungico usando disco de 4mm de meio colonizado com *Pleurotus* sp. transferido em placas de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) mantidas a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, até o seu completo crescimento e, posteriormente foram armazenadas a 4°C para serem utilizadas como inoculo (BONONI *et al.* 1999). Além disso, uma placa contendo o micélio fungico foi enviada para a identificação morfológica que foi realizada na Universidade de Brasília – UnB, Departamento de Fitopatologia, Laboratório Micologia, sendo confirmado que a classificação taxonômica *Pleurotus ostreatus* (Anexo 02).

4.2. Preparo da ração suplementada com micélios de *Pleurotus* sp.

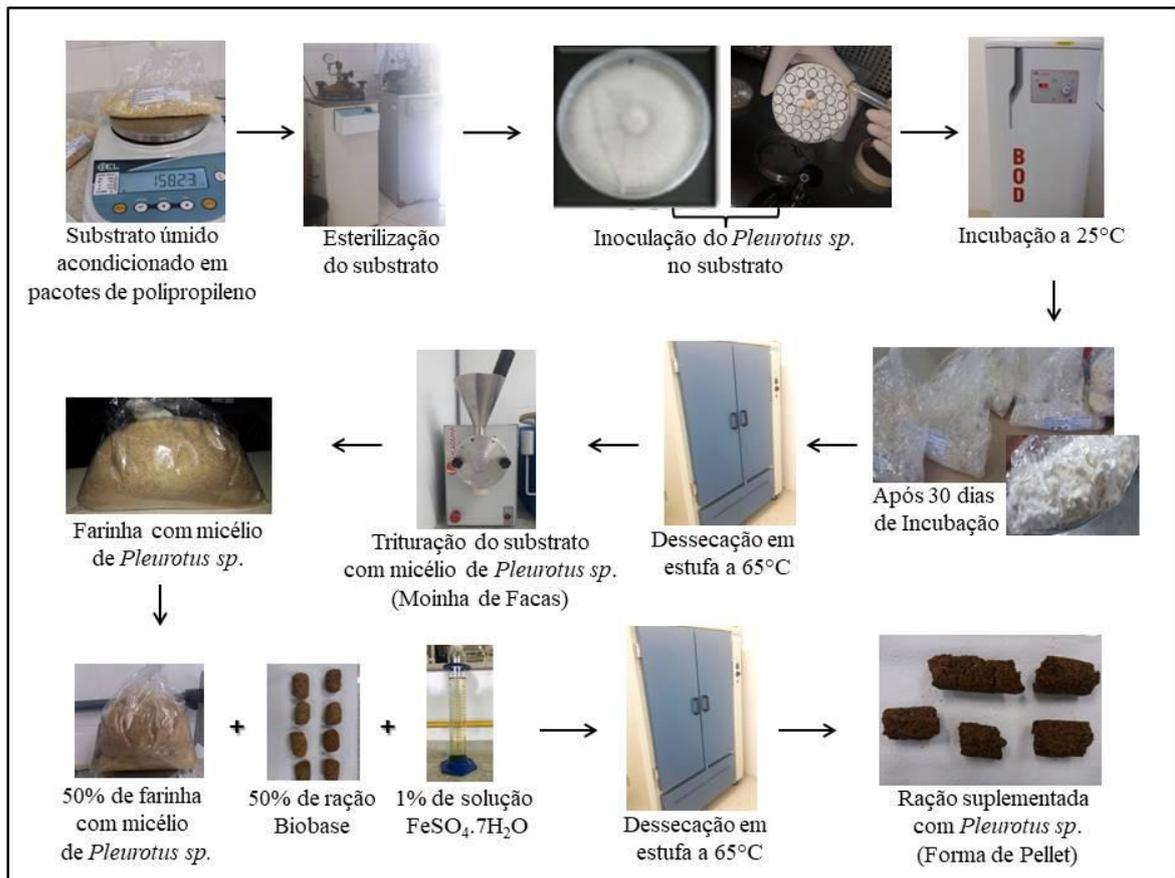
A preparação da ração suplementada com micélios de *Pleurotus* sp esta descrita no fluxograma da Figura 3. Utilizou-se como substrato o arroz (*Oryza sativa*) tipo I, esses grãos foram pesados (150g) em saquinhos de polipropileno transparente e posteriormente adicionou-se 100mL de água destilada na amostra. Os sacos foram lacrados com fita crepe e esterilizados a 121°C por 1 hora. Após a amostra atingir a temperatura ambiente, em câmara de fluxo laminar, cada saco recebeu 5 discos de 1cm de diâmetro de *Pleurotus* sp. cultivado em meio de cultura BDA. O modulo de fermentação foi incubado a 25°C no escuro durante 30 dias para a completa colonização dos grãos. Após a colonização do micélio realizou-se o processo de secagem em uma estufa de circulação à de 65°C .

Visando a obtenção de micélios de *Pleurotus* sp. foi realizado e observado a colonização do substrato de arroz após a inoculação. Ao final do cultivo verificou-se a cobertura total do substrato, se apresentava aspecto branco aveludado, denso, volumoso e sem presença de contaminações (Figura 4).

Após a colonização do fungo, os sacos foram retirados da estufa e levados à dessecação à 65°C . Em seguida o material foi triturado no moinho de facas tipo Willey e a suplementação de solução aquosa de sulfato ferroso a 1% à 65°C . A ração teste foi concluída considerando 50% do micélio e 50% da ração *Biobase*® - Brasil (controle). A etapa de produção e desidratação da biomassa de *Pleurotus* sp., foi realizada em condições assépticas

e/ou higiênico-sanitárias. A ração suplementada foi identificada e armazenada em sacos plásticos lacrados em temperatura ambiente.

Figura 4: Etapas de produção da ração suplementada com micélios de *Pleurotus sp.* e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.



4.2.1. Determinação do teor de proteína bruta

A determinação do teor de proteína bruta foi realizada no Laboratório de Química do Instituto Federal do Tocantins – *Campus* Gurupi. O teor de proteína bruta foi calculado através da multiplicação do teor de nitrogênio total pelo fator de correção (FURLANI & GODOY, 2005; SILVA *et al.* 2007; PAULI, 2010; A.O.A.C., 2016).

4.2.2. Determinação da presença de minerais da ração suplementada e ração controle

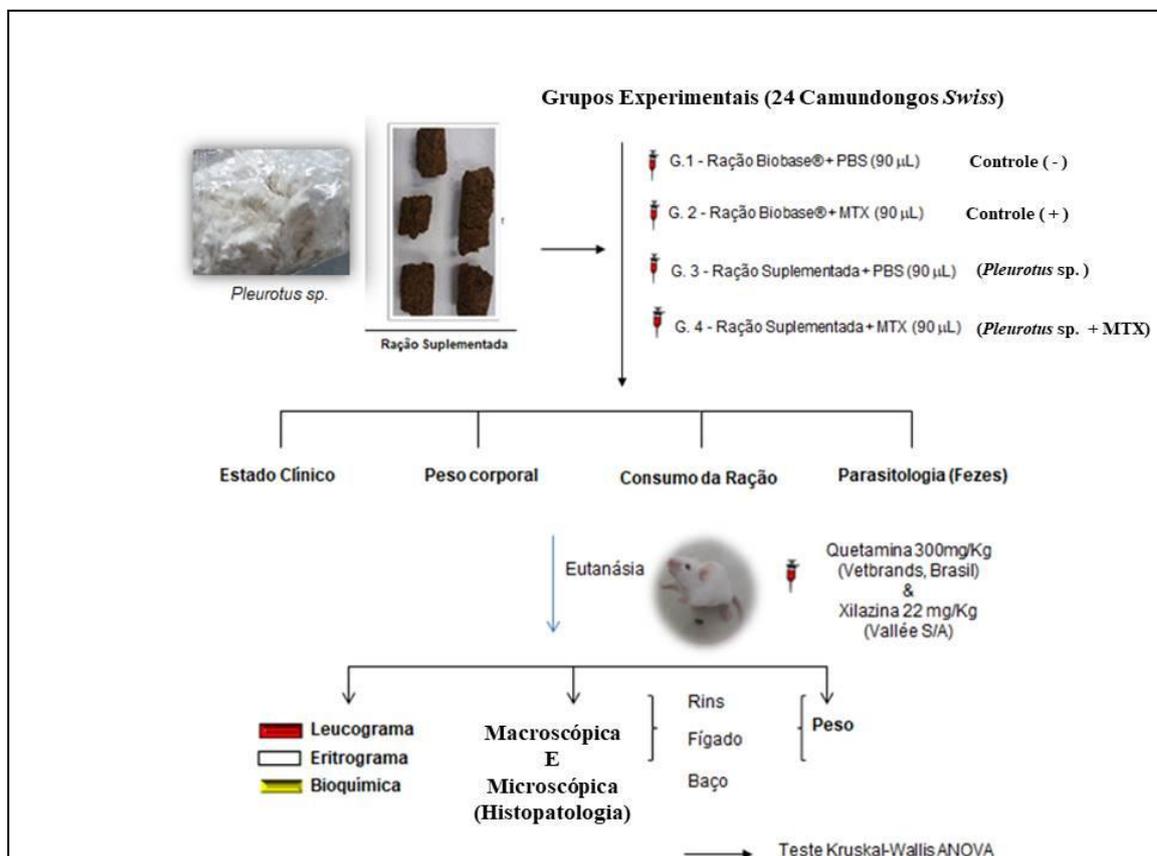
A determinação dos minerais foi realizada em colaboração com o Laboratório de Análises Agrícolas do Tocantins *Ltda* – Gurupi - TO. As amostras foram desidratadas em estufa de circulação de ar forçada a 65°C, em seguida submetidas à digestão úmida HNO_3 +

HClO₄ (3:1). O teor de fósforo foi determinado por espectrofotometria com azul de molibdênio e o teor de cálcio, magnésio, potássio, sódio, cobre, ferro, manganês e zinco por espectrofotometria de absorção atômica (EAA). Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os valores de macronutrientes (Ca, P, Mg, K) foram calculados em g.kg⁻¹ e os dos micronutrientes (Na, Fe, Cu, Mn e Zn) em mg.kg⁻¹, segundo os métodos de Silva *et al.* (2009).

4.3. Delineamento experimental

O experimento foi conduzido conforme a descrito na Figura 5.

Figura 5: Fluxograma da parte experimental com modelos *Murinos*.



4.3.1 Grupos experimentais

Inicialmente determinou a dose de $120\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (MTX) do peso corpóreo por via intraperitoneal e a observação do estado clínico (pelo arrepiado, escurecimento da cauda, respiração rápida, lacrimação, inchaço corpo, letargia, diarreia e morte) de três camundongos por 72 horas. De acordo com os resultados observados, a dosagem foi ajustada para $90\text{mg}/\text{Kg}^{-1}$ sendo o padrão experimental adotado.

Foram utilizados camundongos *Swiss* de ambos os sexos. O medicamento usado para a imunossupressão é o MTX. Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais, sendo:

- G1 – Grupo com 6 (seis) camundongos *Swiss* alimentados com ração controle e administrado Tampão fosfato-salino ou *Phosphate Buffered Saline* (PBS) a 0,9%, na dose de $90\text{mg}/\text{Kg}^{-1}$ do peso corpóreo por via intraperitoneal.
- G2 – Grupo com 6 (seis) camundongos *Swiss* alimentados com ração controle e administrado MTX, na dose de $90\text{mg}/\text{Kg}^{-1}$ do peso corpóreo por via intraperitoneal.
- G3 – Grupo com 6 (seis) camundongos *Swiss* alimentados com ração suplementada com *Pleurotus* sp. e administrado PBS, na dose de $90\text{mg}/\text{Kg}^{-1}$ do peso corpóreo por via intraperitoneal.
- G4 – Grupo com 6 (seis) camundongos *Swiss* alimentados com ração suplementada com *Pleurotus* sp. e administrado MTX, na dose de $90\text{mg}/\text{Kg}^{-1}$ do peso corpóreo por via intraperitoneal.

4.3.2 Ética em camundongos

Esta pesquisa foi autorizada pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal da Universidade Federal do Tocantins (UFT) sob o número do processo 23.101.001.819/2019-70, seguindo as recomendações internacionais de ética em experimentação animal.

Foram utilizados 24 camundongos *Mus musculus* de ambos os sexos (macho e fêmea) da linhagem *Swiss* albino, com 45 dias de idade, massa corporal média inicial de 17 a 23g gramas, adquiridos do Biotério Central de Goiânia – GO, da Universidade Federal de Goiás (UFG). Os animais foram mantidos em temperatura controlada, luminosidade adequada, sendo os ciclos de claro/escuro de 12 horas, e durante o experimento foram alimentados com a ração controle (Biobase® - Brasil) e com a ração suplementada com micélios de *Pleurotus* sp. e água purificada.

Os animais após serem observados, foram submetidos à coleta de dados de peso corporal e consumo de alimentos. Os animais foram alocados em caixas de polipropileno com grades específicas para criação, medindo 27x19x20cm, armazenadas em sala climatizada a 24°C com controle de luminosidade e odor. As gaiolas com animais foram alimentados diariamente e com água purificada em comedouro tipo túnel e bebedouro de polipropileno com capacidade para 300mL. Os mesmos permaneceram em aclimação por seis dias, sendo no sétimo dia realizado a eutanásia, para a obtenção dos resultados, totalizando um período experimental de sete dias. As caixas foram higienizadas diariamente com troca da cama (maravalha autoclavada) para evitar uma possível contaminação, pois alguns animais encontravam-se imunossuprimidos pelo tratamento com o fármaco MTX. Para definir o quadro de imunossupressão foram realizados experimentos para determinação da dosagem de MTX a serem empregadas durante estudo.

A coleta de amostras biológicas como sangue, fígado, baço e rins foi realizada em seis animais por grupo no início e no final do experimento. Antes da coleta amostral os camundongos foram submetidos ao processo anestésico com Quetamina 300mg/Kg⁻¹ (Vetbrands, Brasil) e Xilazina 22mg/Kg⁻¹ (Vallée S/A), do peso corpóreo por via intraperitoneal e eutanasiados por deslocamento cervical sendo morte rápida e indolor (CANGUSSU *et al.* 2018). No mesmo momento, foram coletados por punção cardíaca sangue e órgãos para as análises hematológicas, função hepática e morfologia de órgãos. Os órgãos foram armazenados em formol 10% para preparação de lâminas histopatológicas.

4.4. Avaliação da massa corporal e consumo de ração

Avaliou-se periodicamente a massa corporal de cada animal através do uso de uma balança semi-analítica (*Bel Engineering*) e determinou-se o consumo alimentar de cada grupo referente o ganho e/ou perda de massa corpórea. Os animais foram acompanhados diariamente até o 7º dia do protocolo experimental para a análise da sobrevivência e avaliação do estado clínico (pelo arrepiado, escurecimento da cauda, respiração rápida, lacrimação, inchaço corpo, letargia, diarreia e morte). A sobrevivência foi expressa como taxa de sobrevivência (%).

4.4.5. Análise Parasitológica de Fezes

A coleta do material (fezes) foi realizada diariamente e identificados previamente conforme cada grupo, sendo observada a ausência/presença de cistos de protozoários, ovos

helmintos e de larvas. O material biológico foi analisado pela *Clínica Veterinária Pet Shop Dog Center* (Gurupi / TO - Brasil).

4.4.6. Dados Hematológicos, Leucocitários e Bioquímicos

No 7º dia, os animais foram previamente anestesiados e eutanasiados por deslocamento cervical e as amostras sanguíneas foram obtidas por punção cardíaca. As amostras de sangue com o anticoagulante heparina sódica 50U/mL para a realização do hemograma. Foram analisados os resultados de número total de eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$), leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$) e plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$); contagem diferencial de leucócitos (%); a concentração de hemoglobina (g/dL); determinação do hematócrito (%), e dos índices hematimétricos, tais como o Volume Corpuscular Médio (VCM, *f*), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM, pg) e a Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM, %). A função renal foi determinada com dosagem de ureia e creatinina, enquanto que a função hepática e perfil lipídico por TGO, TGP, proteínas totais, colesterol total, respectivamente. Todas as análises de dados hematológicos e bioquímicos foram realizadas pela *Clínica Veterinária Pet Shop Dog Center* (Gurupi / TO – Brasil).

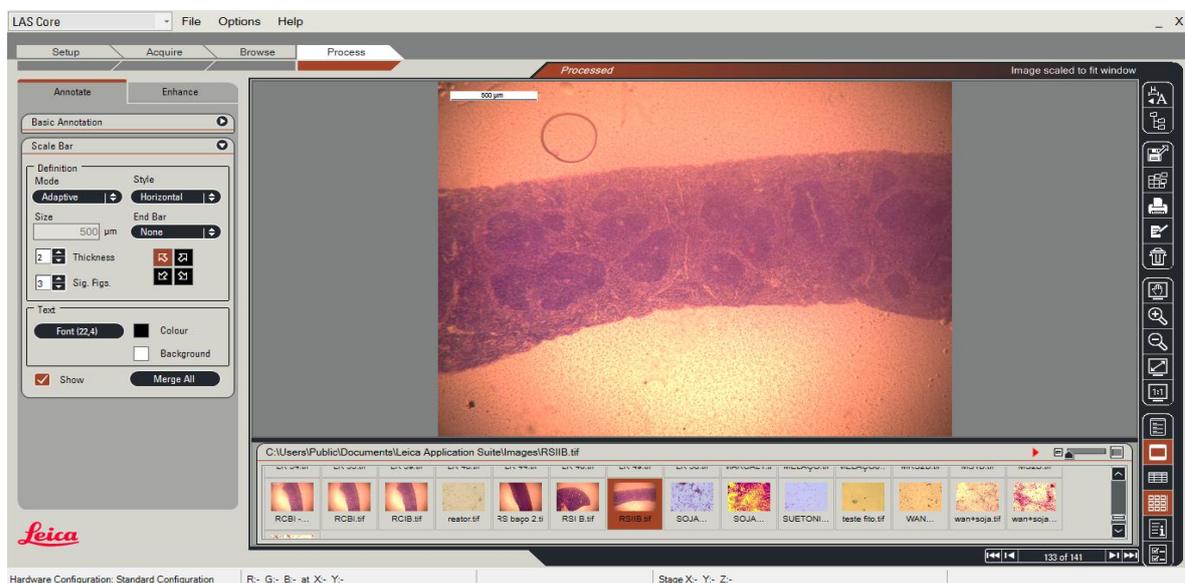
4.4.7. Análise dos parâmetros histológicos

Uma vez coletados, os seguintes órgãos: fígado, rins e baço, foram realizadas as clivagens de acordo com cada órgão, e os mesmos foram fixados em formol a 10% por um tempo de 72h. Após fixação, os órgãos foram então desidratados em concentrações crescentes de álcool (70 a 100%), diafanizados em xilol, impregnados e inclusos em parafina, e uma vez montado os blocos, os mesmos foram cortados com o auxílio de um micrótomo em intervalos de 5 μm . As lâminas contendo as secções foram então coradas pelo método de Hematoxilina \pm Eosina (HE). Na avaliação histológica foram considerados alguns parâmetros como indicativos patológicos a depender do órgão avaliado. Todos os procedimentos histológicos foram realizados no Laboratório de Vacinas da Universidade Federal do Tocantins (UFT) campus Gurupi. As análises histológicas do baço, rins e fígado foram realizados considerando o escore histológico, baseando-se nos seguintes parâmetros para quantificação dos resultados: edema, degeneração, hemorragia, necrose, inflamação aguda e hiperemia (- ausente; + discreto; ++ moderado; +++ severa), adaptado de Brunt *et al.* (2011) de acordo com as principais alterações hepáticas observadas nos camundongos.

4.4.8. Fotomicrografias

As fotomicrografias das lâminas histológicas foram realizadas no Laboratório da Pós-graduação da Produção Vegetal da Universidade Federal do Tocantins (UFT) campus Gurupi. As imagens foram obtidas através do software *Leica Application Suite* (versão 4.9.0) em microcomputador associado ao microscópio óptico Leica DM1000 LED acoplado a microcâmera digital Leica (Figura 6). Para cada corte histológico, foram fotografadas regiões aleatórias.

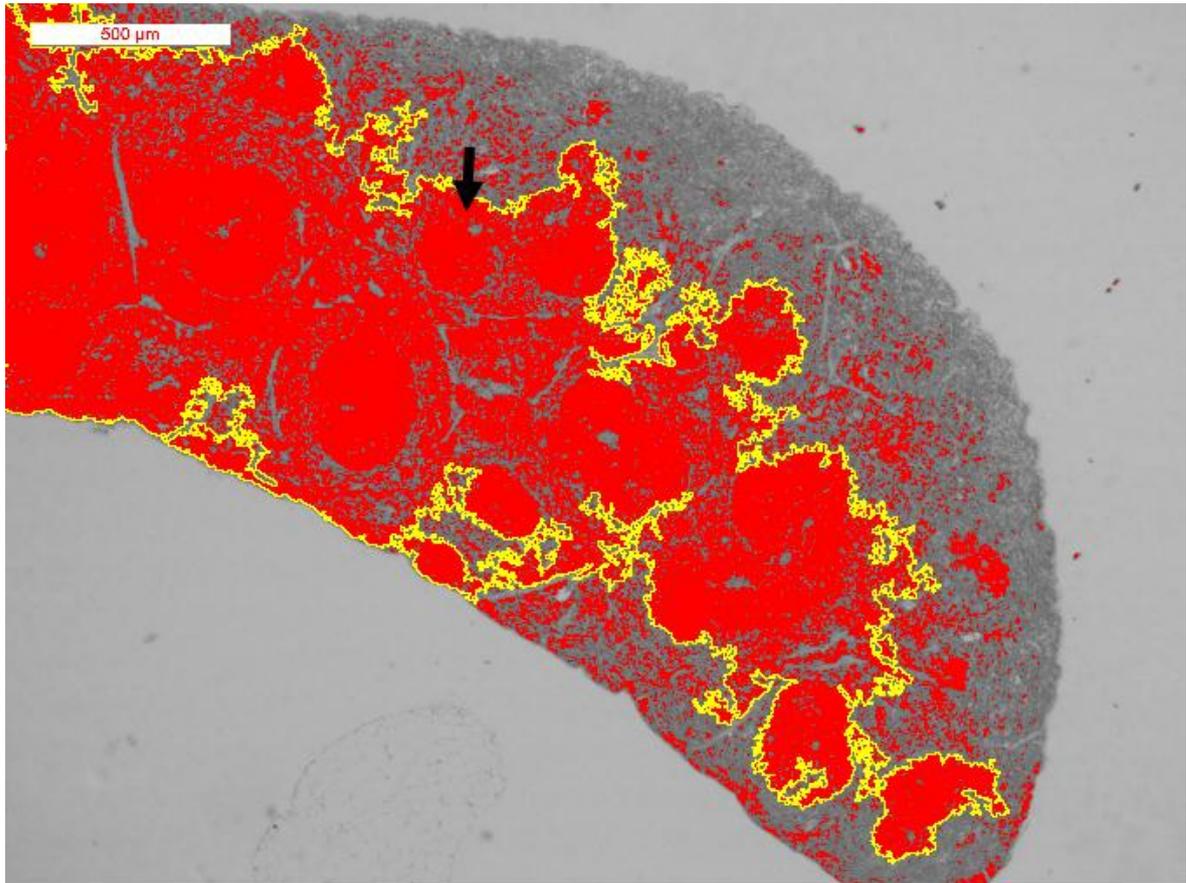
Figura 6: Obtenção das imagens através do software *Leica Application Suite* (versão 4.9.0).



4.4.9. Análise da expansão de área polpa de baços de camundongos de grupos experimentais.

Dos animais dos grupos G1, G3 e G4 foram feitos cortes histológicos do baço, corados com hematoxilina/eosina. Foram capturadas imagens com objetiva de 4x por meio de um fotomicroscópio da marca *Leica Application Suite* (versão 4.9.0). De cada grupo foram capturadas 10 imagens de campos diferentes. As imagens foram analisadas pelo software ImageJ®, versão 1.47v ano 2012, onde foram medidas as áreas da poupa do órgão como propósito de verificar a possível expansão desta área (Figura 7).

Figura 7: Imagem do baço com filtro expondo a área da polpa esplênica, com aumento de 4x.



O software ImageJ® vai calcular automaticamente a área da polpa (Figura 7), conforme mostra na seta, com boa precisão e conversor de medidas para qualquer unidade desejada pelo operador. A medida e/ou aferição se faz manualmente através do mouse do computador que, contornando os bordos da polpa gera automaticamente o resultado da mensuração (WAYNE, 2007; PAPADOPULOS, 2007).

4.5. Análise estatística

O teste *Kruskal-Wallis* ANOVA foi usado para comparar os dados da contagem sanguínea, tais como parâmetros hematológicos, leucocitários e bioquímicos dos grupos estudados, sendo:

- G1vsG2 – analisa o efeito MTX (*);
- G3vsG4 – analisa o efeito da ração suplementada com *Pleurotus* sp. com o tratamento com MTX (**).

Dados significativos foram considerados quando $p < 0,05$ com IC a 95%. A curva de sobrevivência de Kaplan-Meier definiu a probabilidade de eficácia da ração suplementada com

MTX e na ausência da imunossupressão. Para o cálculo da diferença entre a área da polpa branca foi utilizado o teste de Análise de variância (ANOVA) com $p \leq 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1. Teor de proteína e presença de minerais das rações (composição da ração)

A análise da composição nutricional da ração suplementada em macro e micronutrientes comprovou um aumento no teor de nitrogênio, fósforo, potássio, boro, ferro e proteína bruta em relação ao teor da ração controle (Tabela 2).

Tabela 2: Teor de macro (g/kg^{-1}), micronutrientes (mg/kg^{-1}) e proteína bruta no alimento suplementar com *Pleurotus* sp., na ração suplementada com *Pleurotus* sp. e na ração controle.

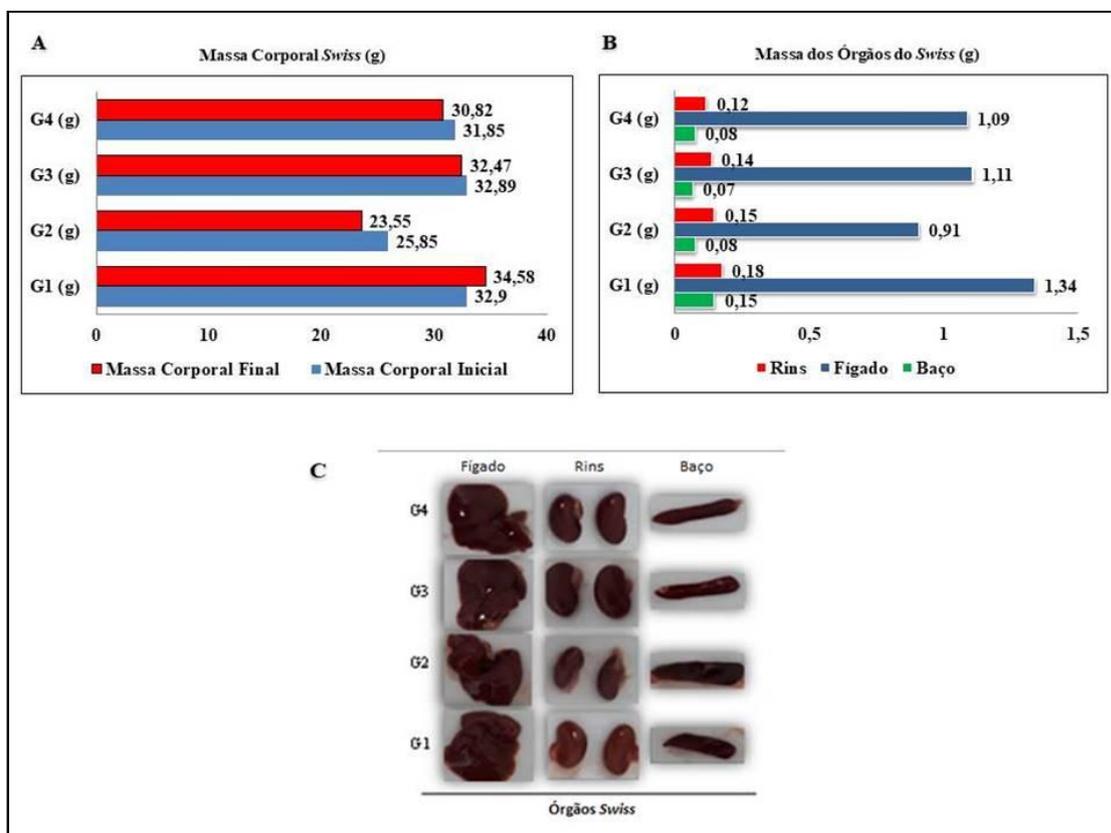
	Alimento com <i>Pleurotus</i> sp.	Alimento com <i>Pleurotus</i> sp. e ração controle (1:1)	Ração controle
Macronutrientes	g/kg^{-1}	g/kg^{-1}	g/kg^{-1}
Nitrogênio (N)	14,7	26,6	41,3
Fósforo (P)	1,0	6,0	5,5
Potássio (K)	2,0	6,5	10,0
Cálcio (Ca)	2,0	5,0	23,2
Magnésio (Mg)	1,0	1,4	2,9
Enxofre (S)	1,3	2,3	3,3
Micronutrientes	mg/kg^{-1}	mg/kg^{-1}	mg/kg^{-1}
Boro (B)	12	26	36
Cobre (Cu)	3	21	60
Ferro (Fe)	135	485	647
Manganês (Mn)	10	98	277
Zinco (Zn)	11	107	258
Proteína Bruta	83,1%	166,2%	258,1%

5.2. Efeito da suplementação no comportamento dos animais

O ensaio toxicológico do MTX ($90\text{mg}/\text{Kg}^{-1}$ por via intraperitoneal), no intervalo de 72 horas, nas primeiras horas ocorreu efeitos colaterais nos camundongos apresentando, agitação constante, aceleração cardíaca, alternância de pelos arrepiados e lisos nos grupos (G2 e G4). Entretanto, durante a fase experimental (sete dias), esse quadro clínico cessou não sendo evidenciado nenhum sinal de inquietação, fadiga, ou

mesma perda de peso que são características iniciais provocadas pela administração de MTX. Os grupos G3 e G4 alimentados com *Pleurotus* sp., não resultou em nenhuma morte durante o período de observação (7 dias) como também não interferiu no desenvolvimento e no consumo de ração pelos camundongos.

Figura 8: Efeito da ração suplementada de *Pleurotus* sp em camundongos *Swiss*.



A) Efeito da ração suplementada com *Pleurotus* sp. na massa corporal em camundongos *Swiss* (G1, G2, G3 e G4). B) Efeitos da ração suplementada com *Pleurotus* sp. na massa dos rins, fígado e baço em camundongos *Swiss* (G1, G2, G3 e G4) com ração suplementada e controle. C) Efeitos da ração suplementada com *Pleurotus* sp. nos aspectos macroscópicos do rim, fígado e baço em camundongos *Swiss* tratados (G1, G2, G3 e G4). Sendo que: G1 (ração controle e 90 mg.Kg⁻¹ de PBS); G2 (ração controle e 90 mg.Kg⁻¹ de MTX); G3 (ração suplementada com *Pleurotus* sp. e 90 mg.Kg⁻¹ de PBS); G4 (ração suplementada com *Pleurotus* sp. + 90 mg.Kg⁻¹ de MTX). Seis animais usados para coletar os dados. Média (desvio-padrão). Significance found by Kruskal Wallis T- test. G1 vs G2 (efeito do MTX) (*), G3 vs G4 (efeito suplemento + MTX) (**). (##) Sem Jejum.

Em relação à massa corporal do grupo experimental observou menor variação nos animais do grupo G2 ($p < 0,05$), e menor consumo de ração em relação aos demais grupos. A variação corporal dos grupos G1, G3 e G4 não foram significativo ($p > 0,05$) (Figura 8A) e também não apresentou diferenças ($p > 0,05$) na massa corporal inicial e final entre

os grupos G2 e G4. Houve menor perda de massa corporal apenas nos animais do G4 (Figura 8A). Não foram observados ovos ou cistos de parasitas intestinais e tão pouco diarreia entre os animais tratados pela suplementação de *Pleurotus* sp. (G3 e G4) associado às doses de MTX (G4).

5.3. Análises morfológicas dos tecidos coletados

As análises morfológicas do baço, fígado e rins dos *Swiss* foram realizadas visando avaliar diferenças no peso dos órgãos, expansão, congestão ou alteração da coloração (Figura 8BC). Aqui foram verificados que a massa do fígado dos grupos G3 (1,11g) e G4 (1,11g) não apresentaram diferenças entre si ($p < 0,05$), e ambos grupos com ausência de toxicidade e congestão (Figura 8BC). Além disso, observou que a sob administração do fármaco MTX (Grupo G2), este não sinalizou efeito deletério ao fígado, A expansão e massa do baço não revelaram efeito significativo entre os grupos G1 e G2 ($p > 0,05$), entretanto, os animais dos grupos G3 e G4 ($p < 0,05$) tiveram diferenças de massa neste órgão. Análises da função renal revelaram diferenças significativas entre os grupos G1 e G2 ($p < 0,05$) e G3 e G4 ($p < 0,04$). No grupo G2 houve aumento significativo em relação aos grupos G1, G3 e G4. Assim, podemos sugerir que a administração do MTX pode afetar a função renal ($p < 0,05$) (Figura 8C, Tabela 4).

5.4. Análises hematológicas e bioquímicas

Em relação aos dados hematológicos e bioquímicos visou-se determinar a ocorrência de alterações leucocitárias, eritrocitárias, hemoglobina e hematócrito. Nossos resultados determinaram ausência de leucopenia e leucocitose. Entretanto, houve diferença significativa entre o número de leucócitos do grupo G2 tratado com MTX em relação ao grupo G1 ($p < 0,02$) (Tabela 3). Não houve leucopenia, número de leucócitos totais abaixo de $4000\mu\text{L}$ ou tão pouca leucocitose elevação dos números de leucócitos totais superiores a $10000\mu\text{L}$. No entanto, os grupos G2, G3 e G4 apresentaram a hemoglobina baixa, fora do valor de referência (Tabela 3) e se faz necessário a confirmação destes dados em experimentos futuros visando a elucidação do quadro de anemia ocorrido aqui

Na Tabela 4, são apresentadas as análises bioquímicas de plasma sanguíneo de camundongos *Swiss* a fim de avaliar a ocorrência de toxicidade da alimentação durante o

tratamento com MTX. Assim, observou-se que o MTX provocou elevação dos níveis de ureia superiores a valores referenciais nos animais alimentação com ração controle. No entanto, é observada redução significativa dos níveis de ureia ($p < 0,04$) no plasma sanguíneo de animais alimentado com ração suplementada e em tratamento com MTX e dentro de valores referenciais (Tabela 4). Verificou-se diminuição dos níveis de TGP aos grupos G3 e G4 dentro dos valores de referência. Houve redução dos níveis de TGP quando alimentados animais com ração suplementada e em tratamento com MTX (G4) comparados com animais controles em tratamento com MTX (G2) (Tabela 4). Aqui, nossos resultados revelaram que durante o tratamento com MTX e a suplementação de micélios, os animais apresentaram alterações nos níveis de Ureia, TGO e TGP. Assim, em experimentos futuros este serão os principais parâmetros a ser utilizado nas análises da função renal e hepática.

Tabela 3: Média, desvio-padrão e valores de referência de parâmetros hematológicos de camundongos *Swiss*, alimentados com ração suplementada com *Pleurotus* sp. e ração controle.

Parâmetros Sanguíneos	Grupos				P	Referência
	G1 n=6	G2 n=6	G3 n=6	G4 n=6		
Leucócitos (μL)	8466(\pm 982)	4700 (\pm 141)	6000 (\pm 1980)	9400 (\pm 283)	*(0,02)	4,300 – 10,000
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	4,3 (\pm 1,41)	4,7 (\pm 0,14)	4,7 (\pm 1,3)	4,55 (\pm 0,07)	-	4,3 – 6,0
Hemoglobina (g/dL)	10,60(\pm 2,80)	9,45 (\pm 0,12)	9,45 (\pm 2,62)	9,15 (\pm 0,21)	-	13 – 17
Hematócrito (%)	38,80(\pm 6,36)	31,0 (\pm 2,83)	28,5 (\pm 7,78)	27,5 (\pm 0,71)	-	39 – 51
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	307 (\pm 48,08)	238 (\pm 5,66)	277 (\pm 89,09)	375 (\pm 55,15)	-	200 - 830

(#)Leucograma e Eritrograma, (+) - Seis animais usados para dados destes parâmetros; Unidade $10^6/\mu\text{L}$ e $10^3/\mu\text{L}$, respectivamente. Média (desvio-padrão). Significance found by Kruskal Wallis T- test. G1 vs G2 (efeito do MTX) (*); G3 vs G4 (efeito suplemento + MTX) (**). Sendo: G1 (ração controle e 90 mg.Kg^{-1} de PBS); G2 (ração controle e 90 mg.Kg^{-1} de MTX); G3 (ração suplementada com *Pleurotus* sp. e 90 mg.Kg^{-1} de PBS) e G4 (ração suplementada com *Pleurotus* sp. + 90 mg.Kg^{-1} de MTX).

(##) Sem Jejum.

Tabela 4: Média, desvio-padrão e valores de referência do parâmetro bioquímico de camundongos *Swiss*, alimentados com ração suplementada com *Pleurotus* sp. e ração controle.

Parâmetros Sanguíneos	Grupos				p	Referência
	G1 n=6	G2 n=6	G3 n=6	G4 n=6		
BIOQUÍMICA						
Creatinina (mg/dL)	1,1 (±0,42)	0,55 (±0,07)	1,2 (±0,42)	1,65 (±0,07)	-	0,6 – 1,4
Ureia (mg/dL)	44,5 (±0,71)	66 (±8,48)	29 (±2,82)	34,5 (±0,71)	** (0,04)	10 – 45
TGO (U/L)	476 (±130,11)	495 (±199,40)	220 (±16,97)	380 (±288,50)	-	81 – 180
TGP (U/L)	148 (±16,97)	165 (±89,09)	58 (±8,48)	53 (±7,07)	-	36 – 58
Proteína Total (g/dL)	6,2 (±0)	10 (±0,71)	6,85 (±2,61)	6,85 (±0,92)	* (0,02)	5,4 – 6,6
Colesterol Total (mg/dL)	125 (±1,41)	145,5 (±16,26)	104 (±11,31)	112 (±11,31)	-	55 - 79

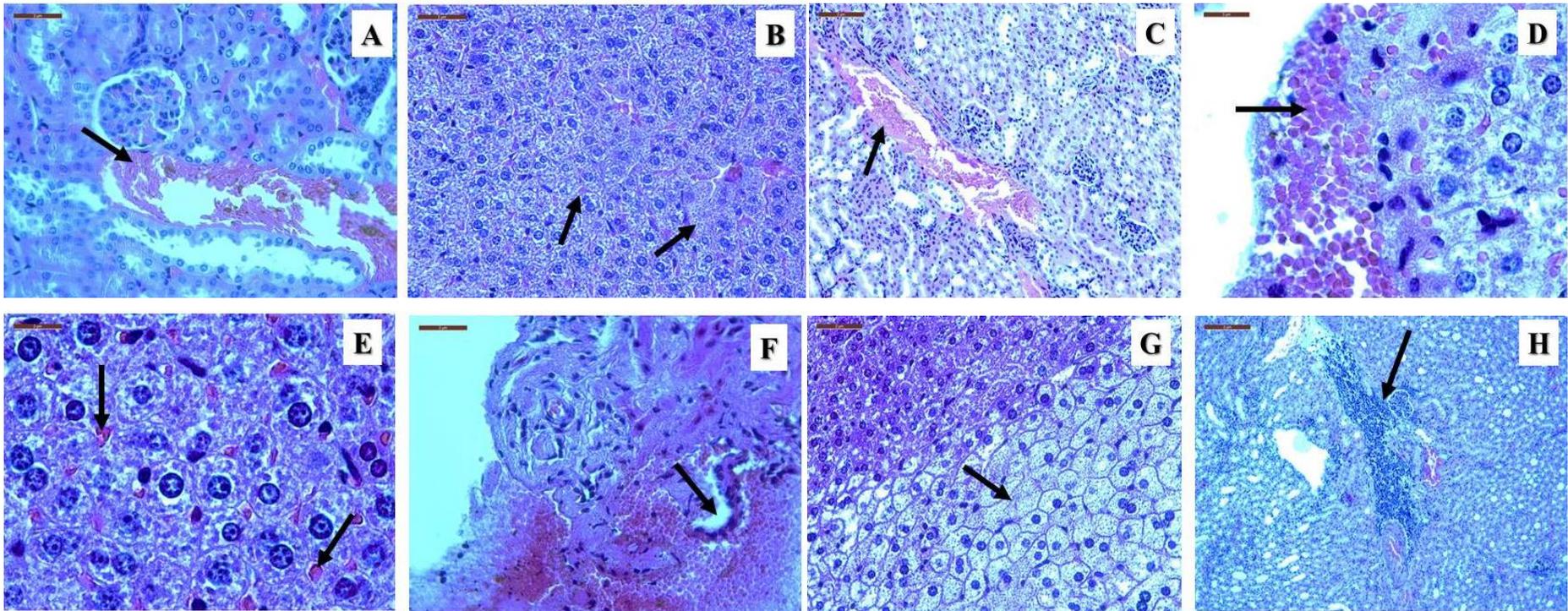
(#) Bioquímicos, (+) - Seis animais usados para dados destes parâmetros; Unidade $10^6/\mu\text{L}$ e $10^3/\mu\text{L}$, respectivamente. Média (desvio-padrão). Significance found by Kruskal Wallis T- test. G1 vs G2 (efeito do MTX) (*); G3 vs G4 (efeito suplemento + MTX) (**). Sendo: G1 (ração controle e 90 mg.Kg^{-1} de PBS); G2 (ração controle e 90 mg/Kg de MTX); G3 (ração suplementada com *Pleurotus* sp. e 90 mg.Kg^{-1} de PBS) e G4 (ração suplementada com *Pleurotus* sp. + 90 mg.Kg^{-1} de MTX). TGO= Transaminase Glutâmico-Oxalacética, TGP =Transaminase Glutâmico Pirúvica.

(##) Sem Jejum.

5.5. Análise histopatológica dos órgãos coletados

A análise histopatológica do fígado, rins e baço dos grupos experimentais foram realizadas a fim de avaliar lesões como edema (ED), degeneração (DE), hemorragia (HE), necrose (NE), inflamação (INF) e hiperemia (HI) (Tabela 5, Figura 9). Não foi observado nenhum sinal de edema de rins, baço e fígados dos grupos G1 e G3 e discreto edema de fígado de animais do grupo G4 correspondente à suplementação alimentar e tratamento com MTX. Degeneração foi observada apenas no fígado do grupo G3 (discreta) e grupo G4 (moderada). Entretanto, foi observada hemorragia (discreta) nos órgão rins (G1), (G3) rins e fígado. Fígado e rins do grupo G4 apresentou hemorragia (moderado). Inflamação foi observada em rins do grupo G4 (moderado). Enquanto que fígado dos grupos G3 e G4 apresentaram hiperemia (moderada) e (severa) respectivamente. O grupo G4 que representa a alimentação suplementada com micélio de *Pleurotus* sp. conjuntamente com o tratamento MTX parece auxiliar na recuperação de danos patológicos em comparação ao grupo G3 também com suplementação alimentar sem o tratamento MTX. Não teve alteração no baço dos grupos controles (Tabela 5, Figura 9).

Figura 9: Alterações histopatológicas de fígado e rins de camundongos *Swiss* inoculados o fármaco MTX e alimentados com alimento suplementado com *Pleurotus* sp.



Sendo: A – Região dos rins (G1) apresentando hemorragia discreta (HE, obj. 40x); B – Região do fígado (G3) com degeneração (HE, obj. 40x); C – Região dos rins (G3) apresentando hemorragia (HE, obj. 20x); D – Hemorragia no fígado (G3) (HE, obj. 100x); E – Região do fígado (G3) apresentando hiperemia (HE, obj. 40x); F – Região do fígado (HE, obj. 40x) (G4); G – Região do fígado apresentando degeneração (HE, obj. 40) (G4); H – Região do rim apresentando inflamação (HE, obj. 40x) (G4). G1 (ração controle e 90 mg.Kg⁻¹ de PBS); G3 (ração suplementada com *Pleurotus* sp. e 90 mg.Kg⁻¹ de PBS); G4 (ração suplementada com *Pleurotus* sp. + 90mg.Kg⁻¹ de MTX).

Tabela 5: Intensidade de processos patológicos gerais em fígado, rim e baço - camundongos Swiss infectados sete dias após a alimentação e inoculação do MTX.

Grupos	Órgãos	Processos Patológicos					
		ED	DE	HE	NE	INF	HI
G.1	Fígado	-	-	-	-	-	-
	Rim	-	-	+	-	-	-
	Baço	-	-	-	-	-	-
G.3	Fígado	-	+	+	-	-	++
	Rim	-	-	+	-	-	-
	Baço	-	-	-	-	-	-
G.4	Fígado	+	++	++	-	-	+++
	Rim	-	-	++	-	++	-
	Baço	-	-	-	-	-	-

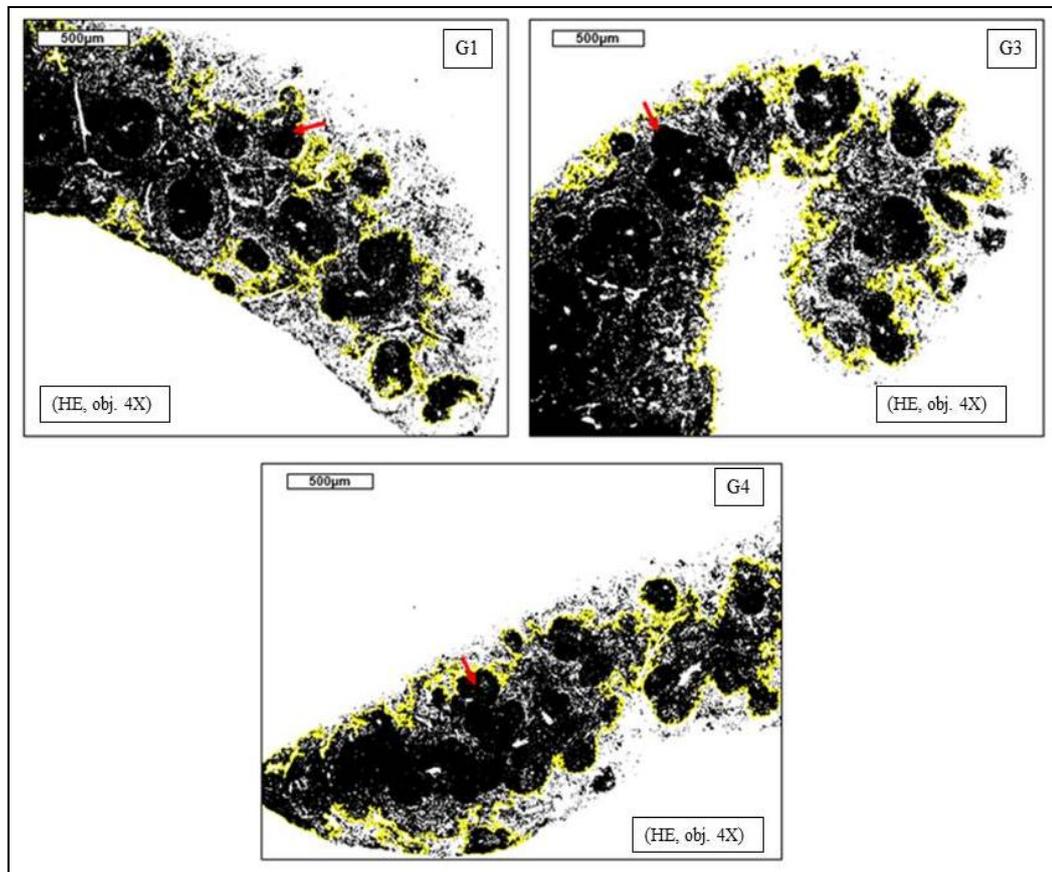
- ausente, + discreto, ++ moderado, +++ severa. G1 (ração controle e 90 mg.Kg⁻¹ de PBS); G3 (ração suplementada com *Pleurotus* sp. e 90 mg.Kg⁻¹ de PBS); G4 (ração suplementada com *Pleurotus* sp. + 90 mg.Kg⁻¹ de MTX). *Onde:* ED = edema, DE = degeneração, HE = hemorragia, NE = necrose, INF = inflamação aguda e HI = hiperemia.

Tabela 6: Médias das áreas das polpas dos baços de três grupos (G1, G3 e G4) de camundongos Swiss.

	Área G1	Área G3	Área G4
Campo 1	1568771.267µm ²	1721590.002µm ²	1958325.982µm ²
Campo 2	1522291.535µm ²	1805143.877µm ²	1877870.195µm ²
Campo 3	2412707.414µm ²	1663663.096µm ²	1573373.241µm ²
Campo 4	2453703.004µm ²	1785490.443µm ²	1824751.103µm ²
Campo 5	2453703.004µm ²	2275066.163µm ²	1443520.269µm ²
Campo 6	1374513.758µm ²	1868491.913µm ²	960953.581µm ²
Campo 7	928533.921µm ²	1322501.575µm ²	1046906.112µm ²
Campo 8	1347557.236µm ²	1033875.236µm ²	1413408.948µm ²
Campo 9	834047.469µm ²	1052083.596µm ²	1916168.872µm ²
Campo 10	1413217.811µm ²	1806133.165µm ²	2102257.929µm ²
Média	1630905.642µm²	1633404.907µm²	1611754.623µm²

G1 (ração controle e 90 mg.Kg-1 de PBS); G3 (ração suplementada com *Pleurotus* sp. e 90 mg.Kg-1 de PBS) e G4 (ração suplementada com *Pleurotus* sp. + 90 mg.Kg-1 de MTX). Foram capturados com objetiva de 4x por meio de um fotomicroscópio da marca Leica Application Suite (versão 4.9.0) 10 campos por área da polpa esplênica do baço de cada grupo.

Figura 10: Imagens do baço dos três grupos de estudo (G1, G3 e G4), tratadas pelo programa ImageJ®, enfatizando a poupa esplênica.



G1 (ração controle e 90 mg.Kg⁻¹ de PBS); G3 (ração suplementada com *Pleurotus* sp. e 90 mg.Kg⁻¹ de PBS) e G4 (ração suplementada com *Pleurotus* sp. + 90 mg.Kg⁻¹ de MTX). Foram capturados com objetiva de 4x por meio de um fotomicroscópio da marca Leica Application Suíte (versão 4.9.0), 10 campos por área da polpa esplênica do baço de cada grupo, a área está sinalizada com a seta vermelha.

Após as medidas foram observadas que as médias das áreas dos dez campos de polpas dos baços dos G1, G3 e G4 foram muito semelhantes nos três grupos de análise com $p=0.1000$, assim não foi encontrada diferença nas áreas das polpas dos baços (Tabela 6, Figura 10). Entretanto, é necessário realizar novos experimentos visando a elucidação dos dados de expansão e efeito histopatológicos de animais suplementados com micélios sob tratamento de MTX.

6. DISCUSSÃO

Ao término da produção de micélios de *Pleurotus* sp em substrato de arroz, avaliou-se aqui os efeitos da suplementação na alimentação de camundongos na recuperação do estado de imunossupressão provocado pelo fármaco MTX. A importância do aumento da concentração centesimal presente na ração suplementada pode auxiliar na análise das às propriedades nutricionais presentes em *Pleurotus* sp. Assim, foi observado incremento da concentração centesimal da ração suplementada. O *Pleurotus* sp. possui hidratos de carbono, fibra, vitaminas (B1, B2, B12, C, D e E), teores elevados de minerais, tais como: potássio, fósforo, manganês, ferro, cálcio e baixos teores de lipídeos (BANO *et al.* 1988; CARVALHO *et al.* 2012; PAROLA *et al.* 2017). Em relação aos minerais, esses são encontrados em concentrações na faixa de 800 a 40000 mg.kg⁻¹ para elementos, como o potássio, fósforo, enxofre e 20 magnésio, enquanto que outros, como o zinco, ferro, cobre, cálcio, sódio e manganês estão entre 5 a 500 mg.kg⁻¹ (KALAC, 2009).

Atualmente, as terapias convencionais escolhe tratamento alternativo visando melhoria do sistema imunológico do paciente e soluções que amenizem a prevenção do câncer e os procedimentos agressivos ao paciente, tais como radioterapia, quimioterapia e a cirurgia (BAST, 2000).

Assim, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas pretende usar composto químico que possuem atividade antitumoral altamente eficaz e buscando minimizar os efeitos colaterais (BENSON, 2006, HANAHAN *et al.* 2011; MELLMAN *et al.* 2011). Aqui, nossos resultados, mostraram o equilíbrio na massa corporal dos grupos tratados com a suplementação de micélios (G3 e G4) e ligeira incremento da massa corporal sugerindo participação de micélios de *Pleurotus* sp. presentes na suplementação uma vez que estes são ricos em fibra, contém baixo teor de gordura. As fibras dietéticas no cogumelo consistem de β -glucanas, mananas, hemiceluloses e quitina. A fermentação de β -glucanas e sua capacidade de formar soluções altamente viscosas no intestino humano pode constituir a base de seus benefícios anti-obesidade (KHOURY *et al.* 2012).

β -glucanas também são responsáveis por alterações na contagem de diferentes tipos de células do sistema imunológico e na produção de moléculas sinalizadoras, como óxido nítrico e citocinas (RUBEL *et al.* 2010; ROUPAS *et al.* 2012). O uso de micélios fungicos tem sido empregado visando à melhoria da digestibilidade na alimentação animal (QIU *et al.* 2018). Segundo Pedra *et al.* (2009) o gênero *Pleurotus ostreatus* quando cultivados em casca de coco

e suplementados com farelo de arroz e de trigo apresentaram teores de ferro que variaram entre 10 e 20 mg/100g de amostra fresca. Assim, é necessário a confirmação de β -glucanas, mananas, hemiceluloses e quitina na composição da ração suplementada deve ser realizada e determinar sua presença em *Pleurotus ostreatus*, apresentam efeito supressor do apetite (KAWAGISHI, *et al.* 2000).

As análises bioquímicas de plasma sanguíneo de camundongos *Swiss* a fim de avaliar a ocorrência de toxicidade da alimentação durante o tratamento com MTX. Os resultados sinalizaram que a suplementação auxiliou na melhora da função renal. Em um estudo com camundongos *Swiss* tratados com 20mg/kg por semana de MTX, constatou a indução de apoptose e também aumento dos marcadores de estresse oxidativo nos hepatócitos, com aumento significativo na carbonilação de proteínas, peroxidação lipídica, diminuição dos níveis de tióis e geração de radicais superóxido na mitocôndria (MUKHERJEE *et al.* 2013).

Sendo assim, estudos experimentais sugere que o estresse oxidativo está diretamente envolvido com a toxicidade causada pelo MTX. Nossos resultados revelaram efeito positivo da suplementação com micélios de *Pleurotus* sp. na recuperação de murinos imunodeprimidos contribuindo na função hepática e renal (Tabela 4). Alguns relatos descrevem que micélios de *Pleurotus* sp. apresentam efeitos dietético, hipocolesterolêmicos em modelo de animal e em pacientes diabéticos (BOBEK *et al.* 1998; KHATUN *et al.* 2007).

Os resultados demonstraram que a suplementação com *Pleurotus* sp. promove redução significativa do efeito do MTX, normalização das funções do organismo e conseqüentemente a melhora significativa do quadro clínico e revitalização dos animais. Assim, nossos resultados sugerem melhora na recuperação de danos fisiológicos quando grupo de animais tratado com MTX sob dieta de ração suplementada com micélio de *Pleurotus* sp. são comparados a grupo G3 suplementados e sem MTX, e ainda contribuindo na normalidade dos níveis de TGP, ureia e melhora das funções hepática e renal (Tabela 4 e 5, Figura 8 e 9). Entretanto, novos estudos devem ser realizados visando a comprovação destes dados.

O mecanismo de ação do fármaco MTX na corrente sanguínea pode estar 50% ligado às proteínas plasmáticas com tempo de meia vida variando de 3 a 5 horas (CALABRESI & CHABNER, 2002). Além disso, o MTX é considerado um antagonista do folato e pode a quadro de neutropenia moderada, anemia, anemia aplástica, pancitopenia e leucopenia (TIAN & CRONSTEIN, 2007). Assim, quando os camundongos alimentados com a ração proposta e MTX (G4) o quadro de neutropenia e ação do fármaco pode ter sido compensado, melhorando

os exames hematológicos e bioquímicos quando comparado com o grupo que foi alimentado com ração controle (G2).

Na análise histopatológica dos órgãos, o grupo G4 que representa a alimentação suplementada com micélio de *Pleurotus* sp. conjuntamente com o tratamento MTX parece auxiliar na recuperação de danos patológicos em comparação ao grupo G3 também com suplementação alimentar sem o tratamento MTX. Isto sugere a capacidade de contribuir para o fortalecimento do sistema imunológico, uma vez que não se observou alteração no baço dos grupos controles (Tabela 5 e 6, Figura 10). A inflamação é um processo fisiológico que ocorre nos tecidos em resposta a lesões traumáticas, pós-isquêmicas, autoimunes ou tóxicas, além de processos infecciosos (MONTENEGRO & FRANCO, 2008).

Com isso, a resposta inflamatória é necessária para a sobrevivência, buscando proteger o organismo de estímulos nocivos. Em algumas situações e doenças, essa resposta pode se tornar excessiva, sem qualquer benefício e com sérios efeitos adversos (COTRAN, BARBOSA & VOEUX, 2000). Existem diversos estudos com cogumelos que comprovam sua atividade antioxidante, tanto pelo consumo in natura como através de extratos, como suplementos alimentares (KOUTROTSIOS *et al.* 2017, SANCHEZ 2017, SHARIF *et al.* 2017). Os cogumelos podem ser uma alternativa já que apresentam propriedades anti-inflamatórias devido seus compostos como polissacarídeos, diterpenoides, triterpenoides, ergosterol e ácidos fenólicos (ELSAYED *et al.* 2014).

Sendo assim, os fungos do gênero *Pleurotus* sp. possuem propriedades medicinais, como hipoglicemiante e atividade antitrombótica, modulação do sistema inume, a capacidade de baixar a pressão sanguínea e a concentração de colesterol no sangue, bem como atividade anti-inflamatória, funções cardíacas, ações antivirais antimicrobiana e antitumoral (ZHANG, 1994; YILMAZ *et al.* 2006; HOA & WANG, 2015).

7. CONCLUSÃO

Modelo animal empregado aqui revelou ser adequado para o estudo das alterações fisiológicas provocadas com uso de MTX. Além disso, é promissor o uso da suplementação de micélios de *Pleurotus* sp. na recuperação de transtornos fisiológicos de animais, entretanto, é necessária a confirmação destes dados em experimentos futuros para elucidar seu o potencial.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Cellular and Molecular Immunology. 4. ed. **Philadelphia: Saunders**, 2000.

ABOLMAALI, S.S.; TAMADDON, A.M.; DINARVAND, R. A review of therapeutic challenges and achievements of methotrexate delivery systems for treatment of cancer and rheumatoid arthritis. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v.71 p.1115–1130, 2013.

AIDA, F.M.N.A.; SHUHAIMI, M.; YAZID, M.; MAARUF, A.G. Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. Trends Food Sci. **Technol.** 20, 567–575, 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC Nº 150, de 13 de abril de 2017. Disponível em: <https://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=NzQ5Mg%2C%2C>. Acessado em janeiro de 2019.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W. & BLACKWELL, M. B. Introductory Mycology. **John Wiley, Sons, Inc.**, 4^a ed. New York. 1996.

ALONSO, E.N., FERRONATO, M.J., GANDINI, N.A., FERMENTO, M.E., OBIOL, D.J., LOPEZ ROMERO, A., AREVALO, J., VILLEGAS, M.E., FACCHINETTI, M.M., CURINO, A.C. Antitumoral effects of d-fraction from *grifola frondosa* (*maitake*) mushroom in breast cancer. **Nutr. Canc.** 69, 29–43. 2017.

ANANDHI, R., T. ANNADURAI, T. S. ANITHA, A. R. MURALIDHARAN, K. NAJMUNNISHA, V. NACHIAPPAN, P. A. THOMAS and P. GERALDINE. Antihypercholesterolemic and antioxidative effects of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, and its major constituent, chrysin, in Triton WR-1339-induced hypercholesterolemic rats. **J Physiol Biochem** 69(2): 313-323. 2013.

ANDRADE, A., PINTO, SC., and OLIVEIRA, RS., orgs. *Animais de Laboratório: criação e experimentação* [online]. Rio de Janeiro: **Editora FIOCRUZ**. Available from SciELO Books 388 p. ISBN: 85-7541-015-6. 2002

AOAC. *Official Methods of Analysis*. In A. Arlington (Ed.), **Association of Official Analytical Chemists**, 16th ed. 2016.

ASSIS, I. S; BONATTI-CHAVES, M; SILVEIRA, M. L.L; GERN, R.M.M; WISBECK, E; FÚRIGO; JÚNIOR, A; and FURLAN, S. A. Production of bioactive compounds with antitumour activity against Sarcoma 180 by *Pleurotus sajor-caju*. **J Med Food** 16: 1004-1012. 2013.

BARROS, L., D. M. CORREIA, I. C. FERREIRA, P. BAPTISTA and C. SANTOS-BUELGA. Optimization of the determination of tocopherols in *Agaricus sp.* edible mushrooms by a normal phase liquid chromatographic method. **Food Chem** 110(4): 1046-1050. 2008.

BARROS, L., C. PEREIRA and I. C. F. R. FERREIRA. Optimized Analysis of Organic Acids in Edible Mushrooms from Portugal by Ultra Fast Liquid Chromatography and Photodiode Array Detection. **Food Analytical Methods** 6(1): 309-316. 2013.

BARTOLOMUCCI A, CABASSI A, GOVONI P, CERESINI G, CERO C, BERRA D, et al. Metabolic Consequences and Vulnerability to Diet-Induced Obesity in Male Mice under Chronic Social Stress. **PLoS ONE** 4(1): e4331. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004331>. 2009.

BOLLEN, M; KEPPENS, S; STALMANS, W. Specific features of glycogen metabolism in the liver. **Biochem. J.** 336: 19 - 31. 1998.

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

BONONI, V.L.; CAPELARI, M.; TRUFEM, S.F.B. *Cultivo de cogumelos comestíveis*. 2.ed. São Paulo: **Ícone**, 206p. 1999.

BORCHERS, A.T. *et al.* The use of methotrexate in rheumatoid arthritis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**.v.34,p.465-483,2004.

BOHN, J. A.; BEMILLER, J. N. (1→3)-β-D-Glucans as biological response modifiers: a review of structurefunctional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 28, n. 1, p. 3-14, 1995.

BOUZARI Z, BASIRAT Z, ZADEH MZ, CHERATI SY, ARDEBIL MD, MOHAMMADNETAJ M, *et al.* Daily versus intermittent iron supplementation in pregnant women. **BMC Research Notes**. 4:444. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas - Anemia por Deficiência de Ferro. Portaria No 1.247, de 10 de novembro de 2014.**Secretaria de Atenção à Saúde;** Disponível em: http://www.poderesaude.com.br/novosite/images/publicacoes_11.11.2014-II.pdf Acessado em janeiro de 2018.

BRESCIANI, E.; CARRINGTON, B.; WINCOVITCH, S.; JONES, M.; GORE, A. V.; WEINSTEIN, B. M.; SOOD, R.; LIU, P. P. CBFbeta and RUNX1 are required at 2 different steps during the development of hematopoietic stem cells in zebrafish. **Blood**124, 70-78. 10.1182/blood-2013-10-531988. 2014.

BRUNTON, L. L., LAZO, J. S., PARKER, K. L. Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. McGraw-Hill Interamericana do Brasil: **Rio de Janeiro, RJ**. 11 ed. p.1203-1207. 2006.

BRUNT, E.M.; KLEINER, D.E.; WILSON, L.A.; BELT, P.; NEUSCHWANDER-TETRI, B.A. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. **Hepatology**;53:810-20. 2011.

CALABRESI, P.; CHABNER B. A. Antineoplastic agentes. In: Hardman J. G, Limbird L. E, Gilman G. A, editors. Goodman e Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 10 ed. McGraw-Hill. **North America**. P. 1399-1404. 2002.

CANGUSSU, A.S.R; MARIÚBA, L.A.M; LALWANI, P; PEREIRA, K.D.E.S, ASTOLPHI-FILHO, S; ORLANDI, P.P; EIPHANIO, S; VIANA, K.F; RIBEIRO, M.F.B; SILVA, H.M; MARINHO, C.R.F; NOGUEIRA, P.A. Uma proteína híbrida contendo repeties MSP1a apresentaram e ratinhos BALB / c Omp7, epitopos Omp8 e Omp9 proteja imunizados contra a anaplasnose. **Veterinario**. Res. 49: 6. 2018.

CAPUTO, L. F. G. Manual da disciplina de Histotecnologia do curso técnico de Pesquisa em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro: **Fiocruz**, 2008.

CARDOSO, J. C. P.; DEMENJOUR, P. L. M. M.; PAZ, M. F. Cultivo do cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus* em bagaço de bociuva e de cana-de-açúcar pela técnica junção. **Evidência**, 13, 31–40, 2013.

CARON, J. E. *et al.* Oxidative stress and executive function in children receiving chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric Blood Cancer**. 2009.

CHANG, S. T.; LAU, O. W.; CHO, K. Y. The cultivation and nutritional value of *Pleurotus sajor-caju*. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, 12, 58–62, 1981.

CHANG, S.T.; MILES, P.G. A new look at cultivated mushrooms. **Bioscience**, 34(6): 358-362, 1984.

CHANG, S.T.; MILES, P.G. Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact. **New York: CRC Press**, 451p, 2004.

CHANG, S. T.; WASSER, S. P. The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. **Int J Med Mushrooms**;14(2):95–134. 2012.

CHEN, L.; SHAO, H. J.; SU, Y. B. Coimmunization of *Agaricus blazei* Murill extract with hepatitis B virus core protein through DNA vaccine enhances cellular and humoral immune responses. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 4, n. 3, p. 403- 409, 2004.

CHEUNG, P. C. K. The nutritional and health benefits of mushrooms. **Nutrition Bulletin** 35(4): 292-299. 2010.

COHEN, R.; PERSKY, L.; HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.58, n.5, p.582-594, 2002.

DABA, A. S.; EZERONYE, O. U. Minireview—anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. **Afr J Biotechnol**;2:672–8. 2003

DELMANTO, R. D.; LIMA, P. L. A.; SUGUI, M. M.; EIRA, A. F.; SALVADORI, D. M. F.; SPEIT, G.; RIBEIRO, L. R. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 496, n. 1-2, p 15-21, 2001.

DIAS, E. S.; KOSHIKUMO, É. M. S.; SCHWAN, R. F.; SILVA, R. Cultivation of the mushroom *Pleurotus sajor-caju* in different agricultural residues. **Ciência e Agrotecnologia**, 27, 1363–1369, 2003.

ERGUN, S. O.; UREK, R. O. Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. **Ann Agrar Sci**. 15(2):273-7. doi:10.1016/j.aasci.2017.04.003. 2017.

FIGUEIREDO, M.B.; MUCCI, E.S.F. Doenças e pragas do cogumelo comestível (*Agaricus campestris* L.). *Biológico São Paulo*, v.51, n.4, p.93-11, 1985.

FILKELMAN, F. D.; KARP, M. W. Usefulness and optimization of mouse models of allergic airway disease. **J Allergy Clin Immunol**. 121:603-6.2008.

FILLEY, C. M.; KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B. K. Toxic encephalopathy. **The New England Journal of Medicine**. v.345, p.42532. 2001.

FINIMUNDY, T. C.; GAMBATO, G.; FONTANA, R.; CAMASSOLA, M.; SALVADOR, M.; MOURA, S.; HESS, J.; J. A. HENRIQUES, A. J. DILLON AND M. ROESCH-ELY. Aqueous

extracts of *Lentinula edodes* and *Pleurotus sajor-caju* exhibit high antioxidant capability and promising in vitro antitumor activity. **Nutr Res** 33(1): 76-84. 2013.

FREITAS, F.J.; LIMA, A.A.; ARÇARI, D.P. Nanotecnologia empregada no tratamento do câncer. **Gestão em foco** – Grupo UNISEPE, v.4; p.6, 2011.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 64, n.2, p. 149-154, 2005.

GAO, B.; JEONG, W.; TIAN, Z. Liver: an organ with predominant innate immunity. **Hepatology**, 47(2). p.729-736. 2008.

GODARD, A. L. B. **A Clonagem Posicional** – uma abordagem para o estudo do genoma funcional, Monografias SBG, Ribeirão Preto: SBG, 151 p., 2008.

GUÉNET, J. L. Animal models of human genetic diseases: do they need to be faithful to be useful. **Mol. Genet. Genomics**. 286:1-20, 2011.

GUIMARÃES, G. N. F. **Vitaminas como co-fatores enzimáticos**. Pelotas, RS. 2003. Disponível em: http://64.233.163.132/search?q=cache:x0B7rwpBWjoJ:www.medstudents.com.br/content/resumos/resumo_medstudents_20040526_01.doc+tetraidrofolato&cd=3&hl=ptBR&ct=clnk&gl=br. Acesso em: 01/12/2018.

HABIJANIČ, J.; BEROVIČ, M.; WRABER, B.; HODŽAR, D.; BOH, B. Immunostimulatory effects of fungal polysaccharides from *Ganoderma lucidum* submerged biomass cultivation. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 39, n. 4, p. 327–331, 2001.

HANN, B.; BALMAIN, A. Building validated mouse models of human cancer. **Curr Opin Biol**;13(6):778-84. 2001.

HETLAND, G.; JOHNSON, E.; LYBERG, T.; KVALHEIM, G. The Mushroom *Agaricus blazei* Murill Elicits Medicinal Effects on Tumor, Infection, Allergy, and Inflammation through

Its Modulation of Innate Immunity and Amelioration of Th1/Th2 Imbalance and Inflammation. **Advances in Pharmacological Sciences**; 157015. 2011.

HETLAND, G.; EIDE, D. M.; TANGEN, J. M.; HAUGEN, M. H.; MIRLASHARI, M. R.; PAULSEN, J. E. The *Agaricus blazei*-Based Mushroom Extract, Andosan, Protects against Intestinal Tumorigenesis in the A/J Min/+ Mouse. **PLoS One** 11(12): e0167754. 2016.

HOA, H.T.; WANG, C.-L. The Effects of Temperature and Nutritional Conditions on Mycelium Growth of Two Oyster Mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). **Mycobiology**, 43, 14–23. 2015.

HOWARD, A.N. *et al.* ABT-737, a BH3 mimetic, induces glutathione depletion and oxidative stress. **Chemotherapy and Pharmacology**. v.65, p.41-54, 2009.

HSIAO, C. M.; WU, Y. S.; NAN, F. H.; HUANG, S. L.; CHEN, L.; CHEN, S. N. Immunomodulator 'mushroom beta glucan' induces Wnt/beta catenin signalling and improves wound recovery in tilapia and rat skin: a histopathological study. **Int Wound J** 13(6): 1116-1128. 2016.

HUSSAIN, M.; KHAN, S.M.; KHAN, S.M.; CHOHAN, M.A. Effect of diferente esterilization methods on the production of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on different substrates. In: **Integrated plant disease management**. Proceeding of 3rd National Conference of Plant Pathology, NARC, Islamabad: 1–3 Oct. 2001, pp. 159– 160, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**; 2018.

ISHIBASHI, H. *et al.* Liver architecture, cell function, and disease. In: Seminars in immunopathology. **Springer-Verlag**, p. 399-409, 2009.

ISHIKAWA, S.; MATSUI, Y. S.; WACHI, H.; YAMAGUCHI, N.; HARASHIMA.; HARADA, M. Age-associated impairment of antitumor immunity in carcinoma-bearing mice

and restoration by oral administration of *Lentinula edodes* mycelia extract. **Cancer Immunol Immunother** 65(8): 961-972. 2016.

JAHOVIC, N. *et al.* Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. **Journal of Pineal Research**. v.34, p. 282-287, 2003.

JAKUBOVIC, B. *et al.* Methotrexate induced pulmonary toxicity. **Respiratory Journal**. v. 20, p. 153-155, 2013.

JUNQUEIRA C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: **Santos**, 1983.

KAGER, L. Genomic strategies to improve outcome and individualize therapy in cancer: the paradigm of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Journal of the Balkan Union of Oncology**. v, 14, p.181-186, 2009.

KALAC, P. A review of chemical composition and nutritional value of wild growing and cultivated mushrooms. **J. Sci. Food Agric**. 93, 209–218, 2013.

KAPOOR, S. Lentinan: clinical benefit in the management of systemic malignancies. **Surg Today** 44(7): 1389. 2014.

KALANTZIS, A. *et al.* Oral effects of low-dose methotrexate treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology**. v. 100, p. 52-62, 2005.

KAWAGISHI, H., R. INAGAKI, T. KANAO, T. MIZUNO, K. SHIMURA, H. ITO, T. HAGIWARA AND T. NAKAMURA. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. **Carbohydr Res** 186(2): 267-273. 1989.

KAWAGISHI, H.; SUZUKI, H.; WATANABE, H.; NAKAMURA, H.; SEKIGUCHI, T.; MURATA, T. *et al.* A lectin from an edible mushroom *Pleurotus ostreatus* as a food intake-suppressing substance. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1474(3):299-308. 2000.

KERSTEN, R.A. & SILVA, S.M. Composição florística e distribuição espacial de epífitas vasculares em floresta da planície litorânea da Ilha do Mel, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 24:213-226. Kersten, S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. **EMBO reports**. Vol. 21. Núm. 41. p.282-286. 2001.

KIERSZENBAUM, A. L. Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia. **Elsevier**, Rio de Janeiro. 2004.

KIMATU, B. M.; ZHAO, L.; BIAO, Y.; MA, G.; YANG, W.; PEI, F.; HU, Q. Antioxidant potential of edible mushroom (*Agaricus bisporus*) protein hydrolysates and their ultrafiltration fractions. **Food Chem** 230: 58-67. 2017.

KO, G. M.; DE LUCA, R.R. **Camundongo**. In: LAPCHIK, V. B. V; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M. Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório. **Atheneu**. p. 137 – 165, 2009.

KONEMAN, E.W. *et al.* A função do laboratório de microbiologia no diagnóstico de doenças infecciosas: indicações para prática e manejo. In: **KONEMAN, E.W. et al.** Diagnóstico microbiológico texto e atlas colorido. 5 ed. São Paulo: Medsi. cap 2. p. 69-176. 2001.

KRAAL, G. Cells in the marginal zone of the spleen. **Int Rev Citol** 132:31-74. 1992.

KUMARAN, S.; PANDURANGAN, A. K.; SHENBHAGARAMAN, R.; ESA, N. M. Isolation and Characterization of Lectin from the Artist's Conk Medicinal Mushroom, *Ganoderma applanatum* (*Agaricomycetes*), and Evaluation of Its Antiproliferative Activity in HT-29 Colon Cancer Cells. **Int J Med Mushrooms** 19(8): 675-684. 2017.

KUO, Y. C; HUANG, Y. L; CHEN, C. C; LIN, Y. L; CHUANG, K. A; TSAI, W. J. Cell cycle progression and cytokine gene expression of human peripheral blood mononuclear cells modulated by *Agaricus blazei*. **J Lab Clin Med**. 140(3):176-87; 2002.

LACASCE, A. S. **Therapeutic use of high-dose methotrexate**. UpToDate On Line. Disponível em:

http://www.uptodate.com/online/content/topic.do?topicKey=chemagen/5867&selecte dTitle=5%7E150&source=search_result. Acesso em: 12/12/2018. 2009.

LAHARIE, D. *et al.* The liver and methotrexate. **Gastroentérologie Clinique et Biologique**. v. 32, p. 134-142, 2008.

LALLO, M. A. **Estudo da infecção experimental pelo *Encephalitozoon cuniculi* em camundongos *Balb-c* tratados com ciclofosfamida ou ciclosporina**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo. 176f. 1998.

LALLO, M. A.; SANTOS, M. J.; BONDAN, E. F. Infecção experimental pelo *Encephalitozoon cuniculi* em camundongos imunossuprimidos com dexametasona. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 5, p. 621-626, 2002.

LECHNER, B. E.; ALBERTÓ, E. Search for new naturally occurring strains of *Pleurotus* to improve yields. *P. albidus* as a novel proposed species for mushroom production. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 28, n.4, 2011.

LEE, J.-N.; LEE, D.-Y.; JI, I.-H.; KIM, G.-E.; KIM, H. N.; SOHN, J.; KIM, S.; KIM, C.-W. Purification of soluble β -glucan with immune-enhancing activity from the cell wall of yeast. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 65, n. 4, p. 837-841, 2001.

LEE, S.; MARGOLIN, K. Cytokines in Cancer Immunotherapy. **Cancers (Basel)**. 3(4):p. 3856–3893. 2011.

LEUNG, M. Y. K.; LIUB, C.; KOON, J. C. M.; FUNG, K. P. Polysaccharide biological response modifiers. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 105, n. 2, p. 101– 114, 2006.

LI X, ZHONG M, LIU B, WANG X, LIU L, ZHANG W, HUANG M. Antiproliferative protein from the culture supernatant of *Lentinula edodes* c91-3 mycelia. **J Agric Food Chem**;62(23):5316–20. 2014.

LIU X, WANG L, ZHANG C, WANG H, ZHANG X, LI Y. Structure characterization and antitumor activity of a polysaccharide from the alkaline extract of king oyster mushroom. **Carbohydr Polym**;118:101–6. 2015.

LIMA, P. L. A.; DELMANTO, R. D.; SUGUI, M. M.; EIRA, A. F.; SALVADORI, D. M. F.; SPEIT, G.; RIBEIRO, L. R. *Letinula edodes* (Berk.) Pegler (Shiitake) modulates genotoxic and mutagenic effects induced by alkylating agents in vivo. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 496, n. 1, p. 23-32, 2001.

LIMA, J. A. *et al.* **Folatos em vegetais:** importância, efeito do processamento e biodisponibilidade. Revista Alimentos e Nutrição. UNESP: Araraquara, SP. v.14. n.1. p.123-129. 2003. Disponível em: <http://servbib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewPDFInterstitial/848/727>. Acesso: 01/12/2018.

LIN, H. C.; LIN, M. H.; LIAO, J. H.; WU, T. H. T.; LEE, H.; MI, F. L.; WU, C. H. K.; CHEN, C.; CHENG, C. H.; LIN, C. W. Antroquinonol, a Ubiquinone Derivative from the Mushroom *Antrodia camphorata*, Inhibits Colon Cancer Stem Cell-like Properties: Insights into the Molecular Mechanism and Inhibitory Targets. **J Agric Food Chem** 65(1): 51-59.2017.

LU, C. C.; HSU, Y. J. C.; CHANG, J.; LIN, C. S.; MARTEL, J.; OJCIUS, D. M.; KO, Y. F.; LAI, H. C.; YOUNG, J. D. Immunomodulatory properties of medicinal mushrooms: differential effects of water and ethanol extracts on NK cell-mediated cytotoxicity. **Innate Immun** 22(7): 522-533. 2016.

MADDEN, T; EATON, V. E. Methotrexate. In: Schumacher EG, editor. Therapeutic Drug Monitoring. Norwalk: **Appleton Lage**; P. 527-553. 1995.

MAGALHÃES, L.E. A ciência e os animais de laboratório. **RESBCAL**. v.1 n.1, p. 7-13. 2012.

MARQUES, J. M.; OLSSON, I. A. The effect of preweaning and postweaning housing in the behaviour of the laboratory mouse (*Mus musculus*). **Laboratory Animals**, v. 41, n. 1, p. 92-102, 2007.

MASSIRONI, S. M. G. **Padrão genético.** In: LAPCHIK, V. B. V; MATTARAIA, V. G. M; KO, G. M. Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório. Atheneu. p. 385 – 398, 2009.

MATTILA, V. M. *et al.* Use of dietary supplements and anabolic-androgenic steroids among Finnish adolescents in 1991-2005. **European Journal of Public Health, Oxford**, v. 20, n. 3, p. 306-311, jun. 2010.

MCDONALD, D. The encyclopedia of Mammals. **Andromeda Oxford limited. 1ª Edition** – 21 – 86, 1999.

MENG, X., LIANG, H.; LUO, L. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities. **Carbohydr Res** 424: 30-41. 2016.

MEHTA, V., GUPTA, J. K., & KAUSHAL, S. C. Cultivation of *Pleurotus florida* mushroom on rice straw and biogas production from the spent straw. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 6, 366–370, 1990.

MICHALANY, J. Técnica histológica em anatomia patológica. 3. ed. São Paulo: **Michelany**, 1981.

MILMAN, N.; PASZKOWSKI, T.; CETIN, I.; CASTELO-BRANCO, C. Supplementation during pregnancy: beliefs and science. **Gynecological Endocrinology**; Early Online: 1–8. 2016.

MITSUHASHI, H.; SUEMARU, K.; LI, B.; CUI, R.; ARAKI, H. Evaluation of topical external medicine for 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. **Eur J Pharmacol**; 551(1-3):152-5. 2006.

MORADALI, M.F.; HEDJAROUDE, G.A.; MOSTAFAVI, H.; ABBASI, M.; GHODS, S-H. ANDSHARIFI-TEHRANI, A. The genus *Ganoderma* (Basidiomycota) in Iran. **Mycotaxon**, 99: 251-269. 2007.

MUKHERJEE. S. *et al.* Pomegranate reverses methotrexate-induced oxidative stress and apoptosis in hepatocytes by modulating Nrf2-NF- κ B pathways. **Journal Nutrition Biochemical**. v. 24, p.2040-2050, 2013.

NEVES, C.; JORGE R.; BARCELOS A. A teia de toxicidade do MTX. **Acta Reumatology Portugal**. v. 34, p. 11-34. 2009.

NG, S. H., MOHD, M. S.; ZAIN, F.; ZAKARIA, W. R.; WAN, ISHAK.; and WAN AHMAD, W. A. N. Hypoglycemic and Antidiabetic Effect of *Pleurotus sajor-caju* Aqueous Extract in Normal and Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **BioMed Research International**. 214918. 2015.

NGAI, P. H. K.; NG, T.B. A ribonuclease with antimicrobial, antimitogenic and antiproliferative activities from the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. **Peptides, New York**, v. 5, p. 11-17, 2004.

NYAM, K. L.; CHOW, C. F.; TAN, C. S.; and NG, S. T. Antidiabetic Properties of the Tiger's Milk Medicinal Mushroom, *Lignosus rhinocerotis* (Agaricomycetes), in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Int J Med Mushrooms** 19(7): 607-617. 2017.

OOI, V. E.; and LIU, F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. **Curr Med Chem** 7(7): 715-729. 2000.

OLIVEIRA, J. R; PITREZ, P. M. A importância do uso de animais para o avanço da ciência. In: FEIJÓ, A. G. S; BRAGA, L. M. G. M; PITREZ, P. M. **Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos**. Porto Alegre: EDIPUCRS. p. 67. 2010.

OLIVEIRA, C. C. DE. **Avaliação da ação do MTX sobre as alterações inflamatórias associadas à obesidade.** Dissertação (Mestrado em Ciências da saúde-Universidade São Francisco, Bragança Paulista. 49f. 2010.

PAROLA, S.; CHIODAROLI, L.; ORLANDI, V.; VANNINI, C.; PANNON, L. *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus*: Functional food with antioxidant antimicrobial activity and an important source of Vitamin D and medicinal compounds. *Funct. Foods Health Dis.* 7, 773–794. 2017.

PAPADOPULOS, F.; SPINELLI, M.; VALENTE, S.; FORONI, L.; ORRICO, C.; PASQUINELLI, G, *et al.* Common tasks in microscopic and ultrastructural image analysis using image. *J Ultrastruct Pathol.* 31 (6): 401-7. 2007.

PATEL S.; PATEL G.; JOHNSON.; OGUNREMI L.; BARRON, J. Effect of low dose weekly methotrexate on bone mineral density and bone turnover. *Ann Rheum.* 62 (2): 186-187. 2003.

PAULI, A. P. **Avaliação da composição química, compostos bioativos e atividade antioxidante em cogumelos comestíveis.** Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP. Araraquara.73f.2010.

PEREIRA, S.A.L.; CORRÊA, B.S.; MINICUCCI, G.P.; LOPES, G.M.A.; CASTRO, E.C.C.; REIS, M.A. & TEIXEIRA, V.P.A. Weight of the spleen in chronic chagasic patients. *Rev Soc Bras Med Trop* 32(2): 167-170. 1999.

PISCONTI, S., DELLA., VITTORIA, SCARPATI, G; FACCHINI, G; CAVALIERE, C; D'ANIELLO, C; FRISCINNI, A; MELISSANO, A; BELLINI, E; PERRI, F. The evolving landscape of immunotherapy against cancer. *WCRJ*; 5 (1): e1042. 2018.

POOLE, T. B. *The UFAW Handbook on the care and management of laboratory animals.* London: Longman Scientific & Technical; 1999.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. Os reinos dos fungos. 2 ed. Santa Cruz do Sul: **Edunisc.**, 605 p. 2004.

QIU, Z.H.; WU, X.L.; GAO, W.; ZHANG, J.X.; HUANG, C.Y. High temperature induced disruption of the cell wall integrity and structure in *Pleurotus ostreatus* mycelia. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 102, 6627–6636. 2018.

RACANELLI, V.; REHERMANN, B. The liver as an immunological organ. **Hepatology**, 43, p. S54-S62. 2006.

RAJARATHNAM, S.; BANO, Z. *Pleurotus* mushrooms. Parte 1 A: Morfology, life cycle, taxonomy, breeding and cultivation. **CRR Critical Reviews in Food Science**, v.26, p.157-223, 1987.

RAMOS, C., SAPATA, M., FERREIRA, A., ANDRADA, L., & CANDEIAS, M. Production of three species of *Pleurotus* mushrooms and quality evaluation in modified atmosphere. **Revista de Ciências Agrárias**, 34, 57–64, 2011.

RAU, R.; HERBORN, G. Benefit and risk of methotrexate treatment in rheumatoid arthritis. *Clinical Experimental Rheumatology*. v. 22, p. 88-94. 2004.

RIBEIRO, D. S.; OLIVEIRA, J. J. Caracterização de cogumelos de *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes* produzidos em resíduos agroindustriais. <http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/1540>, 2009.

ROUPAS, P.; KEOGH, J.; NOAKES, M.; MARGETTS, C.; TAYLOR, P. The role of edible mushrooms in health: evaluation of the evidence. **Journal of Functional Foods**. 4(4):687-709. 2012.

RUBEL, R.; DALLA; SANTA, H. S.; BONATTO, S. J. R.; BELLO, S.; FERNANDES, L. C.; DI.; BERNARDI, R.; *et al.* Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* (Leyss: Fr) Karst. Triggers Immunomodulatory Effects and Reduces Nitric Oxide Synthesis in Mice. **Journal of Medicinal Food**.13:142-8. 2010.

RUBINO, F.M. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. **Journal of Chromatography B**, v.764, n.1-2, p.217-254, 2001.

RUBNITZ, J. E. et al. Transient encephalopathy following high-dose methotrexate treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**. v. 12, p. 1176-1181, 1998.

SANCHEZ, A., YSUNZA, F., BELTRAN-GRACIA, M., & ESQUEDA, M. Biodegradation of viticulture wastes by *Pleurotus*: A source of microbial and human food and its potential use in animal feeding. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 2537–2542, 2002.

SAVOIE, J.M., SALMONES, D., MATA, G. Hydrogen peroxide concentration measured in cultivation substrates during growth and fruiting of the mushrooms. *Agaricus bisporus* and *Pleurotus spp.* **J. Sci. Food Agric.** 87, 1337–1344, 2007.

SHARMA, V. P., ANNEPU, S. K., GAUTAM, Y., SINGH, M., and KAMAL, S. Status of mushroom production in India. **Mushr. Res.** 26 (2), 111-120. 2017.

SHAMEEM, N., A. N. KAMILI, M. AHMAD, F. A. MASOODI and J. A. PARRAY. Antimicrobial activity of crude fractions and morel compounds from wild edible mushrooms of North western Himalaya. **Microb Pathog** 105: 356-360. 2017.

SHARIF, A. et al. The Role of Probiotics in the Treatment of Dysentery: a Randomized Double-Blind Clinical Trial. **Probiotics And Antimicrobial Proteins**, 2017.

SHUPER, A. Methotrexate treatment protocols and the central nervous system: significant cure with significant neurotoxicity. **Journal of Child Neurology**.v.15,p.573–580. 2000.

SILVA, T.O.; MENEZES, R.S.C.; TIESSEN, H.; SAMPAIO, E.V.S.B.; SALCEDO, I.H. & SILVEIRA, L.M. Adubação orgânica da batata com esterco e, ou, *Crotalaria juncea*. I - Produtividade vegetal e estoque de nutrientes no solo em longo prazo. **R. Bras. Ci. Solo**, 31:39-49, 2007.

SILVA, L. M. da C. **Utilização do tecido fúngico (corpo de frutificação) de *Agaricus bisporus* como biocomponente no desenvolvimento de um biossensor amperométrico de fenol.** 134p. Tese de Mestrado, Rio de Janeiro, 2009.

SOARES, M.B.O.; SILVA, R. I. Análise de um programa municipal de prevenção do câncer cérvico-uterino. **Revista Brasileira de Enfermagem** vol.63 n.º.2 Brasília Mar./Apr. 2010. Disponível em: Acesso em: 28 de janeiro de 2019.

SUN, M., W. ZHAO, Q. XIE, Y. ZHAN AND B. WU. Lentinan reduces tumor progression by enhancing gemcitabine chemotherapy in urothelial bladder cancer. **Surg Oncol.** 2014.

SUGAWARA, T.; TAKAHASHI, S.; OSUMI, M.; OHNO, N. Refinement of the structures of cell-wall glucans of *Schizosaccharomyces pombe* by chemical modification and NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 339, n. 13, p. 2255–2265, 2004.

STENZEL, S.L. *et al.* Oxidative stress and neurobehavioral problems in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients undergoing chemotherapy. **Journal Pediatric Hematology Oncology.** v.32, p.113-118, 2010.

TIAN, H.; CROSTEIN, B. N. Understanding the mechanisms of action of methotrexate. **Bull NYU Hosp Jt Dis.** v. 65 (3), 168-173, 2007.

TODD, R. B., M. ZHOU, R. A. OHM, H. A. LEEGANGERS, L. VISSER and R. P. de VRIES. Prevalence of transcription factors in ascomycete and basidiomycete fungi. **BMC Genomics** 15: 214. 2014.

TWARDOWSKI, P., N. KANAYA, P. FRANKEL, T. SYNOLD, C. RUEL, S. K. PAL, M. JUNQUEIRA, M. PRAJAPATI, T. MOORE, P. TRYON AND S. CHEN. A phase I trial of mushroom powder in patients with biochemically recurrent prostate cancer: Roles of cytokines and myeloid-derived suppressor cells for *Agaricus bisporus*-induced prostate-specific antigen responses. **Cancer** 121(17): 2942-2950. 2015.

VAN LOO, P. L. P.; VAN ZUTPHEN, L. F. M.; BAUMANS, V. **Male management:** coping with aggression problems in male laboratory mice. *Laboratory Animals*, v. 37, n. 4, p. 300-313, 2003.

VENDITTI, A., C. FREZZA, F. SCIUBBA, M. SERAFINI and A. BIANCO. Primary and secondary metabolites of an European edible mushroom and its nutraceutical value: *Suillus bellinii* (Inzenga) Kuntze. **Nat Prod Res** 31(16): 1910-1919, 2017.

VEZMAR, S. et al. Biochemical and clinical aspects of methotrexate neurotoxicity. **Chemotherapy**. v.49, p. 92-104, 2003.

VEZMAR, S. et al. Methotrexate-Associated Alterations of the Folate and Methyl-Transfer Pathway in the CSF of ALL Patients With and Without Symptoms of Neurotoxicity. **Pediatric Blood Cancer**. v. 59, p.26–32, 2009.

WANG R, MA L, WENG D, YAO J, LIU X, JIN F. Gallic acid induces apoptosis and enhances the anticancer effects of cisplatin in human small cell lung cancer H446 cell line via the ROS-dependent mitochondrial apoptotic pathway. **Oncol Rep**;35(5):3075–83, 2016.

WAYNE R. RESEARCH SERVICES BRANCH. National Institute of Mental Health. Bethesda, Maryland, USA. Disponível em <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/intro.html>. acessado em janeiro de 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The World Health Report 1998: Life in the 21st century a vision for all. **Geneva: WHO**. p.61-111, 1998.

XAVIER, B. L. S; SANTOS I. dos. Expectativas do cliente em hemodiálise sobre o transplante renal: estudo sociopoético. **Rev. Pesq Cuid fundam**. Online. 2: 1441-9, 2010.

YAHIA, E. M., F. GUTIERREZ-OROZCO and M. A. MORENO-PEREZ. Identification of phenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry in seventeen species of wild mushrooms in Central Mexico and determination of their antioxidant activity and bioactive compounds. **Food Chem** 226: 14-22, 2017.

YAN, N., F. HE, F. F. PIRAINO, H. XIANG, J. CHEN, Y. WANG and X. LIU. Antiviral Activity of a Cloned Peptide RC28 Isolated from the Higher Basidiomycetes Mushroom *Rozites caperata* in a Mouse Model of HSV-1 Keratitis. **Int J Med Mushrooms** 17(9): 819-828, 2015.

YANG, J. H.; LIN, H. C.; MAU, J. L. Antioxidante properties of several commercial mushrooms. **Food Chemistry**, Banking, v. 77, p.229-235, 2002.

YAOITA, Y., M. KIKUCHI and K. MACHIDA. Terpenoids and sterols from some *Japanese mushrooms*. **Nat Prod Commun** 9(3): 419-426, 2014.

YOULDEN, D. R; CRAMB, S.M and BAADE, P.D. The International Epidemiology of Lung Cancer: Geographical distribution and secular trends. **J Thorac Oncol** 3:819-831, 2008.

YUAN, B.; ZHAO, L.; RAKARIYATHAM, K.; HAN, Y.; GAO, Z.; MUINDE KIMATU, B.; HU, Q.; and XIAO, H. Isolation of a novel bioactive protein from an edible mushroom *Pleurotus eryngii* and its anti-inflammatory potential. **Food Funct**, 2017.

ZHANG, L.; LI, X.; XU, X.; ZENG, F. Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentin. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 340, n. 8, p. 1515-1521, 2005.

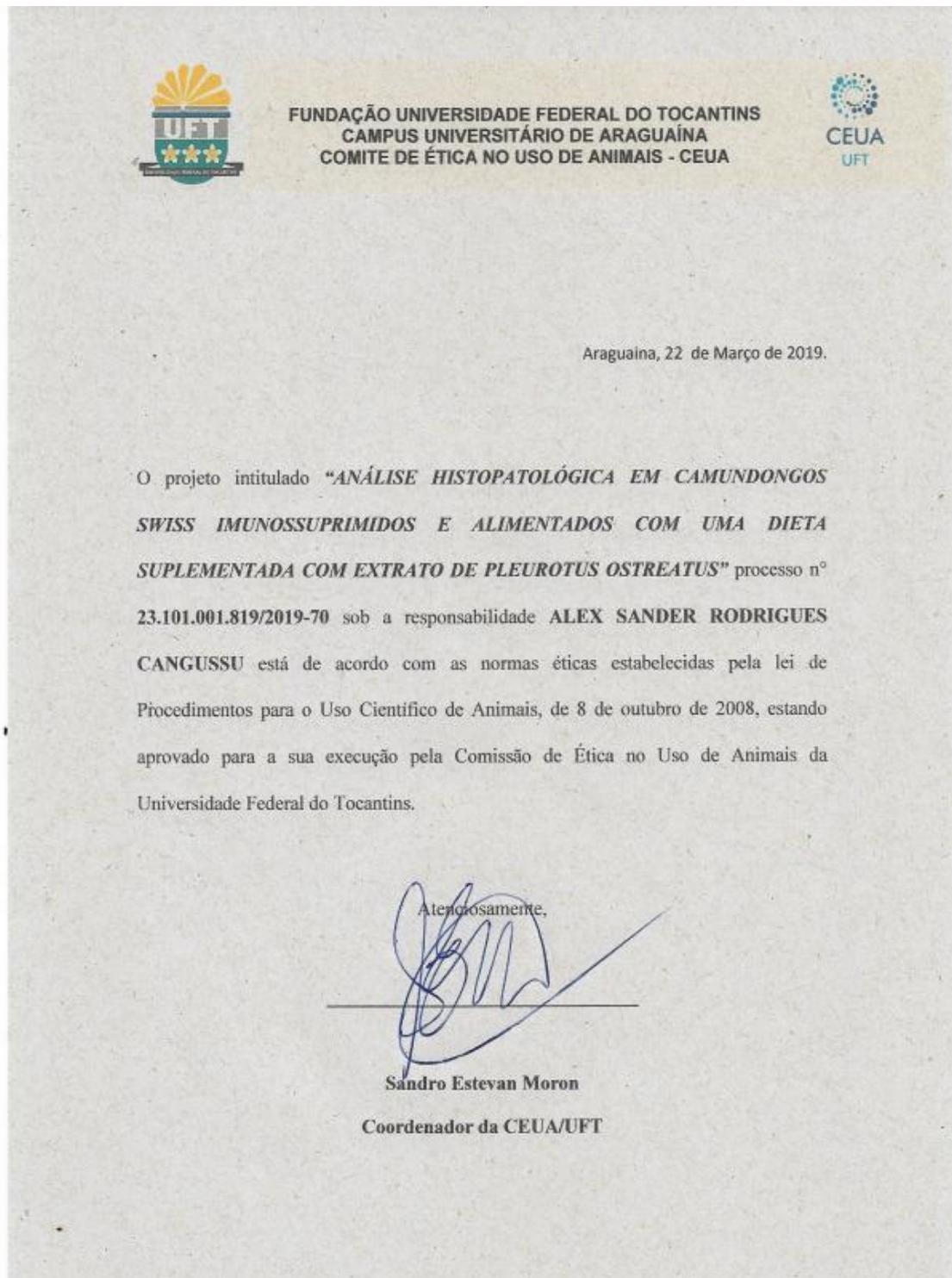
ZHANG, M.; CUI, S. W.; CHEUNG, P. C. K.; WANG, Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 18, n. 1, p. 4-19, 2007.

ZHANG, S.; NIE, S.; HUANG, D.; HUANG, J.; WANG, Y.; XIE, M. Polysaccharide from *Ganoderma atrum* evokes antitumor activity via Toll-like receptor 4-mediated NF-kappaB and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. **J Agric Food Chem**; 61(15):3676–82, 2013.

XU, X. AND X. ZHANG. Lentinula edodes-derived polysaccharide alters the spatial structure of gut microbiota in mice. **PLoS One** 10(1): e0115037, 2015.

XUE, Z., J. LI, A. CHENG, W. YU, Z. ZHANG, X. KOU AND F. ZHOU. Structure Identification of Triterpene from the Mushroom *Pleurotus eryngii* with Inhibitory Effects Against Breast Cancer. **Plant Foods Hum Nutr** 70(3): 291-296, 2015.

ANEXO 01



ANEXO 02**Identificação Morfológica****Classificação taxonômica *Pleurotus ostreatus***

Fungi; Fungi Superior; Basidiomycota; Basidiomycotina; Himenomycetes; Agaricales; Tricholomataceae; *Pleurotus*; *Pleurotus ostreatus* (ALEXOPOULOS et al., 2006)

Características observadas:

Véu ausente. Lamelas não intervenosas. Metulóides ausentes. Camada cortical do píleo com elementos de parede lisa medindo 45-57 × 26-82 mm com margem lisa ou ocasionalmente lobada, estipe de 20-28 x 8 mm, esporos geralmente cilíndricos com 6,3 –7,5 x 2,5 –3,6mm. Sistema hifálico monomítico. Queilocistídios ausentes (não detectados). Coloração branco/creme.

Citação conforme Index Fungorum (Species Fungorum)

Pleurotus ostreatus (Jacq.) P. Kumm., *Führ. Pilzk.* (Zerbst): 104 (1871)

<http://www.speciesfungorum.org/Names/SynSpecies.asp?RecordID=174220>

Alexopoulos, C. J.; Mins, W.C.; Blackwell, M. 1996 *Introductory Mycology*. – 4th. Ed. New York: Jhon Winley & Sons. Inc, 1996. 869 p

Identificação morfológica realizada na Universidade de Brasília – UnB, Departamento de Fitopatologia, Laboratório de Micologia.



Dr. Justino José Dias Neto

