

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Isolamento e caracterização de um RNA regulador,
de *Cantharellus cibarius*, com atividade antitumoral**

Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

Dissertação

Ana Patrícia dos Santos Marques

Orientador: Professor Doutor Fernando Hermínio Ferreira Milheiro Nunes

Coorientadora: Professora Doutora Raquel Maria García dos Santos Chaves



Vila Real, 2018

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Isolamento e caracterização de um RNA regulador,
de *Cantharellus cibarius*, com atividade antitumoral**

Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

Dissertação

Realizado nos

Departamento de Química e Departamento de Genética e Biotecnologia, Escola das Ciências
da Vida e do Ambiente, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Ana Patrícia dos Santos Marques

Orientador: Professor Doutor Fernando Hermínio Ferreira Milheiro Nunes

Coorientador: Professora Doutora Raquel Maria García dos Santos Chaves

Composição do Júri:

Vila Real, 2018

Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Clínica Laboratorial (Decreto-Lei nº 74/2006 com as alterações introduzidas pelos Decretos-Lei nº 115/2013 e nº 133/2016), elaborada sob orientação científica do Professor Doutor Fernando Nunes e da Professora Doutora Raquel Chaves.

O plano de trabalhos desenvolvido, com vista à obtenção do grau de Mestre em Biologia Clínica Laboratorial, deu origem às seguintes comunicações e publicações:

Publicação de resumo em revista indexada com fator de impacto:

Marques A., Ferreira D., Ribeiro M., Marques G., Lemieszek M., Rzeski W., Chaves R., Nunes F. (2018) Anticancer activity of RNA isolated from the *Cantharellus cibarius* mushroom. CIMAGO scientific meeting – Environment, Genetics and Oncobiology. Revista Portuguesa de Pneumologia. 21(Esp Cong 1):p9. IF 1,560.

Comunicações orais:

Marques, A., Ferreira, D., Ribeiro, M., Marques, G., Lemieszek, M., Rzeski, W., Chaves, R., Nunes, F. (2018) Will be a regulatory small non coding RNA from *Cantharellus cibarius* a new hope for cancer treatment?. X Jornadas de Genética e Biotecnologia – 7, 8 e 9 de Março de 2018. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal.

Marques, A., Ferreira, D., Ribeiro, M., Marques, G., Lemieszek, M., Rzeski, W., Chaves, R., Nunes, F. *Cantharellus cibarius*: Um cogumelo com atividade antitumoral. Semana da ciência e tecnologia – XI Jornadas de Biologia. 21-24 de Novembro de 2017, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

Comunicação em poster:

Marques A., Ferreira D., Ribeiro M., Marques G., Lemieszek M., Rzeski W., Chaves R., Nunes F. (2018) Anticancer activity of RNA isolated from the *Cantharellus cibarius* mushroom. CIMAGO scientific meeting – Environment, Genetics and Oncobiology, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra – Subunidade 3, 25-26 de Janeiro de 2018. Coimbra, Portugal.

“O destino não é uma questão de sorte, é uma questão de escolha.

Não é algo para se esperar, é algo para se conquistar.”

William Jennings Bryan

A todos aqueles que nunca deixaram de acreditar em mim.

À minha estrela guia, da tua “doutora”.

Agradecimentos

Seria impossível começar a escrita desta dissertação sem antes agradecer a todos aqueles que sempre estiveram presentes ao longo da minha vida e do meu percurso académico, que me apoiaram e que me possibilitaram a realização deste trabalho.

À *Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro*, na pessoa do magnífico reitor *Professor Doutor António Fontainhas Fernandes*, instituição que me acolheu para a realização de mais uma etapa do meu percurso académico.

À *coordenação do 2º ciclo em Biologia Clínica Laboratorial*, na pessoa da *Professora Doutora Ana Sampaio*, por ter aceite o plano de trabalhos apresentado.

A *todos os docentes* do 2º Ciclo em Biologia Clínica Laboratorial, pelos conhecimentos transmitidos que me tornaram uma pessoa mais apta e cada vez com mais gosto por esta área.

Ao *Professor Doutor Fernando Nunes*, meu orientador, por me ter proporcionado a oportunidade de realizar este trabalho que me permitiu, para além de aprofundar conhecimentos na área da genética, aprender técnicas que nunca tinha realizado, despertando assim o gosto pela química. Agradeço profundamente por toda a compreensão ao longo deste ano, pela orientação técnico-científica, pelos ensinamentos transmitidos e pelo tempo generosamente despendido desde o início das atividades experimentais até à entrega do presente estudo.

À *Professora Doutora Raquel Chaves*, agradeço imenso por ter aceite a coorientação deste projeto, por me ter acolhido tão bem na sua equipa de investigação, por todos os ensinamentos e por todas as horas despendidas neste trabalho. Agradeço todas as palavras de incentivo, todos os conselhos e todo o apoio e carinho que demonstrou para comigo nas mais diversas etapas da minha vida, não só durante este último ano mas também ao longo de todos estes 5 anos. Obrigada por cada minuto que dispensou do seu tempo para me acalmar, para me aconselhar e para me incentivar a nunca desistir dos meus sonhos. Para mim, é mais do que uma professora e coorientadora, levo-a no coração.

À *Doutora Daniela Ferreira*, pela ajuda imprescindível, por todas as técnicas que me ensinou e por toda a paciência que teve comigo. Obrigada pelas horas sem fim que dispensaste do teu tempo e abdicaste do teu trabalho para me ajudares e para me transmitires o enorme conhecimento que trazes contigo. Sem ti teria sido impossível, muito, muito obrigado!

Ao *Doutor Miguel Ribeiro*, que sempre se dispôs a ajudar e a esclarecer todas as minhas dúvidas. O meu sincero obrigado por nunca hesitares e nunca negares uma única ajuda ou esclarecimento que fosse.

À *Mestre Ana Cláudia Escudeiro*, por estar sempre disposta a ajudar no que fosse preciso e por ter permitido sempre que acompanhasse o seu trabalho. Obrigada pelos teus conselhos e por essa tua forma contagiante de pensar e de olhar para todos os desafios a que nos propomos diariamente.

A *todos os meus amigos*. À *Ana Guedes*, minha “miga” de coração . Obrigada por todas as horas e todas as ajudas que me deste! Obrigada por me aturares em todos os “panicãos”, por me aconselhares, por me acalmares e me ajudares a ver a melhor solução para resolver as coisas. Foi ótimo conhecer-te neste mestrado, és uma amiga que levo para a vida, adoro-te, de coração! Ao *Ivo Pavia*, principal responsável pela realização deste trabalho. Obrigada por me teres dado a conhecer este projeto e por estares sempre disponível para me ajudar e para esclarecer todas e quaisquer dúvidas sejam relacionadas com que assunto for.

Ao *Nuno*. Obrigada pelo apoio incondicional e por estares sempre ao meu lado em todas as conquistas e derrotas da minha vida. Obrigada por me incentivares a nunca desistir e a lutar sempre pelos meus objetivos tenham os obstáculos que tiverem. E nunca esquecendo, obrigada pelo melhor presente que alguma vez te lembraste de me oferecer: o *Lucky*, o meu mais fiel amigo de quatro patas e companheiro de todas as horas.

Por fim, e como os últimos são sempre os primeiros, à *minha família*. À *minha mãe*, ao *meu pai* e ao *meu irmão*. Obrigada pelo apoio incondicional, pelo amor, carinho e preocupação. Obrigada por me incentivarem, por permitirem que eu siga sempre os meus sonhos e estarem ao meu lado independentemente do resultado final. Obrigada por me aturarem e por me ouvirem a reclamar de tudo e mais alguma coisa, todos os dias. Devo-vos, a vocês, tudo o que sou hoje!

OBRIGADO A TODOS, POR TUDO!

Resumo

Cantharellus cibarius é um cogumelo comestível de amplo consumo devido às suas propriedades sensoriais. Estudos prévios demonstraram que este cogumelo apresenta uma elevada atividade antiproliferativa contra várias linhas celulares cancerígenas, sendo o principal responsável por esta ação uma fração isolada por cromatografia de troca aniônica, que os dados disponíveis indicavam ser maioritariamente constituída por ácido ribonucleico (RNA).

Os principais objetivos deste estudo foram a confirmação da natureza da molécula responsável pela atividade antitumoral, observação da sua ação, determinação da sequência de nucleótidos constituintes do RNA em causa e execução de estudos preliminares relacionados com potenciais locais da sua interação e ação na célula.

Os biopolímeros do *Cantharellus cibarius* foram inicialmente extraídos, isolados e purificados, tendo-se obtido três frações: CC1, CC2 e CC3, sendo esta última a fração que apresentou capacidade antitumoral. De seguida, as frações foram caracterizadas quimicamente, com especial enfoque na fração CC3. Foi realizada a análise da sua composição em açúcares, ácidos gordos e fosfolípidos e realizou-se um estudo inicial da sua natureza química rica em ácidos nucleicos através de metodologias como eletroforese em gel de agarose, espectrofotometria UV-vis e FTIR. Após sugestão da presença de RNA, realizou-se a síntese de cDNA a partir do RNA isolado e a sua amplificação por DOP-PCR. De seguida procedeu-se à clonagem dos produtos PCR obtidos e extração do DNA plasmídico dos clones positivos. Estes foram sequenciados e as sequências obtidas foram analisadas bioinformaticamente de modo a estudar o tipo de RNA presente. Adicionalmente, a fração CC3 foi colocada em contacto com a linha celular Caco-2 de modo a verificar a sua ação antitumoral sendo, de seguida, executada a técnica de RNA-FISH de modo a observar a sua possível incorporação no interior da célula. Com base na sequência mais conservada, e de forma ainda muito preliminar, efetuou-se a sua síntese artificial (*mimics*). O *mimics* tem como finalidade ser, posteriormente, utilizado em estudos celulares que permitam observar o fenótipo verificado diretamente a partir de CC3.

A análise da composição em açúcares mostrou que o açúcar maioritário presente na fracção CC3 é a ribose, principal constituinte do RNA (também confirmado por espectrofotometria UV-vis, eletroforese e FTIR). Através da sequenciação e posterior análise bioinformática foi possível descobrir qual a sequência de RNA potencialmente responsável por esta atividade (CCTGCAGGTCGA-CTCTAGAGGATCCCC-CGACTCGAGTCGG), sendo

uma sequência de pequeno tamanho e com elevada percentagem de guaninas e citosinas, formando, provavelmente, uma molécula com uma estrutura secundária estável. A fração em estudo mostrou possuir atividade antitumoral, provocando a morte celular das células Caco-2 ao fim de 48h. Através do RNA-FISH foi possível verificar que o RNA presente em CC3 se incorpora nas células atravessando tanto a membrana celular como nuclear, acumulando-se no citoplasma e no núcleo das mesmas.

O *C. cibarius* revelou apresentar componentes com atividade anticancerígena e, uma vez descoberta a sequência de RNA alvo e demonstradas as suas interações com a célula, este trabalho torna-se bastante promissor para a futura síntese artificial deste RNA, sem recorrer ao cogumelo, uma vez que este não é cultivável, podendo, num futuro próximo, proceder-se à sua síntese artificial e posterior incorporação em fármacos.

Palavras-chave: *Cantharellus cibarius*; atividade anticancerígena; ácidos nucleicos, RNA, sequenciação; *mimics*.

Abstract

Cantharellus cibarius is an edible mushroom of ample consumption due to its sensorial properties. Previous studies revealed that this mushroom has a high antiproliferative activity against several cancer cell lines. The main responsible for this action is a fraction, isolated by anion exchange chromatography, with available data indicated to be mainly composed by ribonucleic acid (RNA).

The main objectives of this study were to confirm the nature of the molecule carrying antitumor activity, to observe its action, to determine its nucleotide sequence and to carry out preliminary studies related to potential sites of its interaction and action in the cell.

Extraction, isolation and purification of *Cantharellus cibarius* biopolymers was performed, from which three fractions were obtained: CC1, CC2 and CC3. CC3 is the fraction that shows antitumor activity. Afterwards, the fractions were chemically characterized, with a special focus on the CC3. Its composition in sugars, fatty acids and phospholipids was analyzed, and a detailed analysis of nucleic acids was carried out by UV-vis spectrophotometry, agarose gel electrophoresis and FTIR. After the suggestion of RNA presence, the cDNA synthesis from the isolated RNA and its amplification by DOP-PCR was performed. Then, the obtained PCR products were cloned and the plasmid DNA from the positive clones was extracted. These were sequenced. The obtained sequences were analyzed bioinformatically in order to verify the type of this RNA. Moreover, the isolated fraction was placed in contact with cancer cell lines, namely colorectal cancer cells (Caco-2) followed by RNA-FISH methodology in order to detect and localize the RNAs within the cells. Based on the most conserved sequence, and still very preliminary, its artificial synthesis (mimics) was performed. Mimics is intended to be used in cellular studies that allow to observe the phenotype verified directly from CC3.

The analysis of the composition in sugars showed that the major sugar present in CC3 is ribose, the main constituent of the RNA (also confirmed by UV-vis spectrophotometry, electrophoresis and FTIR). Through sequencing and subsequent bioinformatic analysis it was possible to find out which RNA sequence is responsible for this activity (CCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCC-CGACTCGAGTCGG). It is a sequence with small size and high percentage of guanines and cytosines, probably forming a molecule with a stable secondary structure. The fraction under study shows antitumor activity since cell death of Caco-2 cells occurred in contact with it after 48h. Through RNA-FISH, it was possible to observe that the RNA present

in CC3 is incorporated into cells. This RNA is capable to crossing both cellular and nuclear membranes and accumulating in the cytoplasm and nucleus of the cells.

C. cibarius revealed to have compounds with anticancer activity. Once the target RNA sequence has been discovered and its interactions with the cell demonstrated, this work becomes very promising for future artificial synthesis of this RNA (without resorting to the mushroom once that it is not cultivable). Thus, in the future, it will be possible to proceed to its artificial synthesis and subsequent incorporation into drugs.

Keywords: *Cantharellus cibarius*; anticancer activity; nucleic acids, RNA, sequencing; mimics.

Índice

AGRADECIMENTOS	XI
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XV
ÍNDICE	XVII
ÍNDICE DE FIGURAS	XXI
ÍNDICE DE TABELAS	XXIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XXV
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL	3
1.1. A história dos cogumelos	3
1.2. Cogumelos como alimentos funcionais.....	4
1.3. Consumo e cultivo de cogumelos no mundo.....	7
1.4. <i>Cantharellus cibarius</i> – O cogumelo em estudo	10
1.5. Alguns constituintes de <i>Cantharellus cibarius</i>	13
1.5.1. Matéria seca	13
1.5.2. Hidratos de carbono.....	14
1.5.3. Proteínas e aminoácidos	16
1.5.4. Lípidos	17
1.5.5. Ácidos nucleicos	19
1.6. Efeitos terapêuticos estudados no <i>Cantharellus cibarius</i>	20
1.7. Biologia celular e molecular do cancro.....	22
1.8. A importância das linhas celulares tumorais no estudo do cancro	24
1.9. RNAs não codificantes: Qual o seu papel no cancro?	27
CAPÍTULO 2: ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS	31
CAPÍTULO 3: MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1. Cogumelo em estudo.....	35
3.2. Isolamento, extração e purificação de biopolímeros.....	35
Protocolo 1: Extração e isolamento de biopolímeros	36
Protocolo 2: Purificação/fracionamento de biopolímeros	37
3.3. Caracterização química das frações	39

3.3.1. Determinação colorimétrica dos açúcares totais	39
Protocolo 3: Método do ácido fenol-sulfúrico	39
3.3.2. Determinação da composição em açúcares	40
Protocolo 4: Cromatografia de troca aniônica de elevada eficiência com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD)	40
3.3.3. Pesquisa de ácidos nucleicos	43
Protocolo 5: Espectrofotometria de absorção ultravioleta visível (UV-vis).....	45
Protocolo 6: Eletroforese em gel de agarose.....	45
Protocolo 7: Espectroscopia de infravermelho com transformadas de <i>Fourier</i> (FTIR).....	46
3.3.4. Determinação quantitativa de fosfolípidos e determinação da composição em ácidos gordos da fração CC3	46
Protocolo 8: Recuperação de fosfolípidos pelo Método de <i>Folch</i> (Reis et al., 2013).....	48
Protocolo 9: Transesterificação de fosfolípidos.....	48
Protocolo 10: Determinação quantitativa de fosfolípidos pelo “Ensaio do fósforo”	49
Protocolo 11: Determinação da composição em ácidos gordos dos fosfolípidos presentes em CC3 por cromatografia gasosa (GC)	50
3.4. Transcrição reversa do RNA presente na fração CC3	50
Protocolo 12: Síntese de cDNA a partir do RNA presente na fração CC3	50
3.5. <i>Degenerate oligonucleotide-primed</i> PCR (DOP-PCR)	51
Protocolo 13: Amplificação de cDNA por DOP-PCR	52
3.6. Clonagem de produtos PCR	53
Protocolo 14: Clonagem dos produtos de transcrição reversa com <i>primers Oligo dT e Random Hexamers</i> e dos produtos de DOP_PCR com <i>primers 6MW e F/S</i> com o vetor pUC19DNA/SmaI	55
3.7. Extração de DNA plasmídico	59
Protocolo 15: Extração de DNA plasmídico dos clones anunciados como positivos.....	59
3.8. Sequenciação e análise bioinformática	60
3.9. Tratamento de células Caco-2 com a fração CC3.....	63
Protocolo 16: Verificação do efeito antitumoral de CC3 em células Caco-2.....	64
3.10. <i>Fluorescent in situ hybridization</i> (FISH).....	65
Protocolo 17: PCR de marcação para posterior execução da técnica de <i>RNA Fluorescent in situ hybridization</i> (RNA-FISH) – Preparação da sonda.....	66
Protocolo 18: <i>RNA Fluorescent in situ hybridization</i> (RNA-FISH)	67

CAPÍTULO 4: RESULTADOS	73
4.1. Extração e isolamento de biopolímeros	73
4.2. Fracionamento e purificação do material de elevado peso molecular (HMWM).....	74
4.3. Caracterização química das frações	75
4.3.1. Determinação colorimétrica dos açúcares totais	75
4.3.2. Determinação da composição em açúcares	77
4.3.3. Pesquisa de ácidos nucleicos	82
a) Espectrofotometria de absorção UV-vis	82
b) Eletroforese em gel de agarose	84
c) Espectroscopia de infravermelho com transformadas de <i>Fourier</i> (FTIR).....	86
4.3.4. Determinação quantitativa de fosfolípidos e determinação da composição em ácidos gordos da fração CC3	87
4.4. Clonagem de produtos PCR	89
4.5. Sequenciação e análise bioinformática	92
4.6. Tratamento de células Caco-2 com a fração CC3.....	102
4.7. RNA <i>Fluorescent in situ hybridization</i> (RNA-FISH).....	102
CAPÍTULO 5: DISCUSSÃO DE RESULTADOS	107
5.1. Extração e isolamento de biopolímeros	107
5.2. Caracterização química das frações	108
5.2.1. Teor e composição em açúcares.....	108
5.2.2. Pesquisa de ácidos nucleicos	110
5.2.3. Determinação quantitativa de fosfolípidos e determinação da composição em ácidos gordos da fração CC3	112
5.3. Sequenciação e análise bioinformática	114
5.4. Tratamento de células Caco-2 com a fração CC3 e RNA <i>Fluorescent in situ hybridization</i> (RNA-FISH).....	117
CAPÍTULO 6: CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....	121
CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS.....	125
Referências Bibliográficas	125
Referências Eletrônicas	136
Referências Fotográficas	137

ANEXOS.....139
ANEXO A 141
ANEXO B 143

Índice de figuras

Figura 1.1: Pirâmide demonstrativa da complexidade e investimento dos diferentes tipos de produtos comercializados.	5
Figura 1.2: Cultivo médio de cogumelos (em porcentagem), por continente, entre os anos 2004 e 2014.	7
Figura 1.3: Produção média de cogumelos (em milhões de toneladas), em diferentes países, entre os anos de 2004 a 2014.	8
Figura 1.4: Ciclo de vida dos cogumelos (simbióticos).	9
Figura 1.5: <i>Cantharellus cibarius</i> em duas fases de crescimento: jovem (1) e adulto (2).	10
Figura 1.6: <i>Hygrophoropsis aurantiaca</i>	12
Figura 1.7: <i>Omphalotus olearius</i>	12
Figura 1.8: <i>Omphalotus illudens</i>	12
Figura 1.9: Representação esquemática de um fosfolípido com respectiva representação 3D.	19
Figura 1.10: Ciclo celular e <i>checkpoints</i>	22
Figura 1.11: Processo de metastização de um tumor primário até ao crescimento do tumor secundário num novo local do organismo.	24
Figura 3.1: Esquema resumo dos procedimentos de isolamento, extração e purificação de biopolímeros isolados de <i>Cantharellus cibarius</i>	38
Figura 3.2: Esquema resumo do procedimento efetuado para a determinação da composição em açúcares das amostras WSM, HMWM, CC1, CC2 e CC3 em análise.	43
Figura 3.3: Esquema resumo dos passos envolvidos da técnica de clonagem.	54
Figura 4.1: Cromatograma obtido por cromatografia de troca aniônica resultante da injeção e eluição do material de elevado peso molecular (HMWM) isolado de <i>Cantharellus cibarius</i>	74
Figura 4.2: Cromatograma obtido no procedimento de pesquisa de açúcares totais do material de elevado peso molecular (HMWM) isolado de <i>Cantharellus cibarius</i> , pelo método do ácido fenol-sulfúrico.	76
Figura 4.3: Cromatograma HPAEC-PAD de açúcares liberados após hidrólise ácida do material solúvel em água (WSM) isolado de <i>Cantharellus cibarius</i>	78
Figura 4.4: Cromatograma HPAEC-PAD de açúcares liberados após hidrólise ácida do material de elevado peso molecular (HMWM) isolado de <i>Cantharellus cibarius</i>	78

Figura 4.5: Cromatograma HPAEC-PAD de açúcares liberados após hidrólise ácida da fração CC1 isolada de <i>Cantharellus cibarius</i>	79
Figura 4.6: Cromatograma HPAEC-PAD de açúcares liberados após hidrólise ácida da fração CC2 isolada de <i>Cantharellus cibarius</i>	79
Figura 4.7: Cromatograma HPAEC-PAD de açúcares liberados após hidrólise ácida da fração CC3 isolada de <i>Cantharellus cibarius</i>	80
Figura 4.8: Espectro UV-vis das absorvâncias lidas em função do comprimento de onda (700-200 nm) do material solúvel em água (WSM) isolado de <i>Cantharellus cibarius</i>	83
Figura 4.9: Espectro UV-vis das absorvâncias lidas em função do comprimento de onda (700-200nm) do material de elevado peso molecular (HMWM) isolado de <i>Cantharellus cibarius</i>	83
Figura 4.10: Espectro UV-vis das absorvâncias lidas em função do comprimento de onda (700-200 nm) da fração CC3 isolada de <i>Cantharellus cibarius</i>	83
Figura 4.11: Gel de agarose obtido para a fração CC3 isolada de <i>Cantharellus cibarius</i> ..	84
Figura 4.12: Espectro FTIR da fração CC3 isolada de <i>Cantharellus cibarius</i> na região de 500–4000 cm ⁻¹	86
Figura 4.13: Cromatograma de análise de ácidos gordos, obtido por cromatografia gasosa, para a fração CC3 isolada de <i>Cantharellus cibarius</i>	88
Figura 4.14: Gel obtido pelo procedimento de eletroforese em gel de agarose para os clones O_RT, H_RT, O_DOP_6MW, O_DOP_F/S, H_DOP_6MW e H_DOP_F/S.	90
Figura 4.15: Alinhamento múltiplo, através do programa computacional <i>Geneious</i> , de todas as sequências obtidas a partir dos clones enviados para sequenciação.	94
Figura 4.16: Alinhamento múltiplo, através do programa computacional <i>Geneious</i> , de todas as sequências obtidas a partir dos clones enviados para sequenciação..	95
Figura 4.17: Indução de morte celular em células Caco-2 (células humanas de tumor colorretal) tratadas com a fração CC3 isolada de <i>Cantharellus cibarius</i>	102
Figura 4.18: Imagens obtidas pela técnica de RNA-FISH.	103
Figura A.1: Mapa do vector pUC19DNA/SmaI.....	141

Índice de tabelas

Tabela 1.1: Classificação taxonómica de <i>Cantharellus cibarius</i>	10
Tabela 1.2: Percentagem de matéria seca (MS) presente em <i>Cantharellus cibarius</i> tendo em consideração vários autores e vários locais.	13
Tabela 1.3: Composição (g/100g MS) relativamente a hidratos de carbono totais e fibra dietética total, solúvel e insolúvel presentes em <i>Cantharellus cibarius</i>	15
Tabela 1.4: Exemplos de linhas celulares tumorais largamente utilizadas em investigação. .	25
Tabela 3.1: Composição das soluções-mãe necessárias para a realização do método de determinação da composição em açúcares.	41
Tabela 3.2: Composição dos padrões de calibração necessários para a realização do método de determinação da composição em açúcares.	41
Tabela 3.3: Mistura de reação utilizada para a execução da transcrição reversa do RNA presente na fração CC3.....	51
Tabela 3.4: Programa utilizado para a síntese de cDNA.	51
Tabela 3.5: Mistura de reação utilizada para a realização do DOP-PCR.....	52
Tabela 3.6: Programa de DOP-PCR utilizado para a amplificação do cDNA.....	53
Tabela 3.7: Mistura de reação preparada para a execução do passo <i>Fast End Repair</i>	56
Tabela 3.8: Mistura de reação utilizada para realização do passo de ligação do inserto ao vetor pUC19DNA/SmaI.	57
Tabela 3.9: Mistura de reação preparada para a realização do PCR de <i>screening</i> das bactérias recombinantes.	58
Tabela 3.10: Programa utilizado para a reação de PCR de <i>screening</i> de bactérias recombinantes.	58
Tabela 3.11: Mistura de reação preparada para a realização do PCR de marcação.....	66
Tabela 3.12: Programa utilizado na reação de PCR de marcação.....	66
Tabela 4.1: Rendimento, em percentagem (%), obtido para o isolamento do AIR, WSM e HMWM de <i>Cantharellus cibarius</i>	73
Tabela 4.2: Rendimento, em percentagem (%), obtido para as frações CC1, CC2 e CC3, conseguidas após fracionamento do material de elevado peso molecular (HMWM) com uma massa inicial de 800 mg.....	76
Tabela 4.3: Rendimento e composição em açúcares das amostras WSM e HMWM e das frações CC1, CC2 e CC3 extraídas e purificadas de <i>Cantharellus cibarius</i>	81

Tabela 4.4: Absorvâncias a 230, 260 e 280 nm e relação entre as absorvâncias a 260/280 nm e 260/230 nm da fração CC33 isolada de <i>Cantharellus cibarius</i>	85
Tabela 4.5: Composição em ácidos gordos da fração CC3 isolada de <i>Cantharellus cibarius</i> com respectiva identificação, tempo de retenção e teor.	88
Tabela 4.6: Tabela resumo dos clones considerados como positivos e negativos.	91
Tabela 4.7: Sequências obtidas a partir do DNA extraído dos clones considerados como positivos.	92
Tabela 4.8: Estrutura secundária das sequências obtidas através da ferramenta bioinformática <i>RNAfold</i> com respectiva energia livre mínima (MFE), tamanho da sequência e percentagem de G+C e A+T/U.	97
Tabela A.1: Similaridades entre as várias sequências obtidas a partir dos clones sequenciados com evidência para similaridades de 100% (vermelho) e similaridades a baixo dos 80% (azul).	143

Lista de Abreviaturas

3D	Tridimensional
4xT	<i>Detergent wash solution</i> – 4xSSC em 0.05% Tween 20
5'AMP	Adenosina 5'- monofosfato
5'CMP	Citidina 5'- monofosfato
5'GMP	Guanosina 5'- monofosfato
5'TAMRA	5-carboxi-tetrametilrodamina (rodamina)
5'UMP	Uridina 5'- monofosfato
5'XMP	Xantosina 5'- monofosfato
A; C; T; G; U	Adenina; Citosina; Timina; Guanina; Uracilo
aa	Aminoácido
Abs	Absorvância
a.C.; d.C.	Antes de Cristo; depois de Cristo
ACE	Enzima conversora da angiotensina (<i>Angiotensin-Converting Enzyme</i>)
AIR	Resíduo insolúvel em álcool (<i>Alcohol Insoluble Residue</i>)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BLASTN	<i>Standard nucleotide BLAST</i>
BLASTP	<i>Standard protein BLAST</i>
Bp	Par de base (<i>Base pair</i>)
CC1	Fração 1 de <i>Cantharellus cibarius</i>
CC2	Fração 2 de <i>Cantharellus cibarius</i>
CC3	Fração 3 de <i>Cantharellus cibarius</i>
CDK	Cinases dependentes de ciclina (<i>Cyclin-Dependent Kinases</i>)
cDNA	DNA complementar
DAPI	<i>4',6- diamino-2-phenylindole</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
DOP-PCR	<i>Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR</i>

dT	Desoxitimina
e.g	Por exemplo (do latim <i>Exempli gratia</i>)
FD	Fibras diatéticas
FISH	<i>Fluorescent In Situ Hybridization</i>
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformadas de <i>Fourier</i> (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
FBS	Soro fetal bovino (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
G	<i>Gravitational force</i>
GC	Cromatografia gasosa
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HC	Hidratos de carbono
HMWM	Material de elevado peso molecular (<i>High Molecular Weight Material</i>)
HPAEC-PAD	Cromatografia de troca iónica de alta eficiência com deteção amperométrica pulsada (<i>High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection</i>)
IPTG	β -D-1-tiogalactopiranoside de isopropilo
LB	Meio <i>Luria Bertani</i>
lncRNA	Longo RNA não codificante (<i>long non coding RNA</i>)
MFE	Energia livre mínima (<i>minimum free energy</i>)
miRNA	micro RNA
mRNA	RNA mensageiro
MS	Matéria seca
NCBI	<i>National center for biotechnology information</i>
ncRNA	RNA não codificante
NF-κB	Fator nuclear κ B (<i>Nuclear factor κB</i>)
Nt	Nucleótido
NRDR	<i>Non-coding RNA Databases Resource</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBST	<i>Phosphate Buffered Saline with Tween 20</i>

PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PI	Padrão interno
PoliA	Poliadenina
R	Ponto de restrição
<i>Rcfold</i>	<i>Reverse complementary folding</i>
<i>RefSeq</i>	<i>Reference Sequence</i>
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
Rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossômico
RT	Temperatura ambiente (<i>Room Temperature</i>)
RT-PCR	Transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>)
siRNA	Pequeno RNA de interferência (<i>small interfering RNA</i>)
sncRNA	Pequeno RNA não codificante (<i>small non coding RNA</i>)
snRNA	Pequeno RNA nuclear (<i>small nuclear RNA</i>)
snoRNA	Pequeno RNA nucleolar (<i>small nucleolar RNA</i>)
SOC	<i>Super Optimal Catabolite</i>
SSC	<i>Saline Sodium Citrate</i>
tRNA	RNA transferência
UA	Unidades de absorvância
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta visível
x	Veza
WSM	Resíduo solúvel em água (<i>Water Soluble Residue</i>)

Capítulo 1

Introdução geral

Capítulo 1: Introdução geral

1.1. A história dos cogumelos

Hoje, sabe-se que a produção de medicamentos, nomeadamente antibióticos, seria inconcebível sem a presença de fungos microscópicos tais como *Penicillium notatum* do qual se obtém o antibiótico penicilina (Foster e Woodruff, 1943). No entanto, também os fungos macroscópicos, principalmente os *Basidiomycetes*, nos quais se inserem os cogumelos, demonstram ter cada vez mais interesse, uma vez que pesquisas recentes têm evidenciado várias propriedades terapêuticas dos mesmos (Cargill, 2016; Wasser, 2014).

A utilização de cogumelos, não só na alimentação mas também em terapias tradicionais antigas e em cerimónias religiosas (Li *et al.*, 2016), remonta aos períodos do Neolítico e Paleolítico, não sendo uma prática exclusiva do povo Europeu (Cargill, 2016; Wani *et al.*, 2010; Wasser, 2014).

A primeira evidência arqueológica que comprova a utilização de cogumelos pela humanidade na Europa foi a descoberta de uma tigela de comida (perto de Nola, Itália), que remonta à Idade do Bronze (3300 antes de Cristo (a.C.)), na qual foram encontrados resíduos de cogumelos (Li *et al.*, 2016). Também referente à mesma época (3300 a.C.), foi encontrada, em 1991, uma múmia naturalmente preservada num glaciar nos Alpes de Venoste (fronteira da Áustria com a Itália), ao qual chamaram de “Ötzi, O Homem do Gelo”. Este trazia consigo duas espécies de cogumelos: *Piptoporus betulinus*, utilizado pelas suas propriedades antibióticas e *Fomes fomentarius*, utilizado para fazer fogo (Cargill, 2016; Li *et al.*, 2016). Mais recentemente, entre 2010 e 2013, numa gruta em Cantábria, Espanha (*El Mirón Cave*), foram descobertos ossos humanos, com cerca de 18700 anos, de uma mulher apelidada por “*The Lady Red*”, que continha vestígios de vários alimentos, incluindo cogumelos, nos seus dentes. Esta é a evidência mais antiga que foi encontrada até hoje (Straus *et al.*, 2015).

É sabido que, no Ocidente, os Gregos e os Romanos usavam várias espécies de cogumelos para a cura de determinadas enfermidades. Considerados como luxúria, eram apenas reservados para a nobreza pelo que os imperadores proibiam o povo de se alimentarem dos mesmos ou de os utilizarem para os mais diversos fins (San, 2015a). Dando ênfase a esta crença, em 455 a.C., Hipócrates, reconhecido hoje como o "pai da medicina moderna", mencionou o uso de cogumelos para estimular certos pontos no tratamento de doenças renais crónicas, através da

sua aplicação (aquecida) em zonas específicas do corpo. No entanto, no século I depois de Cristo (d.C.), Dioscórides, um médico do exército de Nero, publicou o seu trabalho “*De Materia Medica*”, no qual divulgava que os cogumelos eram difíceis de digerir e venenosos, sendo as únicas espécies comestíveis *Fomitopsis officinalis* e *Laricifomes officinalis*. Devido à influência desta publicação, o uso de cogumelos, quer como fonte alimentar quer como fonte medicinal, passou a ser praticamente nulo até ao século XX d.C. (Jakapovich, 1999; Wani *et al.*, 2010).

Com o decorrer dos anos, o uso de cogumelos tem-se expandido, não só como produtos alimentares, mas também como fonte de produtos farmacêuticos e cosmeceuticos. Muitos investigadores documentaram que os cogumelos comestíveis são fonte de uma enorme variedade de compostos nutraceuticos, como os polissacarídeos, fibras dietéticas, terpenos, péptidos, glicoproteínas, elementos minerais, ácidos gordos e antioxidantes (Rathore *et al.*, 2017) como será abordado no tópico 1.5. É de notar que, por detrás do conhecimento e do uso que se faz hoje em dia das qualidades medicinais de algumas espécies de cogumelos, existem milhares de anos de medicina tradicional e de investigação científica que contribuíram para uma melhoria crescente da saúde do indivíduo e da comunidade. Espera-se que, com o passar dos anos, todas estas contribuições permitam a entrada em massa de produtos de origem natural para a manutenção da saúde, aumentando a qualidade e esperança média de vida.

1.2 Cogumelos como alimentos funcionais

O início do século XXI é marcado por um aumento da esperança média de vida assim como um grande interesse, por parte dos *media*, relativamente a questões relacionadas com a saúde e o bem-estar, o que tem levado a um interesse crescente por parte dos consumidores no que toca à compra de produtos alimentares cujas funções vão muito além do sabor e valor nutricional. Há um aumento da procura de alimentos que apresentem propriedades promotoras da saúde tais como o controlo, a prevenção e o tratamento de determinado tipo de doenças – os chamados “alimentos funcionais” - propriedades estas que poderão não estar presentes nos alimentos convencionais (Pappalardo e Lusk, 2016; Silva *et al.*, 2016).

O termo “alimento funcional” surgiu no Japão em 1985, tendo sido definido como “produtos alimentares fortificados com componentes que possuem efeitos fisiológicos vantajosos” (Kozonova e Povarona, 2015; Pappalardo e Lusk, 2016), sendo que este é o único país em que o conceito está bem estabelecido. Nos restantes países, apesar de ainda não existir uma definição exata, a mais aceite parece ser: “Alimentos que, fazendo parte da vida quotidiana,

são consumidos de forma regular em quantidades normais e não tóxicas. Promovem um benefício clinicamente comprovado para a saúde, nomeadamente no que toca à prevenção e tratamento de doenças crónicas e ação sobre determinadas funções alvo do organismo” (Martirosyan e Singh, 2015; Silva *et al.*, 2016).

Os elementos chave na eficácia dos alimentos funcionais são designados de “compostos bioativos”. Estes são os verdadeiros responsáveis pelo desenvolvimento de uma determinada ação no organismo, podendo esta ser positiva ou negativa e estando dependente da substância em causa, dose e biodisponibilidade da mesma (Guaadaoui *et al.*, 2014). Os compostos bioativos incluem uma enorme variedade de classes de compostos tais como compostos fenólicos, lípidos, proteínas e péptidos e hidratos de carbono (HC) sendo que a sua quantidade é responsável pela conversão de alimentos convencionais em funcionais (Biesalski *et al.*, 2009; Martirosyan e Singh, 2015).

Apesar das suas propriedades terapêuticas, os alimentos funcionais são regulados e classificados de forma diferente comparativamente com os medicamentos e alimentos medicinais (Figura 1.1) pois, enquanto que os primeiros podem ser consumidos sem restrições no dia-a-dia, os segundos apenas devem ser consumidos em casos específicos e sob supervisão médica. Para além disso, o investimento e complexidade dos produtos de origem farmacêutica/sintética são muito mais elevados do que os produtos de origem natural (Kozonova e Povarona, 2015).

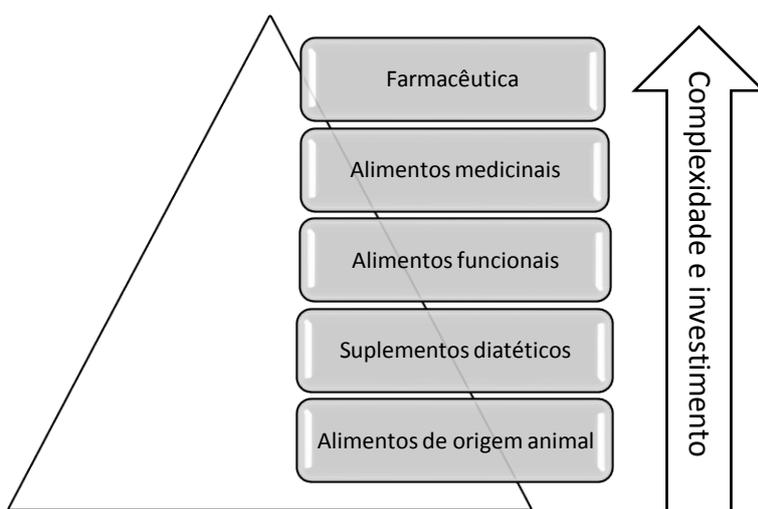


Figura 1.1: Pirâmide demonstrativa da complexidade e investimento dos diferentes tipos de produtos comercializados. Os alimentos funcionais demonstram ter uma menor complexidade e investimento quando comparados com produtos de origem farmacêutica tornando-se, por isso, mais vantajosos neste sentido. Adaptado de Kozonova e Povarona, 2015.

O mercado dos alimentos e ingredientes funcionais tem crescido exponencialmente ao longo dos últimos anos devido ao crescente interesse por parte dos consumidores em adotar um estilo de vida e dieta saudáveis (Silva *et al.*, 2016) sendo que, apesar do preço ser um fator decisivo, os mesmos estão dispostos a pagar um valor mais elevado por estes produtos (Pappalardo e Lusk, 2016). O Japão continua a ser o país onde mais alimentos funcionais são vendidos (cerca de 40%), seguido dos Estados Unidos da América (cerca de 38%). O mercado Europeu tem vindo a crescer ao longo dos anos contando atualmente com cerca de 20% (Kozonova e Povarona, 2015). Hodiernamente, unem-se esforços para incorporar ingredientes funcionais, tais como compostos bioativos purificados ou extratos concentrados de fontes naturais, em determinados alimentos, de modo a promover novas categorias de produtos funcionais e novas oportunidades comerciais. Para além disso, outro objetivo é o uso de tecnologias tais como o microencapsulamento, nanoencapsulamento e o uso de emulsões de modo a mascarar características desagradáveis (sabor e odor), evitar a interação do material de interesse com ingredientes bioativos presentes noutros alimentos e condições ambientais adversas (teor de oxigénio, luz e pH) que poderiam levar à sua degradação e promover uma libertação controlada do composto bioativo, conduzindo-o ao local correto no tempo correto (Silva *et al.*, 2016).

Os níveis e locais de atuação dos alimentos funcionais são vários pelo que podem intervir, por exemplo, na flora intestinal, no metabolismo da glucose e no metabolismo dos lípidos (Giacco *et al.*, 2013). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), grande parte da população mundial faz uso dos compostos bioativos presentes nos alimentos como cuidado de saúde primário (Silva *et al.*, 2016). Estes compostos têm sido cada vez mais estudados pelas indústrias farmacêuticas e por investigadores em ensaios clínicos (Kozarski *et al.*, 2015; Rathore *et al.*, 2017) na medida em que demonstram ser capazes de influenciar beneficemente parâmetros metabólicos e doenças crónicas como é o caso da diabetes do tipo 2, doença cardiovascular e alguns tipos de cancro, possibilitam um melhor desenvolvimento e crescimento (através da dieta da mãe durante a gravidez e alimentação das crianças e adolescentes), promovem a manutenção da função imunitária, da saúde gastrointestinal, da saúde mental, da saúde no envelhecimento e do desempenho físico e são ainda capazes de reduzir o risco de obesidade, na medida em que permitem uma bioregulação do apetite (European Commission, 2010).

Devido à sua composição com elevadas quantidades de proteína, baixos níveis de gordura, elevada proporção de ácidos gordos insaturados e baixa quantidade de calorias, os

cogumelos tornaram-se excelentes alimentos para introduzir na dieta alimentar (Kozarski *et al.*, 2015). No entanto, como já foi referido anteriormente, há centenas de anos que o uso dos mesmos não se destina apenas à culinária pois várias espécies têm vindo a ser usadas também com fins terapêuticos (Muszynska *et al.*, 2016; Ng *et al.*, 2016) devido às propriedades dos seus constituintes (HC, proteínas e aminoácidos (aa), vitaminas, minerais, ácidos nucleicos, lípidos, compostos fenólicos, enzimas e compostos indólicos), que têm demonstrado ser benéficos para o organismo (Kozarski *et al.*, 2015; Muszynska *et al.*, 2016; Reis *et al.*, 2017), como será abordado, posteriormente, no tópico 1.5.

Apesar da pesquisa relativamente à ação do cogumelo *Cantharellus cibarius* (utilizado neste estudo) ser excassa, sabe-se que este apresenta uma elevada variedade de compostos bioativos assim como várias propriedades benéficas para a saúde, nomeadamente atividade antiproliferativa contra células cancerígenas (Muszynska *et al.*, 2016; Vamanu e Nita, 2014).

1.3. Consumo e cultivo de cogumelos no mundo

Atendendo ao elevado interesse por parte da população mundial neste tipo de alimentos, tem-se verificado, ao longo dos anos, um crescente interesse no cultivo dos mesmos de modo a diminuir a apanha selvagem e a aumentar a preservação de algumas espécies. Neste aspeto, avaliando o período decorrente entre os anos 2004 e 2014, o mercado asiático foi o mais influente, sendo também o principal produtor, como é possível verificar na Figura 1.2 (*Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), 2017).

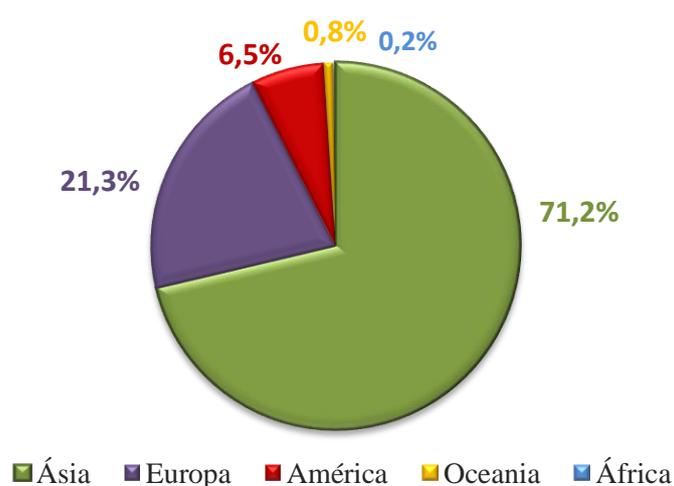


Figura 1.2: Cultivo médio de cogumelos (em percentagem), por continente, entre os anos 2004 e 2014. Adaptado de *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), 2017.

É de realçar países como a China, o maior produtor de cogumelos do mundo (Figura 1.3), em que o cultivo aumentou cerca de 150 vezes nos últimos 25 anos. Em 2013, a China foi responsável por cerca de 85% da produção total de cogumelos sendo que, destes, apenas 5% foram exportados e o resto foi utilizado para consumo próprio (San, 2015b). O sucesso deste cultivo deve-se ao facto de haver um maior interesse em juntar este alimento ao cardápio diário e devido à relutância, cada vez maior, por parte da população, no que toca à apanha de cogumelos selvagens ou compra dos mesmos devido a, por vezes, não ser fácil distinguir espécies comestíveis de espécies venenosas. Para além disso, este cultivo reforça os meios de subsistência pois gera uma fonte rápida de nutrientes e de rendimento. Para produtores mais pequenos, o cultivo de cogumelos faculta a oportunidade de, através da reciclagem da matéria orgânica, melhorar a sustentabilidade dos sistemas de produção uma vez que esta pode ser usada como substrato de crescimento (fertilizante) para outras culturas (Marshall e Nair, 2009).

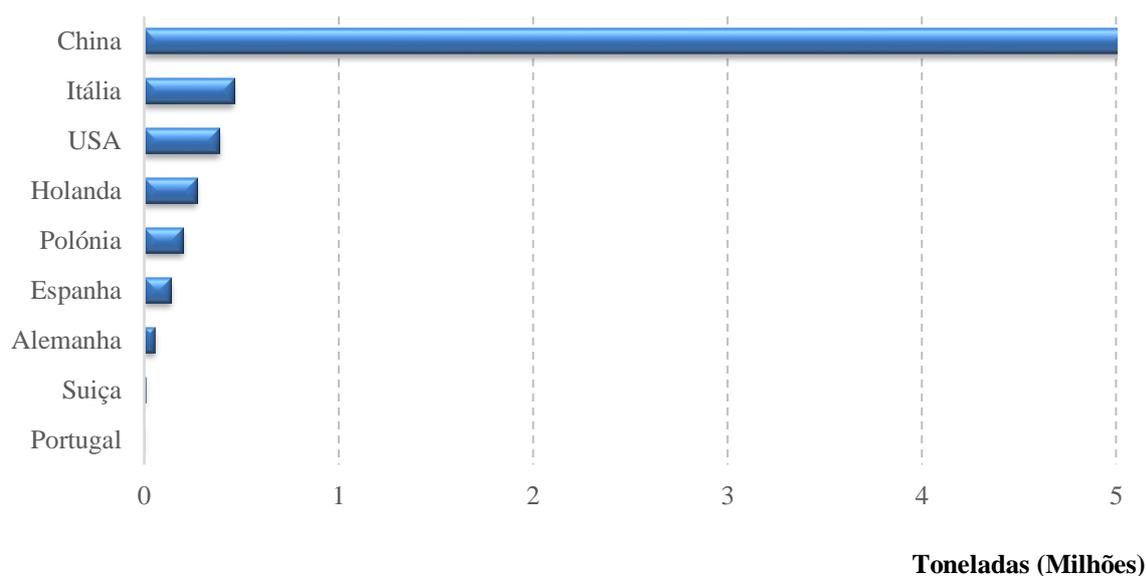


Figura 1.3: Produção média de cogumelos (em milhões de toneladas), em diferentes países, entre os anos de 2004 a 2014. Adaptado de *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*, 2017.

Durante muitos anos, os cogumelos foram classificados como sendo vegetais, no entanto, a partir da década de 60, foram colocados num reino autónomo, denominado, segundo a classificação de Whittaker modificada por reino *Fungi* (Alexopoulos *et al.*, 1996), no qual são definidos como seres eucariotas que não possuem celulose na sua parede celular sendo esta constituída, geralmente, por α -quitina. São heterotróficos, não produzem clorofila e obtêm o seu alimento por absorção e armazenamento de glicogénio como substância de reserva (Kirk *et al.*, 2008). Podem ser classificados de três modos diferentes de acordo com a forma como obtêm os nutrientes: Sapróbios - produzem enzimas que hidrolisam a matéria orgânica em

decomposição que os rodeia. Podem ser colhidos na forma selvagem mas são muito valorizados como alimentos e medicamentos na sua forma cultivada; Simbióticos - crescem em associação (simbiose) com outros organismos formando, normalmente, micorrizas em árvores. O fungo ajuda a árvore a recolher água e fornece nutrientes provenientes do solo aos quais ela não consegue ter acesso e, em troca, a árvore fornece nutrientes essenciais ao crescimento do fungo. Como exemplo, *Cantharellus* e *Amanita*; Parasitas - vivem em associação com animais ou plantas dos quais tiram o meio para a sua sobrevivência, prejudicando, normalmente, o organismo hospedeiro (Marshall e Nair, 2009).

Os fungos simbióticos, especificamente, os cogumelos, são seres produtores de esporos e, para tal, possuem uma estrutura chamada de corpo de frutificação, sendo esta a estrutura essencial da sua reprodução. O principal responsável pelo crescimento vegetativo é o micélio, estrutura formada a partir de uma rede de filamentos ramificados chamados de hifas. Como podemos ver na Figura 1.4, os esporos são transportados pelo vento e, se pousarem num local favorável, germinam desenvolvendo o micélio (1). Dois micélios fundem-se e, caso as condições permaneçam húmidas, os corpos de frutificação conseguem evitar o ataque por parte de insetos e crescem até ao tamanho máximo num espaço de quinze dias (2). Por fim, a árvore e o fungo entram em contacto estabelecendo então uma relação de simbiose (3) (Marshall e Nair, 2009).

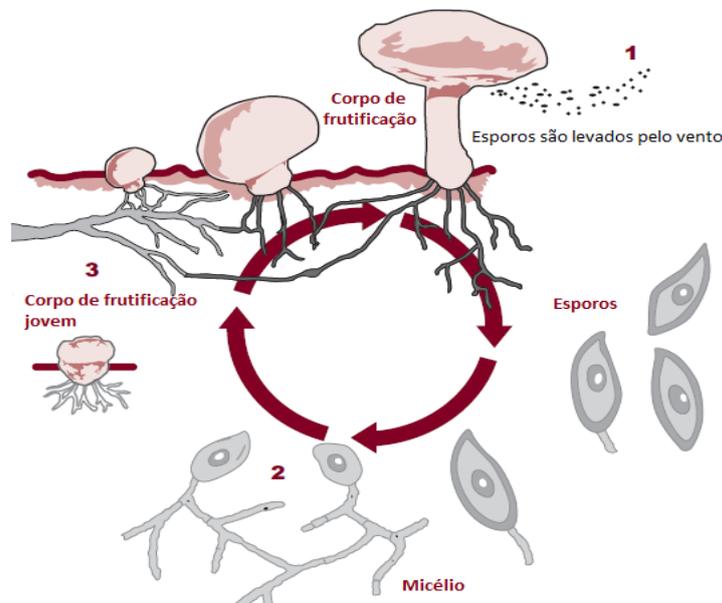


Figura 1.4: Ciclo de vida dos cogumelos (simbióticos). 1 – Os esporos são transportados pelo vento; 2 – Ocorre fusão entre dois micélios; 3 – Verifica-se uma relação de simbiose entre o hospedeiro e o fungo. Adaptado de Marshall e Nair, 2009.

1.4. *Cantharellus cibarius* – O cogumelo em estudo

Cantharellus é um género (Tabela 1.1) de cogumelo selvagem que engloba cerca de 149 espécies. A mais conhecida e difundida é *Cantharellus cibarius*, descoberto em 1821 por Elias Magnus Fries (Kirk, 2017).

Tabela 1.1: Classificação taxonómica de *Cantharellus cibarius*. Adaptado de Kirk, 2017.

Reino	<i>Fungi</i>
Filo	<i>Basidiomycota</i>
Classe	<i>Agaricomycetes</i>
Ordem	<i>Cantharellales</i>
Família	<i>Cantharallaceae</i>
Género	<i>Cantharellus</i>
Espécie	<i>Cantharellus cibarius</i>

São fungos ectomicorrízicos (Muszynska *et al.*, 2016) que podem ser observados na primavera, verão ou outono (Melo, 2010), têm hospedeiros apropriados em árvores como o pinho, o carvalho, o carpino e o abeto vermelho e podem ser encontrados em florestas e bosques da África, América do Norte, Ásia (incluindo regiões norte como os Himalaias e Yunnan, na China), Europa e Macaronésia (Açores, Madeira, Cabo Verde e Canárias) (Falandysz e Drewnowska, 2015; Melo, 2010; Muszynska *et al.*, 2016).

C. cibarius, conhecido como “*Girolle*” em França, “*Capo gallo*” em Itália, “*Yumurta mantari*” na Turquia ou “*Chantarelle/Golden chantarelle*” na Grã-Bretanha (Kozarski *et al.*, 2015) é um cogumelo com um pé de aproximadamente 2-8 x 0,5-3 cm que se vai tornando mais fino desde o topo até à base. Tem um chapéu com cerca de 2-12 cm de diâmetro, de forma convexa enquanto ainda é um cogumelo jovem (1), passando depois, em adulto (2), a possuir margens enroladas e onduladas (Figura 1.5) (Melo, 2010; Silva *et al.*, 2013).



Figura 1.5: *Cantharellus cibarius* em duas fases de crescimento: jovem (1) e adulto (2). Fotografado por Andreas Kunze, 2007.

Este cogumelo, com cor variável entre os tons amarelo-claro e o amarelo-gema-de-ovo, é largamente apreciado pelos consumidores devido ao seu odor frutado (pêssego/alperce) e sabor adocicado, podendo por vezes ser um pouco amargo ou apimentado, travo este que desaparece quando cozinhado. Devido a estas características, é vastamente utilizado na culinária e de várias formas: frito, assado, cozido, em omeletes, sopas ou molhos (Kozarski *et al.*, 2015; Muszynska *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2013).

Em consequência do elevado interesse neste cogumelo por parte da população, estima-se que sejam consumidas, anualmente, entre 15000 a 20000 toneladas do mesmo em todo o mundo (Muszynska *et al.*, 2016). O maior exportador de cogumelos é a Polónia sendo que, em 2012, foram colhidas 5943 toneladas de cogumelos selvagens das quais 3980 toneladas eram de *C. cibarius* com destino, principalmente, à Alemanha, França e USA (Falandysz e Drewnowska, 2015; Muszynska *et al.*, 2016).

De modo a dar resposta à quantidade de encomendas, e devido ao facto de ser um cogumelo com várias características vantajosas tais como a sua firmeza, durabilidade e resistência a bactérias e vermes (em consequência da sua estrutura densa) (Muszynska *et al.*, 2016), têm-se tentado o cultivo de *C. cibarius*, no entanto, sem sucesso (Kozarski *et al.*, 2015). Este cogumelo é conhecido como sendo uma espécie de crescimento lento e, para além disso, a germinação dos esporos de *C. cibarius* também tem sido difícil uma vez que os esporos exigem fatores indutores de germinação e estabelecer estas condições em laboratório ou em estufas nem sempre é possível (Ocañas *et al.*, 2014). Assim, devido a este cultivo não ser rentável, praticamente todos os cogumelos comprados são fonte de florestas (Muszynska *et al.*, 2016), o que se pode vir a tornar um grande problema no futuro devido à possibilidade de extinção da espécie.

Uma vez não há *C. cibarius* de cultivo e todos os cogumelos são fruto, por parte do Homem, da apanha manual, é importante conhecer a espécie ao pormenor pois existem espécies muito parecidas, algumas delas altamente tóxicas. A mais conhecida, *Hygrophoropsis aurantiaca* (Figura 1.6), que se confunde facilmente com *C. cibarius*, é uma espécie comestível, no entanto menos saborosa do que o verdadeiro *Cantharelle*. Conhecida como “Falso *Cantharellus*”, é um cogumelo raro que pode ser distinguido de *C. cibarius* através da sua coloração - uma vez que *C. cibarius* tem cor amarela e *H. aurantiaca* tem uma coloração alaranjada ligeiramente mais escura no centro do chapéu - e pela forma como as lâminas estão fixas no chapéu do cogumelo - em *H. aurantiaca* são profundas enquanto que em *C. cibarius*

são enrugadas e superficiais. Outro fator que distingue estes dois cogumelos é a consistência de ambos, uma vez que o “Falso *Cantharellus*” é frágil e *C. cibarius* é firme e muito consistente (Kuo, 2015; McHugh, 2016; Muszynska *et al.*, 2016).



Figura 1.6: *Hygrophoropsis aurantiaca*. Fotografado por Holger Krisp, 2012.

O maior problema pode advir da espécie *Omphalotus olearius* (Figura 1.7), um cogumelo tóxico, com chapéu hemisférico a convexo, quando jovem, e deprimido a umbilicado, quando adulto. Distingue-se dos *Cantharellus* por ser um pouco maior, tendo cerca de 6-15 cm de diâmetro e uma cor que pode variar de alaranjada a laranja avermelhada. Quando consumido apresenta textura, sabor e odor não apreciáveis. O seu consumo provoca gastrite aguda, com náuseas e vômitos muito precoces, sem diarreia, tendo um período de incubação muito curto. Outra espécie é *Omphalotus illudens* (Figura 1.8), também tóxico, muito semelhante e difícil de distinguir de *C. cibarius*. Cresce sobre cepos de oliveira ou na base do tronco de exemplares velhos (Silva *et al.*, 2013).



Figura 1.7: *Omphalotus olearius*.
Fotografado por John Chybowski, 2005.



Figura 1.8: *Omphalotus illudens*.
Fotografado por Adam Arendell, 2011.

1.5. Alguns constituintes de *Cantharellus cibarius*

1.5.1. Matéria seca

A matéria seca (MS) de um alimento é aquilo que permanece depois da evaporação total da água do mesmo, ou seja, é o indicador da quantidade de sólidos incluindo os nutrientes (HC, proteínas, lípidos, vitaminas, minerais, entre outros) que estão disponíveis. O peso total de um cogumelo é então a junção do seu teor em água (humidade) com a sua quantidade de MS. Nos cogumelos, a quantidade de MS é relativamente baixa, variando, para *C. cibarius*, entre 2 a 20% (Tabela 1.2) (Beluhan e Ranogajec, 2011; Jedidi *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2013; Ouzouni *et al.*, 2009), pois o seu teor em água é bastante elevado.

Na generalidade, nos cogumelos frescos, a humidade é muito variável, uma vez que esta se altera facilmente com as condições ambientais envolventes (Wang *et al.*, 2014). Não obstante, é de notar que também a quantidade de cada componente constituinte da MS é variável não só entre diferentes espécies de cogumelos como também na mesma espécie. Neste último caso, depende do local onde o cogumelo é colhido, como se pode verificar na Tabela 1.2, das condições ambientais que podem causar stresse como por exemplo radiações ultravioleta (UV), temperaturas extremas, infeções por parte de parasitas e poluição do ar e do solo, das técnicas de manuseamento e do processo de conservação (Kozarski *et al.*, 2015; Muszynska *et al.*, 2016).

O facto de conterem baixo teor de MS e, principalmente, de lípidos, faz dos cogumelos um alimento de baixo valor calórico (Kalač, 2009). *C. cibarius* possui cerca de 38 Kcal/100g o que o torna uma excelente opção para inserir no cardápio sendo incluído, cada vez mais naquilo a que chamamos uma dieta saudável (USDA, 2016).

Tabela 1.2: Percentagem de matéria seca (MS) presente em *Cantharellus cibarius* tendo em consideração vários autores e vários locais.

Matéria Seca (%)	Local	Referência
2,20	Nagaland, Índia	(Kumar <i>et al.</i> , 2013)
11,18	Noroeste da Tunísia	(Jedidi <i>et al.</i> , 2016)
14,24	Ístria e Slavonia, Croácia	(Beluhan e Ranogajec, 2011)
17,43	Macedónia Ocidental e Epiro, Grécia	(Ouzouni <i>et al.</i> , 2009)

1.5.2. Hidratos de carbono

Os cogumelos são vistos como elevadas fontes de HC bioativos (Taofiq *et al.*, 2016), constituindo entre 30 a 60% da sua MS (Cheung, 2008; Kalač, 2016; Thatoi e Singdevsachan, 2014), sendo este valor dependente das condições enunciadas anteriormente e, portanto, variando de autor para autor (Tabela 1.3). São os principais fornecedores de energia (Wang *et al.*, 2014) e possuem também várias propriedades promotoras da saúde já demonstradas em estudos anteriores (Taofiq *et al.*, 2016).

De um modo geral, quando falamos em HC podemos dividi-los em 4 tipos diferentes de acordo com as suas características estruturais: monossacarídeos (glucose; galactose; manose; arabinose; ribose; xilose; ramnose; ácido glucurónico; ácido galacturónico), oligossacarídeos (trealose), polissacarídeos (glicogénio) e polióis (manitol) (Asif *et al.*, 2011). Os HC totais constituem cerca de 5 a 25 g/100g de MS total dos cogumelos. Alguns destes podem contribuir para o sabor doce de alguns cogumelos (Ng *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2014).

Os HC totais incluem também as fibras dietéticas (FD) (Tabela 1.3). Estas são resistentes à digestão e absorção por parte do intestino delgado humano, ou seja, são resistentes à hidrólise por parte de enzimas endógenas e têm efeitos fisiológicos benéficos (Cheung, 2013). A FD total é constituída pelas fibras solúveis e insolúveis (Cheung, 2013; Nile e Park, 2014). As primeiras o que aumentam a viscosidade dos alimentos, dando uma maior sensação de saciedade (Kalač, 2016). São muito vantajosas, uma vez que tornam a digestão mais lenta, o que ajuda a baixar os níveis de colesterol e glicémia no sangue após a refeição. Um exemplo é o β -glucano, um polissacárido encontrado na parede celular dos cogumelos (Jantaramanant *et al.*, 2014). As FD insolúveis, por outro lado, aumentam o seu volume no intestino, contribuindo assim para a boa saúde do colón (Kalač, 2016; Wang *et al.*, 2014). Um exemplo é a quitina, um polissacárido estrutural da N-acetilglucosamina, presente também nas paredes celulares dos cogumelos (Kalač, 2016).

Tabela 1.3: Composição (g/100g MS) relativamente a hidratos de carbono totais e fibra dietética total, solúvel e insolúvel presentes em *Cantharellus cibarius*.

Componente	Quantidade	Referência
	31,9 g/100g MS	(Kalač, 2009)
	52,5 g/100g MS	(Beluhan e Ranogajec, 2011)
HC totais	47,0 g/100g MS	(Kumar <i>et al.</i> , 2013)
	64,9 g/100g MS	(Cheung, 2013)
FD total	34,6 g/100g MS	(Cheung, 2013)
FD solúvel	32,8 g/100g MS	(Cheung, 2013)
FD insolúvel	1,79 g/100g MS	(Cheung, 2013)

Os HC são muito vantajosos para o organismo humano, tendo várias propriedades terapêuticas já demonstradas em vários cogumelos, nomeadamente:

- Prevenção da hiperglicemia, hipercolesterolemia e hipertensão (Jantaramanant *et al.*, 2014; Vamanu, 2012);
- Atividade imunomoduladora, modulando a imunidade humoral e celular, e imunoestimulante, através da proliferação, diferenciação e maturação de células do sistema imunitário (Muszynska *et al.*, 2016; Taofiq *et al.*, 2016; Ng *et al.*, 2016);
- Atividade anticancerígena, já que demonstram inibir danos no ácido desoxirribonucleico (DNA, *Deoxyribonucleic acid*), diminuir a concentração de substâncias cancerígenas (suprimindo a sua ativação) e reduzir o desenvolvimento de células neoplásicas através da indução da apoptose (Muszynska *et al.*, 2016; Taofiq *et al.*, 2016);
- No caso do manitol, este tem metade das calorias do açúcar comercial (sacarose) e é pobremente absorvido pelo organismo humano não aumentando assim os níveis de insulina no sangue. Pode ser utilizado como agente osmótico e diurético, permitindo reduzir a pressão intracraniana, impedindo a oligúria e aumentando a passagem dos medicamentos através da barreira hematoencefálica no tratamento de doenças fatais (Saha e Racine, 2011);
- Atividade antioxidante e anti-inflamatória (Taofiq *et al.*, 2016);
- Atividade antimicrobiana, sendo considerados probióticos, isto é, estimulam o crescimento e ativação do metabolismo de bactérias benéficas do trato intestinal (Muszynska *et al.*, 2016; Taofiq *et al.*, 2016).

1.5.3. Proteínas e aminoácidos

Tal como os HC, as proteínas são vistas como um dos compostos maioritários dos cogumelos sendo, portanto, um dos maiores responsáveis pelo seu valor nutricional. *C. cibarius* não é exceção, uma vez que os valores referentes à sua quantidade de proteína podem variar entre 20 a 60% (Beluhan e Ranogajec, 2011; Muszynska *et al.*, 2016; Ouzouni *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2014) sendo esta composição dependente das condições enunciadas anteriormente.

Os cogumelos são uma ótima fonte de aa essenciais - aa que o organismo não é capaz de sintetizar mas que são necessários para a produção de proteínas, ou seja, aqueles que devem ser obtidos através da alimentação. O que permite inferir a qualidade nutricional das proteínas presentes num alimento é a razão entre os aa essenciais e os aa totais, sendo que quanto mais elevada for esta razão, maior será a qualidade (Wang *et al.*, 2014). No *C. cibarius*, segundo Jedidi *et al.* (2016) e Beluhan e Ranogajec (2011), a razão entre aa essenciais e aa totais é de 40% e 35%, respetivamente, o que nos indica ser um cogumelo rico em proteína de elevada qualidade.

Os aa detetados em quantidade considerável no *C. cibarius*, segundo vários autores, são o ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), arginina (Arg), alanina (Ala), cisteína (Cys), glicina (Gly), serina (Ser), tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe), histidina (His), isoleucina (Ile), lisina (Lys), leucina (Leu), metionina (Met), treonina (Thr), triptofano (Trp) e valina (Val), sendo estes últimos 9 considerados aa essenciais (Beluhan e Ranogajec, 2011; Jedidi *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2014). Os aa são os principais responsáveis pelo gosto característico de alguns cogumelos, assim, de acordo com as suas características gustativas, estes podem ser divididos em 4 grupos: glutamato monossódico (sabor *umami*) (Asp e Glu), aa de sabor adocicado (Ala, Gly, Ser e Thr), aa de sabor amargo (Arg, Phe, His, Ile, Leu, Met e Val) e aa insípidos (Lys e Tyr). De acordo com esta classificação, e segundo Muszynska *et al.* (2016), no *C. cibarius*, o grupo glutamato monossódico é o maioritário, constituindo cerca de 30,05 mg/g de MS. Para além dos sabores doce, amargo e *umami* enunciados anteriormente, alguns cogumelos possuem um sabor característico a carne que é atribuído à presença de nucleótidos 5', nomeadamente: adenosina 5'-monofosfato (5'AMP), citidina 5'-monofosfato (5'CMP), guanosina 5'-monofosfato (5'GMP), inosina 5'-monofosfato (5'IMP), uridina 5'-monofosfato (5'UMP) e xantosina 5'-monofosfato (5'XMP) (Kalač, 2016). O sabor *umami*, também enunciado anteriormente, que corresponde ao sabor dos glutamatos, pode ser ampliado devido

ao efeito sinérgico dos aa pertencentes ao grupo glutamato monosódico com o nucleótido 5'GMP (Muszynska *et al.*, 2016).

Para além das proteínas nutricionalmente consideradas, os cogumelos possuem algumas proteínas mais pequenas com elevado potencial farmacológico e biotecnológico, sendo as de maior interesse as lectinas, que têm capacidade de aglutinar eritrócitos, sendo importantes na defesa do organismo contra agentes patogénicos e demonstrando, em alguns cogumelos, possuírem atividade antiproliferativa, antivírica e imunomoduladora (Hassan *et al.*, 2015) e as hemolisinas, capazes de lisar eritrócitos. Para além destas, também possuem proteínas imunomoduladoras fúngicas (capazes de inativar ribossomas) e proteínas antimicrobianas (Kalač, 2016).

1.5.4. Lípidos

O teor em lípidos presente nos cogumelos é bastante inferior à quantidade de HC e proteínas, o que os torna um alimento saudável deste ponto de vista. No *C. cibarius*, este teor pode variar entre 2 a 6 g/100g de MS (Kalač, 2016; Thatoi e Singdevsachan, 2014).

Os lípidos podem ser divididos em dois grupos principais: lípidos neutros, que englobam as gorduras, ésteres de glicerol e ácidos gordos e lípidos polares, que englobam, principalmente, os fosfolípidos. Os ácidos gordos têm elevada importância fisiológica e, dos lípidos totais encontrados nos cogumelos, estes são os que estão presentes em maior quantidade. Ao todo, até hoje, mais de 40 ácidos gordos foram identificados em cogumelos, sendo os mais comuns o ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico e ácido linoleico. Este tipo de lípidos pode dividir-se em 3 grupos diferentes: Saturados (*e.g.* ácido palmítico), quando apresentam na sua estrutura química apenas ligações simples entre os átomos de carbono; Monoinsaturados (*e.g.* ácido oleico), quando na sua estrutura química apresentam apenas uma ligação dupla, naturalmente em configuração *cis*, entre átomos de carbono; Polinsaturados (*e.g.* ácido linoleico - ómega 3 e ómega 6), quando apresentam mais de uma ligação dupla, naturalmente em configuração *cis* e não conjugada, entre os átomos de carbono, sendo estes últimos os de maior interesse nutricional. Normalmente, os ácidos gordos não saturados são os mais abundantes, no entanto podem haver algumas exceções consoante o local de cultivo do cogumelo e outros fatores já enunciados anteriormente (Kalač, 2016).

Geralmente, no *C. cibarius* o teor em ácidos gordos polinsaturados é muito superior aos restantes, sendo seguidos pelos monoinsaturados e, por fim, pelos saturados. Os ácidos gordos polinsaturados são um elemento fundamental para a estrutura das membranas celulares, sendo considerados os blocos de construção da maioria dos lípidos. São capazes de manter a fluidez membranar e modular a função celular, são precursores biosintéticos dos eicosanóides (exercem controlo sobre processos de inflamação e imunidade e funcionam como mensageiros do sistema nervoso central) e de moléculas de sinalização lipídica, tais como células cardíacas, musculares e nervosas, controlando assim doenças cardiovasculares, pressão arterial e artrite. O ácido linoleico, em particular, é um precursor de abundantes produtos de oxidação que são responsáveis pelo cheiro característico dos cogumelos, principalmente quando secos. Os ácidos gordos, na sua generalidade, são também capazes de exibir atividade antifúngica, antivírica, antiparasitária e antitumoral (Kalač, 2016; Muszynska *et al.*, 2016; Ribeiro *et al.*, 2009).

Os fosfolípidos são moléculas anfifílicas, que possuem uma cabeça constituída por um grupo fosfato - polar ou hidrofílico (tem afinidade para a água) - e uma cauda constituída por cadeias de ácidos gordos - apolar ou hidrofóbica (repele a água) -, característica esta que é fundamental para estabelecer uma interface entre o meio intracelular e o meio extracelular (Figura 1.9). Dispõem-se em bicamada lipídica (acoplamento de fosfolípidos), sendo encontrados em todas as membranas celulares, quer animais quer vegetais, estando assim presentes numa grande quantidade dos alimentos que ingerimos diariamente, tais como ovos, carne, peixe, marisco, cereais, oleaginosas e cogumelos (García e Agüero, 2015).

Estima-se que a ingestão diária de fosfolípidos seja cerca de 2 a 8 g, o que demonstra ser cerca de 1 a 10 % da ingestão total de lípidos recomendada (Cohn *et al.*, 2010). Até ao momento, são vários os estudos que têm demonstrado a eficácia fisiológica dos fosfolípidos no que respeita ao desenvolvimento de processos inflamatórios, à formação de tumores e desenvolvimento de metástases, à redução dos níveis plasmáticos de colesterol total (principalmente em doenças como a diabetes ou como a hiperlipidemia primária), à sua extrema importância na integridade e funcionalidade das membranas neuronais e à sua capacidade antioxidante (García e Agüero, 2015).

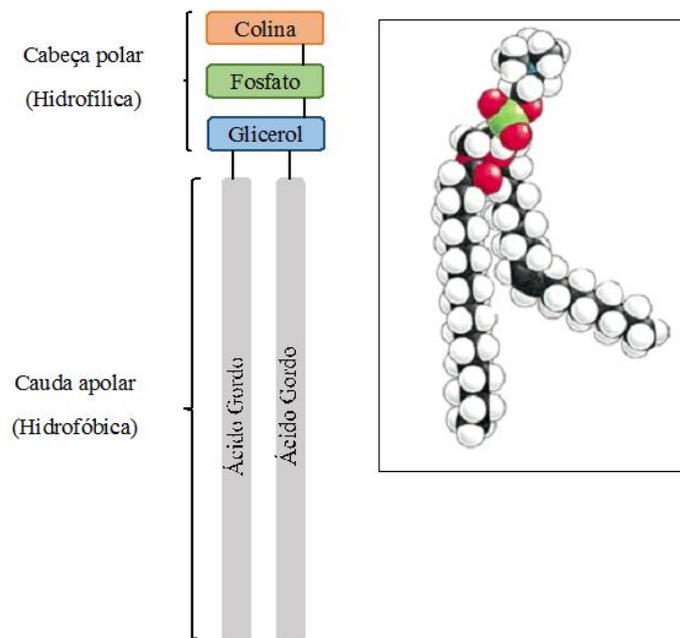


Figura 1.9: Representação esquemática de um fosfolípido com respectiva representação 3D. Um fosfolípido é constituído por uma cabeça polar (hidrofílica) formada por colina, fosfato e glicerol e uma cauda apolar (hidrofóbica), composta por duas cadeias de ácidos gordos. Adaptado de Alberts *et al.*, 2008.

1.5.5. Ácidos nucleicos

Do ponto de vista químico, um ácido nucleico é um polímero, formado por unidades simples (monómeros), neste caso designados por nucleótidos, que se ligam entre si por ligações fosfodiéster. Cada nucleótido é composto por uma pentose - no caso do DNA, a desoxirribose e no caso do RNA (RNA, *Ribonucleic acid*), a ribose -, uma base azotada e um grupo fosfato.

Existem várias classes de RNAs que possuem diferentes características e funções a nível estrutural, de regulação, de processamento e de modificação de outros RNAs (Azevedo e Sunkel, 2012; Hall, 2010): RNA mensageiro (**mRNA**) - armazena a informação genética presente nos genes e transporta-a para o citoplasma onde irá ser traduzida em proteínas; RNA de transferência (**tRNA**) - transporta um aa específico para a cadeia polipeptídica da proteína que está a ser sintetizada durante a tradução; RNA ribossómico (**rRNA**) - descodifica e transfere a informação contida no mRNA para aa, interagindo com determinadas regiões do mRNA e tRNA; Pequenos RNA nucleares (**snRNA**, *small nuclear RNA*) - apresentam determinadas funções de processamento relativamente ao mRNA, como por exemplo funções de *splicing* (processo de remoção de intrões e conseqüente junção de exões após a transcrição do DNA em

RNA); Pequenos RNA nucleolares (**snoRNA**, *small nucleolar RNA*) - têm função na biossíntese e modificação do rRNA; RNA reguladores, dos quais fazem parte o micro RNA (**miRNA**) e o pequeno RNA de interferência (**siRNA**, *small interfering RNA*) cuja função é o silenciamento genético através da degradação do mRNA ou inibição da sua tradução.

Os estudos relacionados com o material genético presente nos cogumelos e os seus possíveis efeitos biológicos, nomeadamente no cancro, são escassos. Em 2013, Lemieszek *et al.* verificaram que uma fração isolada do cogumelo *Boletus edulis* inibia o crescimento da linha celular LS180 do adenocarcinoma do cólon, sem ter qualquer efeito negativo em células do cólon saudáveis. Mais tarde, em 2016, Lemieszek *et al.* demonstraram que essa fração continha RNA.

1.6. Efeitos terapêuticos estudados no *Cantharellus cibarius*

Os estudos relacionados com as propriedades terapêuticas especificamente relacionadas com o cogumelo *C. cibarius* são escassos, sendo que a maioria das investigações realizadas não se foca apenas em um dos seus constituintes químicos, como foi referido anteriormente, mas sim em extratos, analisando-os como um todo. Os extratos mais estudados são os extratos aquoso e metanólico.

Uma das principais ações benéficas de *C. cibarius* é a sua atividade antimicrobiana já estudada por vários autores. Kolundžić *et al.* estudaram, em 2017, a atividade antimicrobiana de quatro extratos isolados de *C. cibarius* (água, metanol, cicloexano e diclorometano). Esta atividade antimicrobiana foi testada em vários laboratórios contra vários tipos de bactérias, - *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella abony* -, sendo identificada a concentração mínima inibitória para cada um dos extratos, percebendo assim qual o mais eficaz. Todos os quatro extratos apresentaram uma atividade moderada contra todos os tipos de bactérias, no entanto, o que mais se destacou foi o extrato de diclorometano que apresentou uma atividade muito elevada contra *S. aureus*. Já anteriormente, em 2015, Kozarski *et al.* tinham também testado a atividade antimicrobiana do extrato metanólico isolado de *C. cibarius* contra quatro bactérias gram-positivas – *S. aureus*, *E. faecalis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* - e cinco bactérias gram-negativas – *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Yersinia enterocolitica* – concluindo que, no geral, as bactérias gram-positivas apresentaram uma maior sensibilidade ao extrato testado. Para além

disso, este extrato metanólico apresentou uma atividade significativamente mais elevada do que os antibióticos comerciais gentamicina e tetraciclina, confirmando ainda mais a potência antimicrobiana de *C. cibarius*.

Outro estudo realizado, principalmente relacionado com o extrato metanólico, de modo a determinar a possível atividade antitumoral do mesmo, é o ensaio citotóxico. Este tipo de ensaio é realizado em linhas celulares tumorais, nomeadamente células do carcinoma cervical humano (HeLa), células do carcinoma gástrico humano (NCI-N87), células do fibroblastoma embrionário humano (MRC-5) (Kolundžić *et al.*, 2017), células de carcinoma da mama (MDA-MB453) e células epiteliais bronquiais do pulmão humano (BEAS-2B), sendo que o extrato metanólico demonstra elevada atividade antitumoral contra estas linhas (Kozarski *et al.*, 2015). Kozarski *et al.* demonstraram que o extrato metanólico isolado de *C. cibarius* apresenta uma elevada capacidade quelante de iões Ferro (Fe^{2+}) e, uma vez que as células tumorais contêm teor em Fe^{2+} superior aos tecidos normais, espera-se que o tratamento de células cancerígenas com o extrato metanólico do *C. cibarius* induza a apoptose.

O extrato aquoso do *C. cibarius* apresentou elevada atividade contra danos induzidos pelo metanossulfonato de metila em células mononucleares humanas, na medida em que reduziu significativamente os danos provocados pelo mesmo no DNA (Méndez-Espinoza *et al.*, 2013). *C. cibarius* tem-se mostrado também eficaz no controlo da pressão arterial, uma vez que demonstra inibir a enzima conversora da angiotensina (ACE, *Angiotensin-converting enzyme*). A ACE é uma enzima pertencente ao sistema renina-angiotensina-aldosterona, cuja função chave é a regulação da pressão arterial e do equilíbrio eletrolítico do organismo. A renina é uma enzima circulante que é responsável pela conversão do angiotensinogénio, uma substância libertada pelo fígado, em angiotensina I. A ACE é depois responsável por converter a angiotensina I em angiotensina II que funciona como vasoconstritor, aumentando a pressão arterial. Assim, em casos de pressão arterial elevada, é necessário utilizar um agente anti-hipertensivo, ou seja, inibidor da ACE, muito utilizado clinicamente. Tanto o extrato aquoso como o extrato metanólico demonstraram ter esta função (Kolundžić *et al.*, 2017; Kozarski *et al.*, 2015).

Em outro estudo, relativamente ao extrato de N-hexano do *C. cibarius*, notou-se que este é capaz de inibir o fator nuclear kB (NF-kB). O NF-kB é um fator de transcrição que está envolvido na resposta celular a estímulos tais como o stresse, os radicais livres, a radiação UV, os antígenos virais e bacterianos e que desempenha uma função fundamental nas respostas

imunitária e inflamatória. A via NF- κ B é então considerada a via de resposta ao stress oxidativo primário. Para que ocorra a ativação desta via, é necessário que o NF- κ B seja translocado do citoplasma para o núcleo. Acontece que metabolitos isolados do extrato de *N-hexano* são capazes de inibir a ativação do NF- κ B através da inibição da sua translocação do citoplasma para o núcleo (Kim *et al.*, 2008). Uma vez que, em muitos tipos de cancro, o fator NF- κ B está ativado de forma aberrante, promovendo a sobrevivência e malignidade das células tumorais (Tornatore *et al.*, 2014), o *C. cibarius* poder-se-á tornar importante neste sentido.

Para além das propriedades terapêuticas já referidas, sabe-se também que o extrato metanólico de *C. cibarius* possui uma forte atividade anti-hipóxia (Khalili *et al.*, 2014) e antioxidante (Ebrahimzadeh *et al.*, 2010).

1.7. Biologia celular e molecular do cancro

O ciclo celular das células somáticas adultas é composto por quatro fases sequenciais: G0/G1, S, G2 e M (Figura 1.10). A fase G1 é a fase mais longa do ciclo onde ocorre crescimento celular e onde a célula poderá despende mais tempo até ser sinalizada para entrar em ciclo celular. A fase S é uma das mais importantes, onde ocorre a replicação do DNA. A fase G2 é o intervalo após a fase S, quando a célula se prepara para entrar em mitose (fase M) e originar a divisão da célula em duas células filhas geneticamente iguais (Williams e Stoeber, 2012).

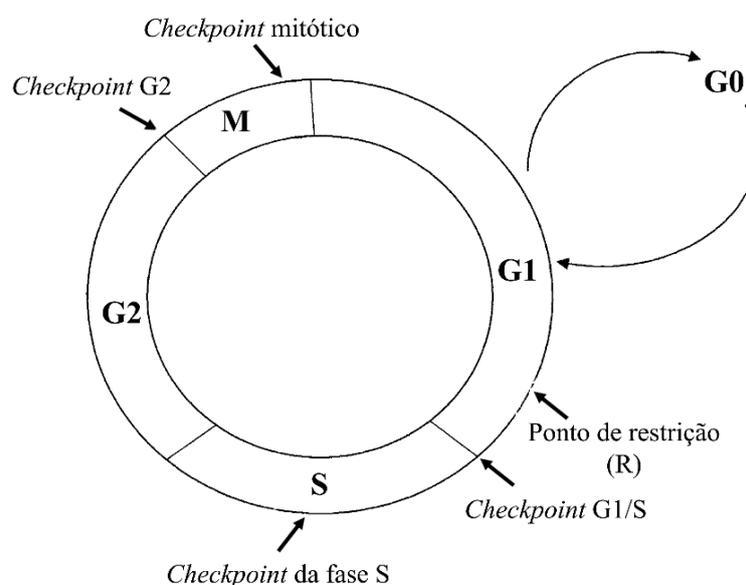


Figura 1.10: Ciclo celular e checkpoints. Esquema que engloba as principais fases constituintes do ciclo celular mitótico: G0, G1, S, G2 e M (mitose) assim como os principais pontos de controlo: ponto de restrição (R), checkpoint G1/S, checkpoint da fase S, checkpoint G2 e checkpoint mitótico. Adaptado de Garrett, 2001.

A progressão através do ciclo celular é levada a cabo por dois tipos de proteínas: as ciclinas e as cinases dependentes de ciclina (CDK, *Cyclin-Dependent Kinases*). As CDK são componentes do mecanismo do ciclo celular com atividade catalítica que regulam a atividade de outras proteínas por fosforilação. No entanto, a atividade de fosforilação das CDK depende da presença de ciclinas, ou seja, as ciclinas possibilitam que as CDK desempenhem a sua função pela formação de complexos ciclina/CDK. Na ausência de ciclinas, esses complexos não se formam e as CDK ficam inativas, assim, o bom funcionamento do ciclo celular requer a formação e a degradação alternadas de complexos ciclina/CDK (Snustad e Simmons, 2011; Williams e Stoeber, 2012).

Ao longo do ciclo celular existem vários pontos de verificação denominados de *checkpoint* (Figura 1.10), que têm como função sinalizar negativamente a célula quando ocorre algum tipo de erro ou dano. No ponto de restrição (R), localizado no final da fase G1, a célula recebe sinais externos para entrar em ciclo celular. Nesta altura existe um *checkpoint* de danos de DNA com proteínas inibidoras que bloqueiam o complexo ciclina D/CDK e impedem o início da fase S. A desregulação dos *checkpoints*, geralmente causada por defeitos genéticos no mecanismo alternado de formação e degradação de complexos ciclina/CDK, está subjacente à proliferação celular descontrolada promovendo assim a instabilidade genética e estando associada à proliferação descontrolada de células tumorais (Snustad e Simmons, 2011; Williams e Stoeber, 2012).

Muitos tipos de cancro são decorrentes da sobreexpressão de alguns genes (oncogenes), e outros tipos envolvem a inativação de genes (genes supressores de tumores); ambos estes tipos de genes críticos estão envolvidos em funções importantes na regulação da atividade bioquímica da célula - incluindo atividades relacionadas com a divisão celular, sinalização celular ou apoptose (Snustad e Simmons, 2011). Assim, o cancro é visto como uma doença de desregulação genética, na qual ocorrem mutações em oncogenes e genes supressores de tumores que se vão acumulando, levando à proliferação celular descontrolada e originando, posteriormente, metástases (Forrest e Khalil, 2017). O processo de metastização é a principal causa de morte relacionada com esta doença e é definido como sendo a propagação e crescimento descontrolado de um tumor em novos locais do organismo, ou seja, é um processo complexo constituído por várias fases (Figura 1.11) no qual a cascata metastática se inicia com o desprendimento de um pequeno subconjunto de células cancerígenas provenientes do tumor primário, migra através do sistema circulatório e invade os tecidos vizinhos por intravasamento,

sai da circulação por extravasamento e se coloniza, formando o tumor secundário num novo local do organismo (Jafari *et al.*, 2017; Michor *et al.*, 2006).

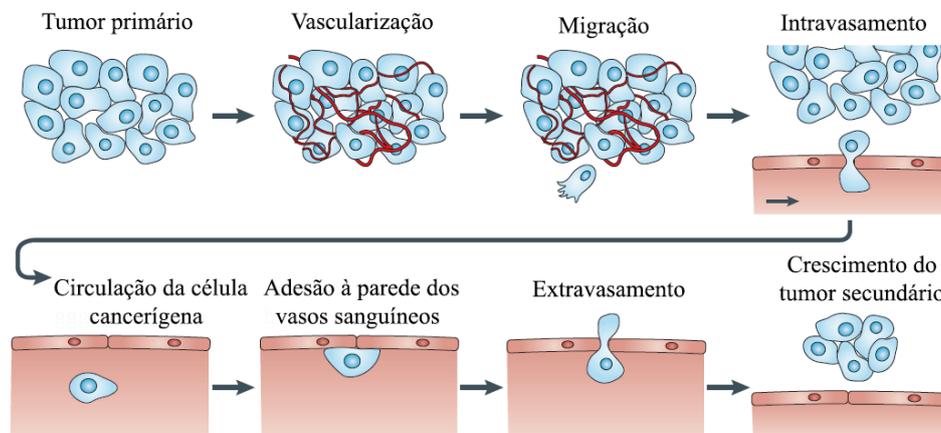


Figura 1.11: Processo de metastização de um tumor primário até ao crescimento do tumor secundário num novo local do organismo. Ilustra o processo inicial de crescimento da massa tumoral, no qual ocorre um despreendimento de um conjunto de células cancerígenas provenientes de um tumor primário. As células tumorais invadem o estroma, seguida de intravasão, circulação e extravasação do sistema circulatório sanguíneo. A cascata termina com a colonização e formação de metástases na nova localização. Adaptado de Wirtz *et al.*, 2011.

1.8. A importância das linhas celulares tumorais no estudo do cancro

O cancro é uma das doenças com maior índice de mortalidade e morbidade em todo o mundo. A existência de vários tipos de tumores com diferentes histopatologias, variações genéticas, epigenéticas e diferentes resultados clínicos, dificulta em grande parte a sua compreensão, os mecanismos de ação dos quimioterápicos utilizados para o seu tratamento e a criação de novas terapias (Ferreira *et al.*, 2013).

Atualmente, uma grande variedade de testes *in vitro* são utilizados no estudo desta patologia de modo a compreender as várias funções das células cancerígenas e a encontrar a terapia adequada para cada tipo de cancro. No que se refere ao teste de novas terapias farmacológicas, os testes *in vitro* são os primeiros a ser utilizados de modo a perceber se esse novo fármaco será ou não eficaz contra as células cancerígenas, provocando a sua morte (Fares e Jensen, 2016).

O modelo atualmente mais utilizado para o estudo dos mecanismos moleculares das doenças oncológicas são as linhas celulares derivadas de tumores (Goodspeed *et al.*, 2016), que tal como o nome indica foram isoladas a partir de determinados tipos de cancro e são predominantemente utilizadas em estudos *in vitro*, sob condições padrão de cultura de células

(Hernandez *et al.*, 2016), sendo os resultados obtidos, geralmente, extrapolados para tumores humanos *in vivo* (Ferreira *et al.*, 2013).

As linhas celulares tumorais têm sido largamente utilizadas para os mais diversos projetos de investigação científica, sendo extremamente utilizadas para estudos farmacogenómicos (estudo do papel da variação genética hereditária e adquirida na resposta ao fármaco) de modo a perceber a ação de um determinado fármaco contra um determinado tipo de cancro e auxiliar na compreensão da variação da resposta do paciente (Goodspeed *et al.*, 2016; Niu e Wang, 2015). Para além disso, a utilização de linhas celulares tumorais permite o aumento da informação relativamente a genes desregulados e a vias de sinalização envolvidas no processo tumoral, das mutações epigenéticas e celulares envolvidas na proliferação celular, na progressão do cancro e apoptose e permitem também definir potenciais biomarcadores moleculares do cancro (Ferreira *et al.*, 2013).

Alguns exemplos das linhas celulares mais utilizadas em investigação podem ser observados na Tabela 1.4.

Tabela 1.4: Exemplos de linhas celulares tumorais largamente utilizadas em investigação. Adaptado de Ferreira *et al.*, 2013 e Verhoeckx *et al.*, 2015.

Linha celular tumoral	Espécie	Tipo de cancro	Morfologia
HeLa	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma do cérvix	Epitelial
Caco-2	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma colorretal	Epitelial
MCF-7	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma da mama	Epitelial
HT-29	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma do cólon	Epitelial
A549	<i>Homo sapiens</i>	Carcinoma pulmonar	Epitelial
HEP-G2	<i>Homo sapiens</i>	Carcinoma hepatocelular	Epitelial
PC3	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma da próstata	Epitelial
K-562	<i>Homo sapiens</i>	Leucemia mieloide crónica	Linfoblasto

A utilização de linhas celulares tumorais tem assim imensas vantagens das quais se destacam:

- Representam um recurso renovável, pois são uma fonte autorreplicativa ilimitada, em linhas celulares contínuas (Ferreira *et al.*, 2013) e são utilizadas em vastas áreas: genómica, epigenómica, transcriptómica, proteómica e metabolómica (Niu e Wang, 2015);

- São sistemas bem controlados e muitos dos fenótipos observáveis (*e.g.* citotoxicidade, taxa de crescimento, alteração da expressão génica, metabolitos intracelulares) podem ser medidos para qualquer fármaco ou combinação de fármacos com menos fatores de confusão do que os que são encontrados nas amostras clínicas que apresentam maior heterogeneidade de tipos de linhagens celulares (Niu e Wang, 2015);
- Uma grande quantidade de dados moleculares estão disponíveis publicamente, o que torna estes modelos extremamente valiosos para os laboratórios em todo o mundo (Ferreira *et al.*, 2013; Niu e Wang, 2015);
- São fáceis de manusear e manipular, na medida em que podem ser manipuladas genética e epigeneticamente (usando agentes de desmetilação, siRNA, vetores de expressão) e farmacologicamente (usando citostáticos) (Ferreira *et al.*, 2013);
- Possuem elevada homogeneidade, na medida em que permitem a análise de uma população homogénea de células tumorais. No entanto, esta homogeneidade pode ser vista como uma desvantagem devido à heterogeneidade natural do tumor; apesar disso, isto pode ser facilmente ultrapassado através da utilização de um painel de linhas celulares tumorais representativas da heterogeneidade observada nos tumores primários (Ferreira *et al.*, 2013);
- Elevado grau de similaridade com o tumor inicial (Ferreira *et al.*, 2013);
- Grande número e variedade de linhas celulares tumorais disponíveis (Ferreira *et al.*, 2013).

Apesar de todas as vantagens inerentes à utilização de linhas celulares tumorais também existem algumas desvantagens observáveis:

- Instabilidade genómica que pode causar diferenças entre o tumor original e a respetiva linha celular (Ferreira *et al.*, 2013);
- As condições de cultura podem mudar a morfologia, a expressão génica e várias vias celulares (Ferreira *et al.*, 2013; Niu e Wang, 2015; Wilding e Bodmer, 2014);
- Infecções com micoplasma podem alterar as propriedades da cultura (Ferreira *et al.*, 2013);
- Dificuldade no estabelecimento de linhas celulares tumorais de longo termo de certos tipos de tumores (Ferreira *et al.*, 2013);
- O ambiente de cultura celular é diferente do tumor original (Ferreira *et al.*, 2013; Wilding e Bodmer, 2014);
- Perda da heterogeneidade natural do tumor (Ferreira *et al.*, 2013; Wilding e Bodmer, 2014);
- O microambiente (Wilding e Bodmer, 2014) e os efeitos farmacocinéticos do fármaco na resposta clínica não são possíveis de avaliar (Niu e Wang, 2015).

Apesar de os modelos de linhas celulares serem bastantes úteis, os resultados obtidos relacionados com os fenótipos de resposta a um determinado medicamento ainda necessitam de ser, posteriormente, confirmados recorrendo, por exemplo, a amostras clínicas, pois a resposta do paciente ao tratamento anticancerígeno varia amplamente devido ao fundo genético do mesmo (linha germinal e variação genética somática). Assim, modelos futuros poderão incluir o uso de células estaminais pluripotentes induzíveis para o paciente e a incorporação de culturas tridimensionais (3D) que poderão assim otimizar ainda mais os modelos celulares e melhorar a sua validade preditiva (Niu e Wang, 2015).

1.9. RNAs não codificantes: Qual o seu papel no cancro?

O cancro representa uma doença complexa e multifatorial, cuja origem está na alteração de vários genes que, por sua vez, levam a distúrbios em importantes vias de sinalização envolvidas na biologia do processo tumoral, favorecendo a heterogeneidade celular que é responsável pela enorme adaptabilidade e resistência farmacológica das células tumorais (Beltrán-Anaya *et al.*, 2016).

Recentemente, tecnologias de genética molecular e celular e tecnologias de sequenciação combinadas com ferramentas bioinformáticas permitiram a identificação de RNAs não codificantes (ncRNA) levando a um incremento da investigação relativa à sua função na regulação, o que está, conseqüentemente, implicado no desenvolvimento de determinadas doenças (Gomes *et al.*, 2017) mostrando assim que o modo de atuação destes ncRNAs é muito mais complexo do que se pensava (Ferreira, 2009) o que pode resultar num avanço significativo relativamente à descoberta de novas opções terapêuticas (Gomes *et al.*, 2017).

Os ncRNAs são transcritos de RNA que não são traduzidos em proteínas e podem ser divididos em *housekeeping* ncRNAs, que incluem o tRNA e o rRNA, e ncRNA reguladores, que, por sua vez, se dividem em dois grupos principais com base no seu tamanho: longos RNAs não codificantes (lncRNA, *long non coding RNA*), que compreendem mais de 200 nucleótidos (nt) de comprimento, e pequenos RNAs não codificantes (sncRNA, *small non coding RNA*) (*e.g.* siRNA, miRNA, snoRNA, snRNA), constituídos por menos de 200 nt de comprimento (Chen *et al.*, 2017; Gomes *et al.*, 2017; Kaushik e Kaushik, 2016). Evidências crescentes sugerem que ambos os grupos de ncRNAs reguladores desempenham funções importantes no desenvolvimento, progressão e patologia do cancro (Li e Chen, 2015).

O processo de regulação por ncRNAs reguladores exógenos ainda não está definido na literatura, havendo portanto pouquíssimos estudos referentes a esta matéria. No entanto, evidências crescentes têm demonstrado que os ncRNAs reguladores endógenos desempenham funções fundamentais em vários processos biológicos, incluindo a proliferação celular (Zhao *et al.*, 2010), a regulação da expressão gênica (desempenhando uma função importante na patogênese e na progressão de muitas doenças humanas, incluindo o cancro, ao regular os seus genes alvo) e a supressão da tumorigênese e da progressão do cancro induzindo apoptose, bloqueando o ciclo celular e inibindo células cancerígenas, metástases e/ou a angiogênese (Hong *et al.*, 2015). Assim, vários estudos têm indicado que os ncRNAs reguladores endógenos podem interferir no ciclo celular funcionando como supressores de tumores e/ou oncogenes (Ferreira, 2009; Pickard *et al.*, 2013). Os ncRNAs oncogénicos, muitas vezes sobreexpressos no cancro, podem atuar para facilitar a entrada e a progressão através do ciclo celular, enquanto que os ncRNAs supressores de tumores auxiliam a indução da paragem do ciclo celular (Inamura, 2017; Jansson e Lund, 2012).

Apesar de ainda não ser conhecido o mecanismo de ação subjacente aos ncRNAs exogenamente introduzidos num determinado organismo, alguns trabalhos têm surgido. Nomeadamente em relação aos miRNAs (pertencentes à classe dos sncRNAs), estes parecem competir com os miRNAs endógenos existentes nas células humanas, tendo como resultado a regulação dos mRNAs, mecanismo este que permanece sob investigação. Esta competição mostra ter um importante papel nos processos celulares biológicos, nomeadamente os relacionados com o processo tumoral (Kim *et al.*, 2014; Nagata *et al.*, 2013).

As funções dos ncRNAs reguladores no cancro estão a ser decifrados, assim o seu potencial como marcadores de prognóstico e/ou diagnóstico tem sido cada vez mais evidenciado. Além disso, estratégias terapêuticas envolvendo a inibição de ncRNAs sobreexpressos ligados a processos tumorigénicos e a reintrodução de ncRNAs com função supressora de tumores têm sido cada vez mais desenvolvidas. Deste modo, os ncRNAs têm emergido como uma importante família de moléculas com perspectivas bastante promissoras para a terapia do cancro (Inamura, 2017; Jansson e Lund, 2012)

Capítulo 2

Enquadramento e objetivos

Capítulo 2: Enquadramento e objetivos

O *Cantharellus cibarius* é um cogumelo comestível de amplo consumo devido às suas propriedades sensoriais. Estudos prévios demonstraram que este cogumelo apresenta uma elevada atividade antiproliferativa contra várias linhas celulares cancerígenas. Posteriormente, através do estudo do material solúvel em água de alto peso molecular concluiu-se que uma das frações isoladas por cromatografia de troca aniônica era constituída, maioritariamente, por ácido ribonucleico (RNA) sendo este o principal componente responsável pela atividade antiproliferativa observada.

Assim, este trabalho teve como principais objetivos:

1. Isolamento da fração de RNA reveladora de capacidade antitumoral;
2. Caracterização química da fração acima referida, incluindo análise de açúcares e fosfolípidos;
3. Determinação da sequência de nucleótidos constituintes do RNA em estudo;
4. Estudos preliminares da sua potencial ação nas células.

Capítulo 3

Material e métodos

Capítulo 3: Material e métodos

✓ Neste capítulo serão descritos, de forma pormenorizada, todos os procedimentos realizados ao longo da realização desta dissertação. O procedimento referente a cada uma das técnicas utilizadas será antecedido por uma pequena introdução que tem por objetivo fornecer uma breve contextualização teórica ao material e métodos utilizados facilitando, deste modo, a posterior interpretação dos resultados obtidos e tornando este trabalho acessível a todos os interessados mesmo que externos à área em causa.

3.1. Cogumelo em estudo

Para a realização da presente dissertação foram utilizadas 766,26 g de cogumelos da espécie *Cantharellus cibarius*, adquiridos em Vila Real, Portugal, no decorrer do mês de Abril de 2016. De modo a preservar o material até ao início do trabalho, os cogumelos foram liofilizados num liofilizador (*DuraDry MP*), obtendo-se assim uma massa final de 90,62 g.

3.2. Isolamento, extração e purificação de biopolímeros

Os biopolímeros são descritos na literatura como polímeros/macromoléculas produzidos por organismos vivos (Chassenieux *et al.*, 2013; McNaught e Wilkinson, 2014) que se dividem em três classes principais: proteínas (constituídas por cadeias de aa), polissacarídeos (constituídos por unidades repetidas de açúcares) e ácidos nucleicos (DNA e RNA) (formados por nucleótidos) (Chassenieux *et al.*, 2013; Williams, 2011). Estes biopolímeros, quando ingeridos, têm várias funcionalidades benéficas no organismo, como visto no capítulo 1.

A diálise, utilizada no **Protocolo 1**, é um processo muito utilizado em vários campos da ciência, nomeadamente na química e na saúde, que se baseia no transporte seletivo de moléculas ou partículas de diferentes tamanhos através de uma membrana semipermeável. Esta membrana possui poros, sendo que estes permitem a passagem de moléculas até determinado tamanho. As substâncias deslocam-se da solução de maior concentração para a de menor concentração (solução circulante – água destilada ou tampão próprio) sendo que as moléculas com tamanho superior aos poros da membrana não são capazes de ultrapassar esta barreira. O ponto final da diálise é atingido quando se estabelece um equilíbrio de concentração entre os dois meios. Devido a ser um método rápido, fácil e de não requerer grande quantidade de material e

soluções, é cada vez mais utilizado com objetivo de dessalinização de proteínas ou outras substâncias, renaturação/desnaturação de proteínas, fracionamento e caracterização de nanopartículas, remoção de substâncias que podem prejudicar estudos posteriores e aumento da concentração de amostras (Scienova, 2013).

A cromatografia de troca iónica, utilizada no **Protocolo 2**, permite a separação de biomoléculas com base na sua carga (positiva ou negativa) utilizando para tal uma coluna contendo uma resina como fase estacionária que pode ser aniónica (aprisiona biomoléculas com carga positiva) ou catiónica (aprisiona biomoléculas com carga negativa). Na presente dissertação, realizou-se a cromatografia de troca aniónica (uso de resina catiónica) uma vez que a molécula de principal interesse é o RNA, uma molécula carregada negativamente que será assim atraída para a fase estacionária carregada positivamente (Healthcare, 2016).

Protocolo 1: Extração e isolamento de biopolímeros (Lemieszek *et al.*, 2013)

1. Liofilizaram-se as 766,26 g de cogumelos *C. cibarius* frescos, obtendo-se assim uma massa final de 90,62 g de cogumelos secos;
2. Com a ajuda de um moinho, trituraram-se as 90,62 g liofilizadas até à obtenção um pó fino;

Obtenção do resíduo insolúvel em álcool (AIR, *Alcohol Insoluble Residue*)

3. Em 700 mL de álcool a 80% (volume por volume (v/v)), ferveu-se (80°C) o triturado durante 1h, com agitação;
4. O material insolúvel nestas condições foi filtrado a vácuo e seco na estufa (*Binder*) a 50°C durante aproximadamente 17h, obtendo-se uma massa total de 67,59 g de AIR;

Obtenção do material solúvel em água (WSM, *Water Soluble Material*)

5. A totalidade do AIR obtido anteriormente foi fervido (100°C) em 700 mL de água destilada durante 1h, com agitação;
6. O material insolúvel nestas condições foi separado por filtração a vácuo e o WSM foi recolhido;
7. Posteriormente, o WSM foi congelado e liofilizado, obtendo-se assim uma massa final de 18,13 g, das quais se retiraram 1,3 g para possíveis análises posteriores.;

Obtenção do material de elevado peso molecular (HMWM, *High Molecular Weight Material*)

8. O WSM (16,83 g) foi ressuspenso em 50 mL de água destilada e dialisado (*MW cutoff 12-14 kDa, Medical, UK*) durante 4 dias efetuando-se duas mudanças de água por dia;
9. O material foi congelado e liofilizado, obtendo-se 1,77 g de HMWM.

Protocolo 2: Purificação/fracionamento de biopolímeros (Lemieszek *et al.*, 2013)

Para a purificação dos biopolímeros, o HMWM foi submetido a cromatografia de troca aniônica (HPLC *Ultimate 3000*) utilizando a *Q-Sepharose FF* como fase estacionária, colocada numa coluna XK16/20 (*Pharmacia*). A deteção foi realizada por UV sendo utilizado um comprimento de onda de 257 nm.

1. A coluna foi limpa convenientemente com 500 mL de hidróxido de sódio (NaOH) a 1 M e com água destilada durante a noite sendo, de seguida, equilibrada com tampão inicial de acetato de sódio ($C_2H_3NaO_2$) 5 mM a pH 5, contendo 3 M de ureia (CH_4N_2O) e 0,02% de azida de sódio (NaN_3);
2. Em 50 mL de tampão inicial, dissolveram-se 800 mg de HMWM;
3. A solução resultante foi sujeita a 5 ciclos de 5 minutos de banho (*Stuart RE300DB*) a 60°C e 5 minutos de ultrassons (*Bandelin Sonorex*), seguida de duas centrifugações a 1000 rotações por minuto (rpm) (*Sigma 3-30K*), durante 10 minutos a 4°C, de modo a remover o material insolúvel nestas condições;
4. O sobrenadante foi recolhido e carregado na coluna aplicando um fluxo de 0,1 mL/min;
5. A coluna foi lavada com o tampão inicial com um volume correspondente a 4 vezes o volume da mesma;
6. O material não retido (5 mL/fração, com tempo de recolha de 50 minutos) foi recuperado;
7. O material retido na coluna foi eluído através de um gradiente de eluição de cloreto de sódio (NaCl), utilizando um tampão de ácido acético (CH_3COOH) 5 mM a pH 5 contendo 3 M de ureia, 0,02% de NaN_3 e 2 M de NaCl com um fluxo de 0,25 mL/min durante aproximadamente 25h (tempo de recolha de, aproximadamente, 14.28 minutos), até a concentração de NaCl atingir os 2 M. As frações obtidas (3,75 mL/fração) foram recuperadas;

8. Recorrendo ao método do ácido fenol-sulfúrico (**Protocolo 3**), foi analisada a presença de açúcares em todas as frações recolhidas (retidas e não retidas);
9. As frações obtidas foram juntas, de forma apropriada, em três frações principais: CC1 (material não retido na coluna), CC2 e CC3 (material retido na coluna);
10. Procedeu-se à diálise das três frações principais enunciadas anteriormente (*MW cutoff 12-14 kDa, MediceL, UK*) durante 4 dias com mudança de água duas vezes por dia;
11. As frações foram congeladas e liofilizadas, obtendo-se, no total, uma massa de 170 mg para a fração CC1, 163 mg para a fração CC2 e 118 mg para a fração CC3. Esta última fração foi analisada por eletroforese em gel de agarose e NanoDrop de modo a quantificar e analisar o RNA presente na mesma (**Protocolo 6**).

Na Figura 3.1, pode ser observado o procedimento, esquematizado, do isolamento, extração e purificação de biopolímeros (**Protocolos 1 e 2**, respetivamente) de *C. Cibarius*:

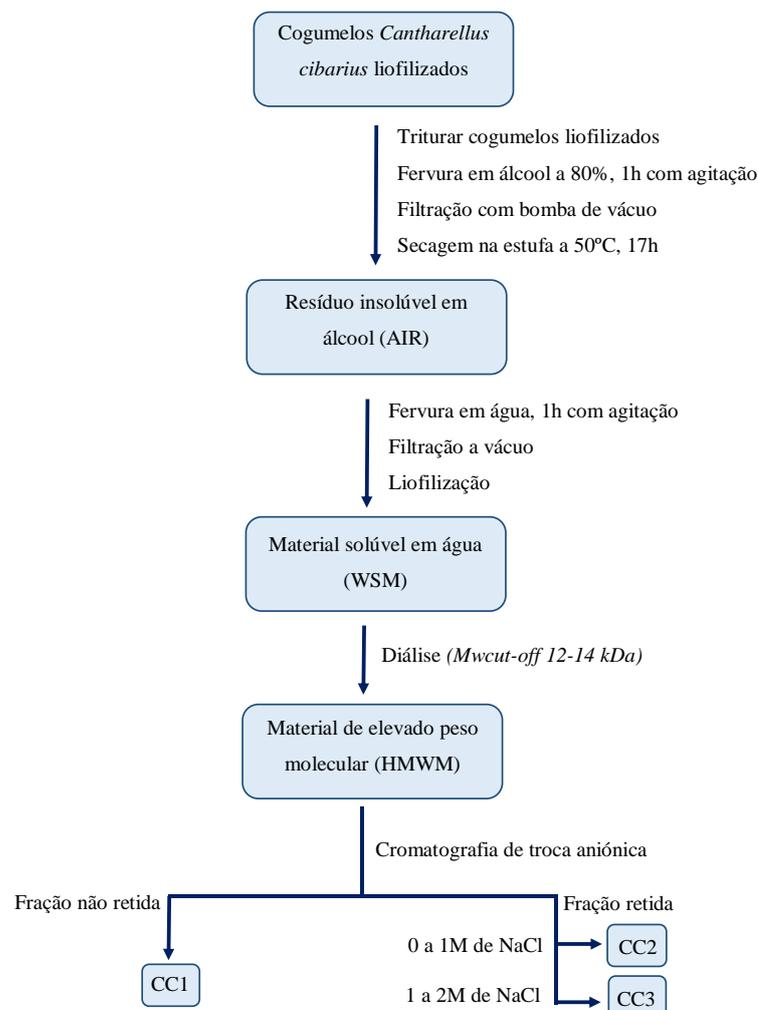


Figura 3.1: Esquema resumo dos procedimentos de isolamento, extração e purificação de biopolímeros isolados de *Cantharellus cibarius*. Adaptado de Lemieszek *et al.*, 2013.

3.3. Caracterização química das frações

O WSM, o HMWM e as três frações purificadas a partir deste último foram submetidas a uma análise da sua composição em açúcares. A fração CC3, mais especificamente, foi submetida a uma análise FTIR, análise da sua composição em ácidos gordos e pesquisa do seu teor em fosfolípidos. O cogumelo em estudo apresentou ter uma elevada atividade antitumoral.

3.3.1. Determinação colorimétrica dos açúcares totais

Descrito por Dubois *et al.*, em 1956, o método do ácido fenol-sulfúrico é um método colorimétrico, simples e rápido, que permite a determinação dos açúcares totais de uma amostra. Devido à presença do ácido sulfúrico (H_2SO_4), a amostra adquire temperatura e acidez elevadas, levando à desidratação de pentoses e hexoses, originando assim furfural e 5-hidroximetilfurfural, respetivamente. Na presença do fenol, estes compostos anteriormente formados, dão origem, por condensação, a cromóforos de cor amarelo-alaranjado que são estáveis durante várias horas e que são proporcionais à quantidade de açúcares presentes na amostra (Dubois *et al.*, 1956; Nielsen, 2010).

Protocolo 3: Método do ácido fenol-sulfúrico

1. A cada tudo de ensaio foram adicionados 25 μ L da amostra a analisar (frações recolhidas anteriormente);
2. Adicionaram-se 200 μ L de fenol a 5% (peso por volume (p/v));
3. Por fim, adicionou-se 1 mL de H_2SO_4 concentrado, tendo especial atenção na adição deste último reagente, que deve ser colocado diretamente sobre a solução (não deve escorrer pelas paredes do tubo) e de forma rápida;
4. A solução obtida foi deixada em repouso 30 minutos ao fim dos quais se agitou e se deixou a repousar, novamente, por mais 30 minutos;
5. A absorvância das amostras foi lida a 490 nm (*PerkinElmer – Lambda 25*), numa célula de plástico com 1 mL de capacidade e um percurso ótico de 1 cm.

3.3.2. Determinação da composição em açúcares

A técnica de cromatografia de troca aniônica de elevada eficiência com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD, *High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection*) permite a separação e quantificação direta de HC, em baixas concentrações, sem que seja necessária a sua derivatização (transformação de uma substância em outra de estrutura semelhante) (Rohrer, 2013). É uma técnica muito utilizada na área alimentar, uma vez que permite a detecção destes constituintes em amostras de alimentos e bebidas permitindo assim efetuar procedimentos de controlo de qualidade e rotulagem nutricional, assim como monitorizar o processo de produção e autenticação do produto em causa, permitindo a identificação de contaminações e adulterações (Yang *et al.*, 2016).

A separação dos vários componentes da amostra é realizada por utilização de uma fase estacionária de permuta aniônica permitindo separações altamente seletivas uma vez que, sendo considerados ácidos fracos, os HC são parcialmente ionizados em soluções alcalinas podendo assim ser separados por este mecanismo. Esta técnica é extremamente seletiva e específica para HC, uma vez que a detecção amperométrica pulsada deteta, somente, componentes que possuem grupos funcionais que apenas são oxidáveis perante a tensão de detecção fornecida o que, no caso dos HC, ocorre devido ao facto da sensibilidade para a sua detecção ser maior do que para outras classes de analitos. Para além disso, componentes presentes na amostra que sejam neutros ou catiónicos, mesmo que sejam oxidáveis, não interferem no resultado da análise (Rohrer, 2013).

Protocolo 4: Cromatografia de troca aniônica de elevada eficiência com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD)

De modo a determinar a composição em açúcares, foi realizada uma análise por HPAEC-PAD (ICS-3000, *Dionex*) após hidrólise ácida com H₂SO₄ das amostras WSM, HMWM, CC1, CC2 e CC3.

1. Preparou-se uma solução de H₂SO₄ a 72% (peso por peso (p/p)), na qual se pesaram 72 g de H₂SO₄ e 38 g de água ultrapura (**Nota:** O ácido é adicionado de forma lenta à água). Deixou-se arrefecer à temperatura ambiente (RT, *Room Temperature*);
2. Prepararam-se as soluções-mãe de fucose, ramnose, arabinose, galactose, manose, glucose, xilose, ribose, ácido galacturónico e ácido glucurónico (Tabela 3.1);

Tabela 3.1: Composição das soluções-mãe necessárias para a realização do método de determinação da composição em açúcares.

Composto	Peso do composto (mg)	Água ultrapura (g)
Ácido galacturónico	100	10
Ácido glucurónico	100	10
Arabinose	100	10
Fucose	100	10
Galactose	100	10
Glucose	100	10
Manose	100	10
Ramnose	100	10
Ribose	100	10
Xilose	100	10

3. Prepararam-se os padrões necessários à realização do método: padrão interno (PI) de 2-desoxiglucose a 1 mg/mL e os padrões de calibração A, B, C, D e E (Tabela 3.2);

Tabela 3.2: Composição dos padrões de calibração necessários para a realização do método de determinação da composição em açúcares.

Solução-mãe (mg)	A (mg)	B (mg)	C (mg)	D (mg)	E (mg)
Ácido galacturónico	150	25	250	50	100
Ácido glucurónico	100	150	50	250	25
Arabinose	150	25	50	250	100
Fucose	50	25	150	100	250
Galactose	25	250	100	150	50
Glucose	50	100	150	250	25
Manose	100	150	25	50	250
Ramnose	250	50	25	100	150
Ribose	150	25	50	250	100
Xilose	25	50	100	150	250
Padrão interno	500	500	500	500	500
Água ultrapura	1100	1250	1100	350	875
Total	2700	2700	2700	2700	2700

4. Pesaram-se 5 mg de cada amostra (WSM, HMWM, CC1, CC2 e CC3) para tubos de ensaio previamente identificados;
5. Adicionaram-se 200 μL da solução de H_2SO_4 a cada tubo;
6. As soluções resultantes foram deixadas a RT durante 3h sendo agitadas no vórtex a cada 30 minutos;
7. Decorrido este período, foram adicionados 2 mL de água ultrapura a cada tubo;
8. Os tubos foram colocados num bloco de aquecimento (*ThermoBloc: Falc*) a 100°C durante 2h e 30 minutos;
9. Deixou-se arrefecer as amostras a RT e adicionaram-se 500 μL de PI (2-desoxiglucose a 1 mg/mL);
10. Para *vials* previamente identificados (A, B, C, D, E), transferiram-se 400 μL de cada uma das soluções padrão e 4600 μL de água ultrapura, agitando-se de seguida;
11. Para outra série de *vials* previamente identificados (WSM, HMWM, CC1, CC2, CC3), transferiram-se 400 μL de cada solução preparada anteriormente e 4600 μL de água ultrapura, agitando-se de seguida;
12. Os padrões e as amostras foram analisados no equipamento de cromatografia. Foi injetado um volume de 5 μL de cada amostra/padrão, utilizando-se um fluxo de 0,3 mL/min de eluente sendo a temperatura da coluna, durante a corrida, de 35°C ;
13. A partir do cromatograma obtido, calcularam-se os valores da área de cada pico para cada açúcar, e após a construção das rectas de calibração, utilizando o método do padrão interno, foi determinada a composição em açúcares de cada amostra expressa em anidroaçúcar.

Nota: O equipamento de cromatografia possui uma coluna *CarbonPac PA-20* (150 mm x 3 mm). Foram utilizados 3 eluentes: **Eluente A**, constituído por 1,25 mM de solução de NaOH e 2 mM de hidróxido de bário ($\text{Ba}(\text{OH})_2$); **Eluente B**, composto por 400 mM de $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ e 2 mM de $\text{Ba}(\text{OH})_2$; **Eluente C**, constituído por 500 mM de NaOH e 2 mM $\text{Ba}(\text{OH})_2$.

Na Figura 3.2 é ilustrado, de forma esquemática, o procedimento geral realizado:

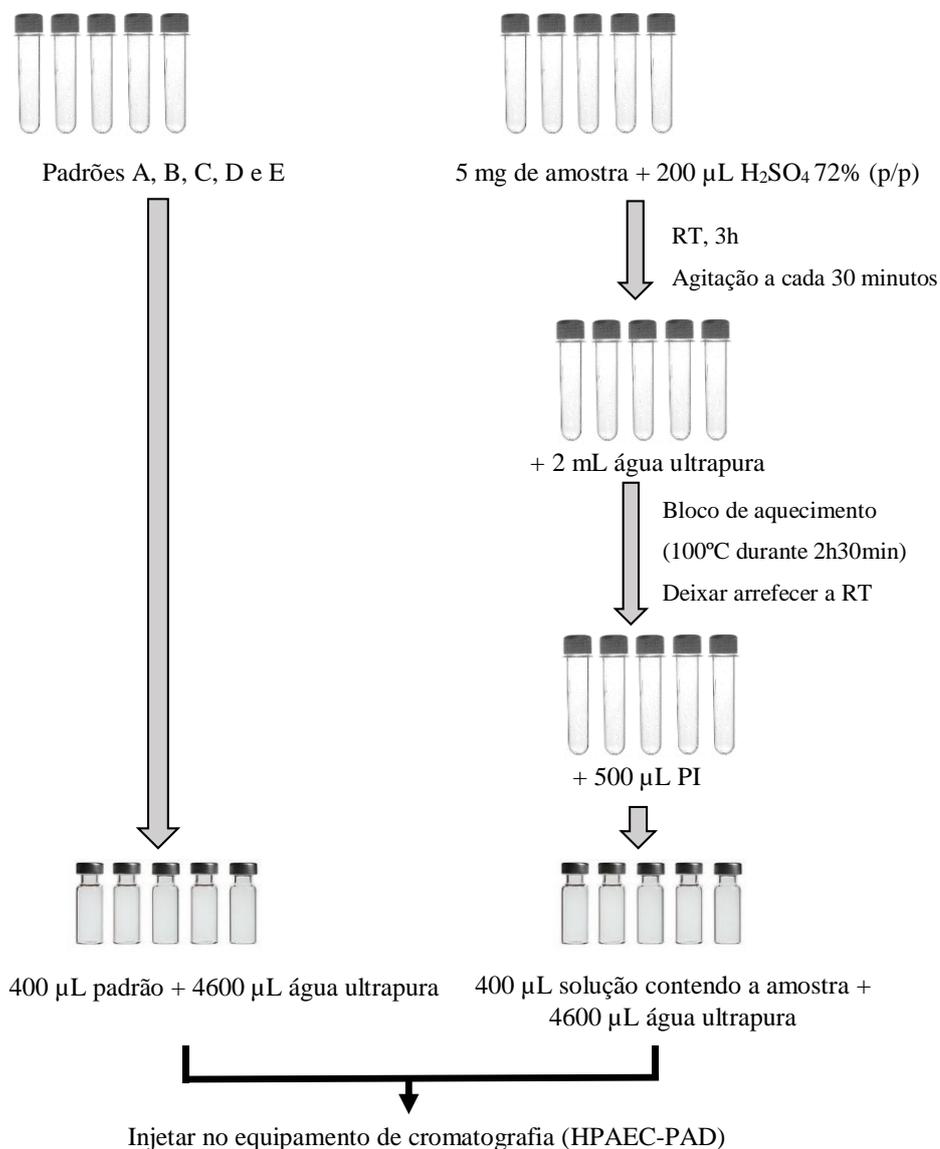


Figura 3.2: Esquema resumo do procedimento efetuado para a determinação da composição em açúcares das amostras WSM, HMWM, CC1, CC2 e CC3 em análise.

3.3.3. Pesquisa de ácidos nucleicos

A eletroforese em gel de agarose é um método utilizado para a separação de ácidos nucleicos de acordo com o seu tamanho sendo, portanto, um método analítico que permite determinar o tamanho destas moléculas por comparação com determinados marcadores de peso molecular compostos por fragmentos de tamanhos conhecidos (Corthell, 2014; Koontz, 2013; Magdeldin, 2012).

A agarose (matriz de separação) é um polímero natural extraído de algas marinhas que é dissolvido num tampão, colocado numa tina de eletroforese com um pente que irá dar lugar a poços para a deposição da amostra e que, quando arrefece, solidifica formando um gel que pode ter concentrações que variam entre os 0,2% e os 3% sendo que a escolha da mesma depende do tamanho dos fragmentos que se pretendem separar. À solução, ainda líquida, é incorporado brometo de etídeo, um corante fluorescente que, quando exposto à luz UV, permite a observação direta da localização da amostra. Depois de solidificado, o gel é submerso num tampão de eletroforese. A tina de eletroforese, que contém um eléctrodo positivo numa extremidade e um eléctrodo negativo noutra, é submetida a uma fonte de corrente contínua que faz migrar os ácidos nucleicos presentes na amostra (carregados negativamente) em direção ao eléctrodo positivo (ânodo). A velocidade de migração depende do tamanho das moléculas (quanto mais pequenas mais facilmente passam pelos poros do gel, logo maior será a sua velocidade de migração) e da concentração do gel (quanto maior a concentração mais apertada será a matriz do gel, assim, géis de maior concentração são geralmente utilizados para a separação de moléculas de menor tamanho) (Corthell, 2014; Koontz, 2013; Magdeldin, 2012).

Os géis de agarose são muito utilizados, pois são simples e rápidos de preparar, permitindo assim uma visualização quase instantânea da amostra a analisar.

A espectroscopia de infravermelhos com transformadas de *Fourier* (FTIR, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), é um método que surgiu por volta de 1940, sendo, hoje em dia, utilizado para a análise de amostras sólidas, líquidas ou gasosas, permitindo a identificação da composição química das mesmas, a quantificação dos componentes presentes, a determinação da qualidade ou consistência da amostra e a identificação de amostras desconhecidas. A radiação infravermelha passa através da amostra, sendo parte absorvida e outra parte transmitida. A energia na qual a radiação foi absorvida gera um pico no espectro de absorção que corresponde à frequência de uma vibração de uma parte de uma molécula da amostra. Assim, esta técnica é baseada nas vibrações dos átomos constituintes da amostra, medindo as frequências em que a mesma absorve e também a intensidade dessas absorções. O espectro obtido é único para cada amostra, funcionando como uma espécie de impressão digital, pois cada amostra é constituída por uma combinação única de diferentes de átomos (Simonescu, 2012; Stuart, 2004).

É um método largamente utilizado em laboratório devido às suas enormes vantagens tais como a rapidez na execução da análise, a sensibilidade elevada, a simplicidade do aparelho e

da execução do método e o facto de não ser necessária uma calibração manual devido ao facto dos aparelhos possuírem um mecanismo de autocalibração (Simonescu, 2012; Stuart, 2004).

Protocolo 5: Espectrofotometria de absorção ultravioleta visível (UV-vis)

1. Foram recolhidas 5 mg de cada um dos materiais WSM, HMWM e CC3 que foram colocadas em tubos de *Falcon* previamente identificados;
2. As amostras foram ressuspensas em 5 mL de água destilada;
3. A solução resultante foi tratada com vórtex (*Ika Vortex Genius 3*), 5 minutos de ultrassons (*Bandelin Sonorex*) e 10 minutos de banho a 70°C (*Stuart RE300DB*);
4. Diluiu-se a amostra na proporção 1:9 (v/v);
5. Foi realizada uma leitura no espectrofotómetro UV-vis (*PerkinElmer – Lambda 25*) na gama de comprimentos de onda entre 700-200 nm, de onde se obteve um espectro que permitiu verificar a presença do RNA e a concentração do mesmo.

Protocolo 6: Eletroforese em gel de agarose

Este protocolo foi utilizado diversas vezes ao longo do plano de trabalhos. Dependendo do objetivo do procedimento em causa, em alguns casos, foi alterada a percentagem do gel, o tipo de marcadores moleculares e o volume de amostra e de solução de deposição.

1. Para um balão de Erlenmeyer, pesou-se a quantidade de agarose (g) (*Invitrogen Life Technologies*) correspondente à percentagem desejada (*e.g.* para uma concentração de 2%, pesam-se 2 g de agarose) adicionando-se de seguida 100 mL de tampão de eletroforese SGTB 1x (*GRiSP*);
2. Preparou-se o suporte necessário para a polimerização do gel (já com o pente colocado);
3. Aqueceu-se a solução de agarose e tampão preparada anteriormente no micro-ondas até à total dissolução da agarose e deixou-se arrefecer ligeiramente;
4. A solução foi transferida para um recipiente de vidro ao qual foram adicionados 6 µL de brometo de etídeo. Homogeneizou-se a solução e verteu-se a mesma sobre o suporte;
5. Após a solidificação do gel, retirou-se o pente e transferiu-se o gel para uma tina de eletroforese onde ficou submerso com tampão SGTB 1x;

6. Posto isto, procedeu-se à preparação da amostra. Pesou-se 1 mg da fração CC3 que foi dissolvida em 200 µL de água (*Gibco DNase/RNase free*);
7. Foi utilizado o marcador molecular *100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific)* que permite a identificação de bandas com tamanhos compreendidos entre os 1000 e os 100 pares de base (bp);
8. Em três *ependorfs* colocaram-se quantidades diferentes de amostra: 1, 3 e 6 µL, aos quais foi adicionado 0,5, 0,5, e 1 µL de tampão de deposição (*Loading buffer*), respetivamente, contendo glicerol (que dá densidade à amostra permitindo a sua deposição) e azul de bromofenol (que dá cor à amostra para que se possa visualizar a corrida em tempo real);
9. As amostras foram depositadas no gel e procedeu-se à corrida a 120 mV durante 20 minutos;
10. O gel foi visualizado e fotografado num sistema de aquisição de imagem (*Uvidoc, Biometra*).

Nota: Simultaneamente, de modo a complementar os resultados obtidos no gel, foi feita uma análise, em triplicado, no *NanoDrop (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer)*. Para cada leitura, realizada a 260 nm, utilizaram-se 1,5 µL de amostra.

Protocolo 7: Espectroscopia de infravermelho com transformadas de *Fourier* (FTIR)

Os espectros infravermelhos foram obtidos utilizando um espectrofotómetro FTIR.

1. O espectro de ar foi gravado como fundo e subtraído automaticamente ao espectro da amostra utilizando para tal um *software* apropriado sendo assim obtidas, no final, todas as características espectrais que estão presentes apenas devido à amostra;
2. A região de varrimento utilizada foi entre os 400 e 5000 cm^{-1} , com uma resolução de 2 cm^{-1} . O espectro resultou da adição de 128 *scans*.

3.3.4. Determinação quantitativa de fosfolípidos e determinação da composição em ácidos gordos da fração CC3

Os lípidos são compostos orgânicos naturais que são insolúveis em água mas solúveis em solventes orgânicos, como é o caso do clorofórmio. Foi com base neste pressuposto que, em 1957, Jordi Folch Pi descreveu o hoje conhecido Método de *Folch*, um método que permite o isolamento e fracionamento de lípidos e que se pode dividir em duas etapas principais:

1. É gerado um sistema monofásico, pela adição de clorofórmio (CHCl_3) e metanol (CH_3OH) (2:1), o que permite extrair e dissolver os lípidos;
2. Passo de purificação, onde é produzido um sistema bifásico, através da adição de água, que permite a separação de compostos em duas fases: superior, a fase aquosa, que irá ser depois reextraída e uma fase inferior, a fase orgânica, onde se encontram os lípidos que se pretendem isolar, dissolvidos no clorofórmio.

Este método é considerado o método mais confiável para a recuperação de lípidos totais e o mais utilizado hoje em dia pela sua facilidade e rapidez de execução (Axelsson e Gentili, 2014; Folch *et al.*, 1957).

A metodologia escolhida, neste trabalho, para a realização da estimativa da quantidade de fosfolípidos presentes na fração CC3 foi desenvolvida, em 1970, por George Rouser e tem por base a quantidade de fósforo presente na amostra a analisar. É um método antigo que, no entanto, é fácil, rápido e barato de executar. A técnica baseia em submeter a amostra a uma digestão ácida que fará com que ocorra a digestão dos fosfolípidos presentes ocorrendo, por consequência, libertação de fosfato inorgânico. Este reage, posteriormente, como uma solução de molibdato de amónio e formará um complexo de cor azul-escuro. A formação deste complexo permite inferir a presença de fósforo/fosfolípidos na amostra sendo que a intensidade da cor é proporcional à quantidade dos mesmos. A estimativa é realizada através da extrapolação direta de uma reta de calibração para a qual se utilizaram padrões com concentrações de fósforo conhecidas que se sabe corresponder a uma determinada quantidade de fosfolípidos (Rouser *et al.*, 1970).

A cromatografia gasosa (GC, *Gas Chromatography*) é um método de separação e análise de misturas de substâncias voláteis. Nesta técnica, a amostra é vaporizada e introduzida num fluxo de gás adequado, denominado por fase móvel ou gás de arraste. Este fluxo de gás contendo a amostra vaporizada irá passar numa coluna cromatográfica, que contém a fase estacionária, onde ocorre a separação dos vários componentes da mistura. As substâncias são então separadas e saem da coluna passando por um detetor, responsável por gerar um sinal elétrico proporcional à quantidade de material eluído no gás. O registo deste sinal em função do tempo é chamado de cromatograma, onde aparecem diferentes picos (correspondentes a cada substância) com diferentes áreas, sendo esta proporcional à quantidade de substância, possibilitando assim a sua identificação e análise. Este método é bastante utilizado hoje em dia

nos laboratórios de química pois permite uma análise rápida, eficiente, com elevada resolução e que requer pequenas quantidades de amostra (McNair e Miller, 2009).

Protocolo 8: Recuperação de fosfolípidos pelo Método de *Folch* (Reis *et al.*, 2013)

1. Pesaram-se 2,5 mg de CC3 para um *eppendorf*;
2. Adicionaram-se 160 μL de CH_3OH gelado;
3. De seguida, foram adicionados 320 μL de CHCl_3 gelado ao qual foi incorporado hidroxitolueno butilado (BHT) a 1%;
4. A solução foi incubada no gelo durante 20 minutos;
5. Após este período, adicionaram-se 150 μL de água ultrapura;
6. Realizou-se uma nova incubação no gelo por 10 minutos;
7. A solução foi centrifugada durante 5 minutos, a 2000 *g* (*g-force*) e a RT (25°C);
8. A fase aquosa (sobrenadante) foi removida para um novo *eppendorf* e a fase orgânica foi guardada;

Reextração da fase aquosa:

9. Adicionaram-se 250 μL de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1) gelado à fase aquosa recuperada;
10. Incubou-se no gelo por 20 minutos;
11. Adicionaram-se de 150 μL de água ultrapura;
12. Realizou-se uma nova centrifugação durante 5 minutos, a 2000 *g* e a RT;
13. A fase aquosa foi eliminada e as fases orgânicas foram juntas e conservadas a -20°C. Esta amostra foi denominada por CC3Lípidos.

Protocolo 9: Transesterificação de fosfolípidos

1. Transferiram-se 100 μL de amostra CC3Lípidos para um tubo apropriado para o efeito;
2. Adicionaram-se 2 mL de uma solução de $\text{CH}_3\text{OH}:\text{C}_6\text{H}_{14}$ (metanol:hexano) (4:1), agitou-se a amostra no vórtex e incubou-se no gelo de modo a que a mesma ficasse bem gelada;
3. De seguida, foram adicionados 200 μL de cloreto de acetilo (CH_3COCl) e agitou-se a solução novamente no vórtex;

4. A amostra foi colocada num bloco de aquecimento a 100°C durante 10 minutos. Decorrido este período, foi agitada no vórtex e novamente colocada no bloco de aquecimento por mais 50 minutos, deixando-se depois arrefecer a RT;
5. Adicionaram-se 1,5 mL de hexano, 6 mL de carbonato de potássio (K_2CO_3) a 6% agitando-se de seguida;
6. A amostra foi centrifugada a 3000 rpm durante 5 minutos, removendo-se, de seguida, a fase aquosa;
7. Adicionaram-se, novamente, 1,5 mL de hexano, 6 mL de carbonato de potássio a 6%, agitou-se e colocou-se a centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos;
8. Por fim, removeu-se a fase orgânica para um novo tubo.

Protocolo 10: Determinação quantitativa de fosfolípidos pelo “Ensaio do fósforo”

1. Para dois tubos de vidro pesou-se 1 mg de CC3 e pipetaram-se 100 µL de amostra CC3Lípidos;
2. Adicionaram-se a cada tubo, 650 µL de ácido perclórico ($HClO_4$) a 70%;
3. Os tubos foram colocados num bloco de aquecimento a 180°C, durante 30 minutos, tapados com um berlinde, de modo a ocorrer a digestão ácida (**Nota:** O berlinde é colocado para que a solução não evapore e para que não haja demasiada pressão como ocorreria caso colocássemos a tampa nos tubos);
4. Preparou-se uma solução padrão-mãe de fosfato monopotássico (KH_2PO_4) – 43,9 mg de KH_2PO_4 em 100 mL de água destilada (10 µg de fósforo/mL). Esta solução foi diluída 10x;
5. Prepararam-se 5 soluções padrão: Para 5 tubos de vidro pipetaram-se 100, 150, 250, 375 e 500 µL da solução padrão-mãe, aos quais foram adicionados 650 µL de $HClO_4$ a 70%. Esta solução não necessita de digestão;
6. Após decorridos os 30 minutos, deixou-se arrefecer as amostras a RT;
7. A cada tubo (amostras e padrões) foram adicionados 3,3 mL de água destilada, 500 µL de solução de molibdato de amónio ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}$) a 2,5% e 500 µL de solução de ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) a 10% (**Nota:** Esta solução deve ser preparada na hora e não deve ser conservada mais de uma semana a 4°C), agitando no vórtex entre cada adição;
8. Os tubos foram colocados num banho de água a 100°C por 5 minutos;

9. A absorvância das amostras e padrões foi lida a 800 nm;
10. Preparou-se uma curva de calibração para os padrões e por extrapolação de dados determinou-se a quantidade de fósforo presente na amostra.

Protocolo 11: Determinação da composição em ácidos gordos dos fosfolípidos presentes em CC3 por cromatografia gasosa (GC)

Para a realização da determinação de ácidos gordos por GC foi utilizada uma coluna capilar (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O hélio foi usado como gás de arraste a um fluxo de 1 mL/min. O detetor e o injetor foram ambos mantidos à temperatura de 250°C. A temperatura da coluna permaneceu, inicialmente, a 100°C durante 2 minutos, seguindo-se uma taxa de aquecimento de 4 °C/min até atingir os 220°C onde permaneceu durante 20 minutos..

1. No equipamento de GC (*Trace GC – Thermo Finnigan*) foram injetados 2 µL de amostra CC3Lípidos depois de transesterificada com o auxílio de uma microseringa (*Hamilton – Bonaduz, Schweiz* com capacidade de 10 µL);
2. Efetuou-se a análise durante 60 minutos.

3.4. Transcrição reversa do RNA presente na fração CC3

A transcrição reversa é uma técnica comumente utilizada na qual ocorre conversão de RNA no seu DNA complementar (cDNA) com o auxílio de uma enzima denominada por transcriptase reversa. O cDNA obtido pode ser utilizado, posteriormente, em diversas metodologias tais como PCR, clonagem e sequenciação (Carson *et al.*, 2012).

Protocolo 12: Síntese de cDNA a partir do RNA presente na fração CC3

Para a realização deste procedimento foi utilizado o *kit “Verso cDNA synthesis kit” (Thermo Scientific)*. Este *kit* inclui dois *primers* distintos: *Random Hexamers*, que consiste numa mistura de hexanucleótidos aleatórios de cadeia simples capazes de representar todas as possíveis sequências de hexâmeros, e *Oligo dT*, que consiste numa sequência de cadeia simples de desoxitimina (dT), que se liga a caudas de poliadenina (Poli A).

1. Em 2 tubos PCR foi realizada a mistura de reação representada na Tabela 3.3:

Tabela 3.3: Mistura de reação utilizada para a execução da transcrição reversa do RNA presente na fração CC3.

Mistura de reação	CC3Oligo (O_RT) (μL)	CC3Hexamers (H_RT) (μL)
Tampão de síntese 5x cDNA	10	10
Mistura de dNTPs (5 mM cada dNTP ⁽¹⁾)	5	5
<i>Primer Anchored Oligo dT</i> (500 ng/μL)	2,5	—————
<i>Primer Random Hexamers</i> (400 ng/μL)	—————	2,5
<i>RT Enhancer</i>	2,5	2,5
<i>Verso Enzyme Mix</i>	2,5	2,5
RNA (CC3)	1,25	1,25
Água (<i>Gibco, Invitrogen, Life Technologies</i>)	26,25	26,25
Volume final (μL)	50	

⁽¹⁾ dNTP - Desoxinucleotido trifosfato

- Depois de realizada a mistura de reação, os tubos foram colocados no termociclador com o programa apresentado na Tabela 3.4:

Tabela 3.4: Programa utilizado para a síntese de cDNA.

Temperatura (°C)	Duração	Fase
42	60 minutos	Síntese de cDNA
95	2 minutos	Inativação da síntese
4	Indeterminado	Pausa

- As amostras foram submetidas a uma eletroforese em gel de agarose (**Protocolo 6**) a 1,5% na qual se utilizou o marcador molecular *100 bp DNA Ladder* e se depositaram 5 μL de amostra e 3 μL de solução de deposição de modo a verificar se este procedimento teria corrido como o pretendido, sendo as restantes amostras colocadas no frigorífico até à execução do procedimento seguinte.

3.5. *Degenerate oligonucleotide-primed PCR (DOP-PCR)*

O método de PCR que utiliza um *primer* universal e degenera o tamanho dos produtos obtidos (DOP-PCR, *Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR*), descrito pela primeira vez em 1992 por Telenius *et al.*, é um processo no qual se utiliza um *primer* universal que é capaz de

se ligar a várias sequências distintas. Devido a este facto, torna-se o método mais indicado para a realização do presente trabalho, uma vez que a sequência de RNA em estudo é, até ao momento, desconhecida (Arneson *et al.*, 2008).

Protocolo 13: Amplificação de cDNA por DOP-PCR

De modo a amplificar o cDNA obtido pelo procedimento efetuado anteriormente, realizou-se um DOP-PCR. Para a execução deste, foram testados dois *primers* universais : *Primer 6MW* e *Primer F/S*.

1. Em 4 tubos PCR realizou-se a mistura de reação representada na Tabela 3.5:

Tabela 3.5: Mistura de reação utilizada para a realização do DOP-PCR.

Mistura de reação	CC3Oligo (O_DOP_6MW)	CC3Oligo (O_DOP_F/S)	CC3Hexamers (H_DOP_6MW)	CC3Hexamers (H_DOP_F/S)
Tampão TAPS ⁽¹⁾	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
Tampão W1 ⁽²⁾	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL
Mistura de dNTPs	4 µL	4 µL	4 µL	4 µL
<i>Primer 6MW</i>	2 µL	—————	2 µL	—————
<i>Primer F/S</i>	—————	2 µL	—————	2 µL
cDNA	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
Taq polimerase	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Água ultrapura	30,5 µL	30,5 µL	30,5 µL	30,5 µL
Volume final	50 µL			

⁽¹⁾ Ácido N-tris(hidroximetil)metil-3-amino-proanesulfónico

⁽²⁾ Éter polioxietileno W1

2. Depois de realizada a mistura de reação, os tubos foram colocados no termociclador com o seguinte programa (Tabela 3.6):

Tabela 3.6: Programa de DOP-PCR utilizado para a amplificação do cDNA.

Temperatura (°C)	Tempo	Fase
94	9 minutos	Desnaturação inicial
94	1 minuto	Desnaturação
62	1 minuto e 30 segundos	<i>Annealing</i>
72	3 minutos	Extensão
72	10 minutos	Extensão final
10	Indeterminado	Pausa

← 24 ciclos

3. Finalizado o DOP-PCR, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose (**Protocolo 6**) a 1,5%, na qual se utilizou o marcador molecular *100 bp DNA Ladder* (*Thermo Scientific*), que permite observar bandas com tamanhos compreendidos entre 1000 e 100 bp, e o marcador *1kb DNA Ladder plus* (*Thermo Scientific*), que permite observar bandas com tamanhos compreendidos entre os 2000 e 75 bp e o marcador *GeneRuler DNA Ladder Mix* (*Thermo Scientific*). Depositaram-se 3 μ L de amostra e 2 μ L de solução de deposição. As restantes amostras foram colocadas no frigorífico até posterior utilização.

3.6. Clonagem de produtos PCR

Tendo surgido nos anos 70, a clonagem foi descrita como uma técnica revolucionária da biologia experimental, que terá levado ao rápido desenvolvimento de outras técnicas, como é o caso da sequenciação de DNA, que permite o estudo da estrutura de sequências individuais, facilitando assim o estudo da expressão das mesmas e a associação da expressão anormal destas a determinadas doenças. Atualmente, a clonagem tem sido também utilizada pela biotecnologia moderna com vista à produção de proteínas bem como outros componentes para uso em medicina, agricultura e arqueologia (Brown, 2010).

Como se pode observar na Figura 3.3, a clonagem consiste na inserção de um fragmento de DNA dentro de uma molécula de DNA circular (plasmídeo) ao qual chamamos de vetor, de forma a produzir uma molécula de DNA recombinante (1). De seguida, o vetor é colocado dentro de uma célula hospedeira (2), geralmente uma bactéria, que se multiplica, multiplicando de igual forma o vetor e o fragmento de DNA contido no seu interior (3). Deste modo, ao fim de várias divisões celulares por parte da célula hospedeira (4), ocorre o surgimento de uma colónia ou clone (5) de várias células hospedeiras idênticas, cada uma contendo uma ou mais

cópias da molécula de DNA recombinante. As colónias são, por fim, colocadas a crescer numa placa de *Petri* com um meio sólido (6), de modo a que haja a sua recuperação e posterior extração de DNA plasmídico e sequenciação (Brown, 2010).

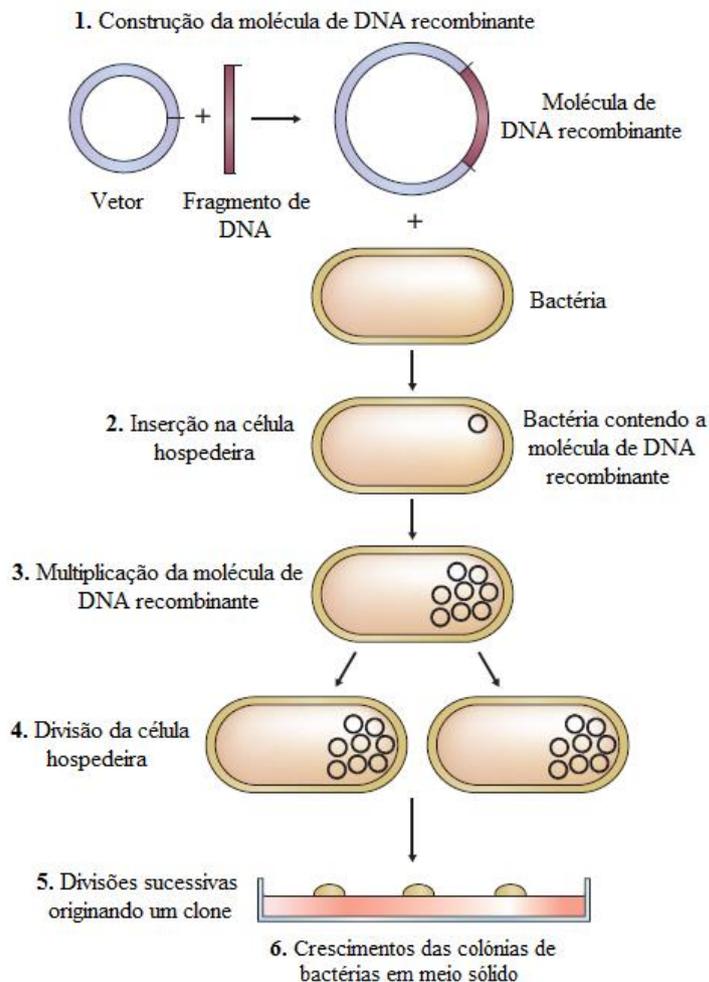


Figura 3.3: Esquema resumo dos passos envolvidos na técnica de clonagem. Adaptado de Brown, 2010.

No presente trabalho, clonaram-se os produtos DOP-PCR obtidos sendo utilizado para o efeito o plasmídeo pUC19DNA/SmaI cujo mapa pode ser consultado no Anexo A. Neste vetor estão presentes, entre outros, o gene de resistência à ampicilina e o gene *LacZ* (gene do operão da lactose), sendo que através da deteção da disrupção/expressão destes genes é possível identificar as bactérias recombinantes. O gene de resistência à ampicilina permite detetar células com a presença do vetor, uma vez que devido a este, apenas se irão desenvolver as células que o contiverem. Destas, é possível ainda identificar as que contém o fragmento de DNA de interesse (inserto), uma vez que apresentarão cor branca. Este acontecimento pode ser explicado pelo facto do vetor pUC19DNA/SmaI possuir o gene *LacZ*, codificador da enzima β -Galactosidase, responsável por digerir lactose em glicose e galactose. Neste procedimento é

utilizado o X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo), um glicosídeo artificial análogo à lactose. Em situações normais, na presença de indutores, como o IPTG (β -D-1-tiogalactopiranosídeo de isopropilo) e o X-Gal, o gene LacZ produz a enzima β -Galactosidase e ocorre a hidrólise do X-Gal que, por ser um substrato cromogéneo, origina um complexo de cor azul. Acontece que o local de clonagem múltipla, onde será inserido o fragmento de DNA a clonar, situa-se no meio da sequência codificadora da enzima β -Galactosidase, tornando assim a codificação da mesma é inviável. Deste modo, se o vetor contiver o fragmento de interesse, o gene LacZ não é capaz de codificar a enzima β -Galactosidase que, por sua vez, não será capaz de clivar o X-Gal, não produzindo assim colónias de cor azul mas sim colónias de cor branca, que serão as que contêm o inserto (Kiernan, 2007; Sandhu, 2010).

Protocolo 14: Clonagem dos produtos de transcrição reversa com *primers Oligo dT* e *Random Hexamers* e dos produtos de DOP_PCR com *primers 6MW* e *F/S* com o vetor pUC19DNA/SmaI

O processo de clonagem foi efetuado para os produtos obtidos por transcrição reversa com os *primers Oligo dT* (O_RT) e *Random Hexamers* (H_RT) e para os produtos obtidos por DOP_PCR com os *primers 6MW* (O_DOP_6MW e H_DOP_6MW) e *F/S* (O_DOP_F/S e H_DOP_F/S), efetuando-se sempre uma mistura de reação para cada um.

Preparação do meio sólido

Preparou-se o meio sólido a partir de soluções *stock* à concentração de 25 g/L de meio LB (*Luria Bertani*) e 15 g/L de ágar.

1. Dissolveram-se, lentamente, 3 g de ágar e 5 g de LB em 200 mL de água;
2. Colocou-se a mistura a autoclavar a 121°C, durante 15 minutos;
3. Deixou-se arrefecer a mistura, gradualmente, num banho a 50°C;
4. De seguida, na câmara de fluxo vertical, adicionou-se o antibiótico ampicilina para uma concentração final de 100 μ g/mL, IPTG a uma concentração de 0,5 mM e X-GAL para uma concentração final de 80 μ g/mL;
5. Agitou-se a mistura cuidadosamente de modo a não surgirem bolhas e verteram-se 30 mL para cada uma de 6 caixas de *Petri*;
6. Por fim, deixaram-se arrefecer as placas, sendo depois seladas e armazenadas a 4°C, até posterior utilização;

Preparação do meio líquido

O meio líquido foi preparado a partir de uma solução *stock* de LB à concentração inicial de 25 g/L.

7. Numa garrafa de 1 L, dissolveram-se 15 g de LB em 600 mL de água (*Gibco, Invitrogen, Life Technologies*) (foram preparadas duas garrafas);
8. Colocou-se a mistura a autoclavar a 121°C, durante 15 minutos;
9. Deixou-se arrefecer a RT;
10. Na câmara de fluxo vertical, adicionou-se o antibiótico ampicilina para uma concentração final de 100 µg/mL;
11. Homogeneizou-se a mistura e verteram-se 10 mL para cada um de vários tubos de *Falcon*;
12. Por fim, os tubos de *Falcon* foram armazenados a 4°C, até posterior utilização;

Fast DNA End Repair

Devido ao facto do vetor pUC19DNA/SmaI ser um vetor desfosforilado, antes de procedermos à ligação entre o mesmo e o inserto é necessário tornar as extremidades deste último cegas, para assim serem compatíveis com o vetor e deste modo possa ocorrer ligação entre ambos. Para este efeito, utilizou-se o *kit Fast DNA End Repair Kit (Thermo Scientific)*, que possibilita a conversão das extremidades dos produtos de PCR obtidos (insertos) em extremidades completamente cegas.

13. Para cada uma das amostras, preparou-se, em gelo, a mistura de reação apresentada na Tabela 3.7:

Tabela 3.7: Mistura de reação preparada para a execução do passo *Fast End Repair*.

Mistura de reação	Quantidade (µL)
Inserto (Fragmento de cDNA)	40
10x <i>End Repair Buffer</i>	5
<i>End Repair Enzyme Mix</i>	2,5
Água ultrapura	2,5
Volume final (µL):	50

14. Colocou-se a mistura de reação no termociclador a 20°C, durante 12 minutos;
15. Após este período, e antes de seguirmos para o passo seguinte, as amostras foram imediatamente colocadas em gelo e foram analisadas em gel de agarose a 1,5%, no qual se depositaram 3 µL de amostra e 1,5 µL de solução de deposição (**Protocolo 6**);

Ligação do inserto ao vetor pUC19DNA/SmaI

16. Usando o kit *T4 DNA Ligase* (Fermentas, Thermo Scientific), preparou-se a reação de ligação do inserto ao vetor pUC19DNA/SmaI representada na Tabela 3.8;

Tabela 3.8: Mistura de reação para realização do passo de ligação do inserto ao vetor pUC19DNA/SmaI.

Mistura de reação	Quantidade (µL)
Produtos do <i>Fast End Repair</i>	14
Água (<i>Gibco, Invitrogen, Life Technologies</i>)	—————
Vetor pUC19 ⁽¹⁾	1 (50 ng)
10x Tampão T4 DNA ligase	2
50% Solução PEG 4000 ⁽²⁾	2
T4 DNA ligase	1
Volume final (µL):	20

⁽¹⁾ Representado no Anexo A

⁽²⁾ PEG - Solução de polietilenoglicol

17. Incubaram-se as amostras no termociclador a 22°C, durante 1 hora;

18. No final da incubação, as amostras foram colocadas a RT;

Transformação das bactérias competentes com o produto de ligação

19. Em gelo, adicionaram-se 3 µL (equivalente a 10 ng) de reação de ligação a tubos com 50 µL de bactérias, incubando-se, de seguida, durante 30 minutos;

20. Decorrido este período, para que ocorresse choque térmico das bactérias, os tubos foram transferidos para um banho a 42°C, com a duração de 20 segundos. Passado este tempo, os tubos foram imediatamente transferidos para o gelo, onde permaneceram por 2 minutos;

21. À chama, adicionaram-se 950 µL de meio SOC (*Super Optimal Catabolite*) (*Thermo Scientific*) a cada um dos tubos e incubaram-se a 37°C, durante 1 hora, com uma agitação de 225 rpm;

22. Decorrido este período, plaquearam-se, à chama, 200 µL de suspensão bacteriana em cada placa previamente preparada e incubaram-se as placas a 37°C, durante a noite;

23. No dia seguinte, efetuou-se a repicagem dos clones positivos (colónias brancas): Colocou-se uma colónia em cada tubo de *Falcon*, previamente preparado e estabilizado a RT;

24. Os tubos de *Falcon* com os clones repicados foram incubados a 37°C, durante a noite, com agitação de 250 rpm;

Screening das bactérias recombinantes por PCR

As colónias brancas, previamente repicadas e postas a crescer durante a noite, foram submetidas a um *screening* por PCR, no qual se utilizou *primers M13*, que se ligam ao vetor perto do local de inserção, o que permite confirmar se os clones possuem o plasmídeo com o inserto e se são, portanto, positivos ou negativos. Depois deste passo, as colónias que não sugeriram a presença do inserto foram descartadas.

25. Preparou-se a mistura de reação apresentada na Tabela 3.9;

Tabela 3.9: Mistura de reação preparada para a realização do PCR de *screening* das bactérias recombinantes.

Mistura de reação	Quantidade (µL)
Suspensão bacteriana	1,6
Tampão PCR 10x [com (NH ₄) ₂ SO ₄] ⁽¹⁾ (MBI Fermentas, Thermo Scientific)	2
Mistura de dNTPs (2.5 mM) (Invitrogen, Life Technologies)	1
MgCl ₂ a 25 mM (MBI Fermentas, Thermo Scientific)	1,2
“Primer M13 forward” (1 µg/mL) ⁽²⁾ (Invitrogen, Life Technologies)	0,2
“Primer M13 reverse” (1 µg/mL) ⁽³⁾ (Invitrogen, Life Technologies)	0,2
Água ultrapura (Gibco, Invitrogen, Life Technologies)	13,4
Taq DNA polimerase (MBI Fermentas, Thermo Scientific)	0,4
Volume final (µL):	20

(1) (NH₄)₂SO₄: Sulfato de amónio

(2) “Primer M13 forward” (18 bp): 5’- TGTAACACGACGGCCAGT-3’

(3) “Primer M13 reverse” (18 bp): 5’- CAGGAAACAGCTATGACC-3’

26. De seguida, colocou-se a mistura de reação no termociclador. O programa utilizado está descrito na Tabela 3.10;

Tabela 3.10: Programa utilizado para a reação de PCR de *screening* de bactérias recombinantes.

Temperatura (°C)	Duração	Fase
94	5 minutos	Desnaturação inicial
94	30 segundos	Desnaturação <i>Annealing</i> Extensão
54	30 segundos	
72	90 segundos	
72	10 minutos	Extensão final
4	Indeterminado	Pausa

← 29 ciclos

27. No final da reação de PCR, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose 1,5% com os produtos da amplificação, depositando-se 3 μL de amostra com 2 μL solução de deposição (**Protocolo 6**);
28. Depois de concluída a eletroforese, identificaram-se as bandas pretendidas com base no peso molecular, que calculávamos ser um pouco superior a 100 bp;
29. Posteriormente, fizeram-se *stocks* das suspensões bacterianas que indicaram a presença do inserto, adicionando-se, para tal, 250 μL de glicerol e 1250 μL de suspensão bacteriana.

3.7. Extração de DNA plasmídico

Para a realização deste procedimento foi utilizado o *kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific)*.

Protocolo 15: Extração de DNA plasmídico dos clones anunciados como positivos

O principal objetivo do protocolo de clonagem era a posterior sequenciação do inserto introduzido no vetor, sendo assim, procedeu-se à extração do DNA plasmídico dos clones que se anunciaram positivos (**Protocolo 13**).

1. Começou por se colocar, em tubos de *Falcon*, 150 μL de suspensão bacteriana em 15 mL de meio LB com ampicilina a 37°C, durante a noite, com uma agitação de 225 rpm;
2. Após o crescimento das bactérias, centrifugaram-se os tubos a 6800 *g* durante 5 minutos e descartou-se o sobrenadante;
3. Ressuspendeu-se o *pellet* em 250 μL de “solução de ressuspensão”, através da realização de um vórtex;
4. Adicionaram-se 300 μL de “solução de lise”, invertendo-se os tubos até a solução se apresentar viscosa. (**Nota:** É importante que este passo não exceda os 5 minutos);
5. De seguida, foram adicionados 375 μL de “solução de neutralização”, invertendo-se novamente, seguida de uma centrifugação a 13000 rpm, durante 5 minutos. No final, transferiu-se o sobrenadante para a coluna fornecida pelo *kit*, com o cuidado de não tocar no *pellet*;
6. Colocaram-se as colunas num tubo coletor procedendo-se, de seguida, a uma centrifugação a 13000 rpm durante 1 minuto. No final, descartou-se o conteúdo do tubo coletor;

7. Adicionaram-se, de seguida, 500 µL de “solução de lavagem” às colunas;
8. Centrifugaram-se as colunas a 13000 rpm, durante 1 minuto, descartando-se novamente o conteúdo do tubo coletor;
9. Realizou-se uma nova lavagem, adicionando-se 500 µL de “solução de lavagem” e realizou-se novamente uma centrifugação a 13000 rpm, durante 1 minuto;
10. As colunas foram transferidas para um novo tubo de 1,5 mL às quais foram adicionados 50 µL de água ultrapura, previamente aquecida a 70°C;
11. Incubaram-se os tubos durante 15 minutos a RT e procedeu-se a uma nova centrifugação a 14000 rpm, durante 2 minutos;
12. Por fim, com o objetivo de confirmar se o passo de extração e purificação foi realizado corretamente, procedeu-se a uma quantificação pelo *NanoDrop*;
13. As amostras de DNA plasmídico purificado e quantificado foram armazenadas a -20°C, até serem enviadas para sequenciação.

3.8. Sequenciação e análise bioinformática

No decorrer dos últimos anos, com os avanços na biologia molecular e com o aumento dos equipamentos disponíveis para investigação científica, as técnicas de sequenciação ficaram cada vez mais rápidas, permitindo o sequenciação de um grande número de genomas de várias espécies, incluindo o genoma Humano, que ficou completo em 2003 (Collins *et al.*, 2003). Toda esta informação relativa às inúmeras espécies exigiu o seu armazenamento, organização e catalogação em bancos de dados, assim como o desenvolvimento de algoritmos eficientes de modo lidar com o volume crescente de dados e a permitir a sua expansão para uma comunidade científica mais ampla. Deste modo, com a conjugação da biologia e da informática, surgiu uma nova área denominada por “Bioinformática” (Mabrouk *et al.*, 2006).

Apesar da maioria dos RNAs terem sido identificados através de métodos experimentais, atualmente, as técnicas de previsão computacional tornam-se cada vez mais úteis e fiáveis, pois os primeiros, apesar de serem altamente precisos, tornam-se muito mais demorados e dispendiosos (Li *et al.*, 2015). Para além disso, atualmente, existe um acumular de informação e de dados relativamente às propriedades dos RNAs, o que torna os métodos computacionais mais adequados, não só para identificar a estrutura da molécula como também para determinar de que tipo de molécula se trata (Zhao *et al.*, 2009). Ademais, em comparação com os métodos

experimentais, os métodos computacionais mostram ser mais rápidos, mais acessíveis, menos dispendiosos e mais eficazes (Huang *et al.*, 2017).

Existem centenas de programas bioinformáticos, quer disponíveis para pesquisa *online* quer para instalação local no computador de trabalho, que permitem fazer as mais variadas análises tais como: análise de sequências, identificação de vários tipos de RNA já anteriormente descobertos e análise de novos RNAs, nomeadamente ncRNAs (Lukasik *et al.*, 2016).

Relativamente aos ncRNAs, para a sua análise e identificação, as abordagens relatadas dividem-se em duas categorias: métodos *ab initio*, baseados em informações de homologia (somente ncRNAs que são homólogos com uma família ncRNAs já identificada é que podem ser estudados com este método) e métodos *de novo*, que ao invés de informações evolutivas, utilizam características da sequência e/ou da estrutura secundária para a identificação (mais utilizados) (Wang *et al.*, 2013).

Uma das metodologias mais executadas em bioinformática é a análise de sequências, um processo que visa a descoberta de semelhanças funcionais e estruturais e/ou diferenças entre múltiplas sequências biológicas. Com o rápido aumento do número de sequências disponíveis nos bancos de dados, pesquisas de similaridade tornaram-se essenciais na maioria das aplicações bioinformáticas, pois a deteção de semelhanças significativas entre uma sequência desconhecida e outra já catalogada é um dos métodos mais úteis e rápidos para caracterizar a nova sequência em termos de estrutura e função já que, geralmente, quando são similares possuem a mesma estrutura e papel funcional. Se duas sequências, pertencentes a diferentes organismos, forem muito semelhantes e essa similaridade for estritamente significativa, as mesmas são consideradas homólogas (Fortino, 2012).

A avaliação da semelhança entre duas ou mais sequências é realizada através da execução do seu alinhamento. Os algoritmos utilizados no alinhamento funcionam através da comparação de duas ou mais sequências procurando por caracteres idênticos ou padrões de caracteres com vista à quantificação do nível de similaridade entre as mesmas. A pesquisa de similaridade através de bancos de dados permite determinar qual das milhares de sequências aí presentes estão potencialmente relacionadas a uma determinada sequência de interesse (Fortino, 2012). Para realizar o alinhamento, são muito utilizados os programas *Clustal Omega*, *Geneious* e *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (engloba um conjunto de programas para alinhamento tanto para nucleótidos (BLASTN - *Standard nucleotide BLAST*) como para proteínas (BLASTP - *Standard protein BLAST*)) (Huang *et al.*, 2017).

Como é sabido, a molécula de RNA é capaz de se dobrar numa estrutura secundária que é mais conservada e mais estável que a sequência primária. Deste modo, tem sido cada vez mais útil incorporar a procura de estruturas secundárias nos métodos de identificação de novos ncRNAs. Neste procedimento tem-se em conta a composição em nucleótidos da sequência, que geralmente é rica em G e C, o valor de entropia e de energia livre mínima (MFE, *minimum free energy*) (Wang *et al.*, 2013), sendo que, normalmente, quanto menor (mais negativo) for o valor de MFE, mais estável é a estrutura secundária de uma sequência de RNA (Han *et al.*, 2014). Existem várias ferramentas bioinformáticas para a previsão da estrutura secundária dos RNAs, tais como o *mfold*, o *RNAfold* e o *RNAstructure* (Han *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015).

Como já foi referido, a existência de bases de dados é fundamental para a organização e catalogação de toda a informação. Atualmente, faz-se uso de imensas bases de dados, extremamente úteis para a identificação de sequências de interesse, sendo as mais utilizadas:

- *European Nucleotide Archive* – Repositório que oferece acesso livre a sequências de DNA e RNA anotadas. Para além disso, armazena também informações complementares, como procedimentos experimentais, detalhes de montagem de sequências e outros dados relacionados com projetos de sequenciação (Cochrane *et al.*, 2008);

- *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* - Abriga uma série de bases de dados relevantes sendo, portanto, um recurso importante para ferramentas e serviços de bioinformática. Os principais bancos de dados são o *GenBank*, para sequências de DNA, o *Reference Sequence (RefSeq)*, que engloba uma coleção de DNA genómico, transcritos de RNA e proteínas, o *BLAST*, que permite o alinhamento da sequência de interesse com sequências conhecidas, e o *PubMed*, uma base de dados bibliográfica (Beck *et al.*, 2014);

- *Ensembl* – Um *browser* para genomas de vertebrados que permite pesquisas relacionadas com genómica comparativa, evolução, variação de sequências e regulação transcricional. Existe também uma variante especialmente dedicada a fungos, o *EnsemblFungi* (Aken *et al.*, 2017);

- Existem também bases de dados especialmente desenhadas para fungos tais como a *FungiDB*, a *MycobankDatabase* e a *Fungal Barcoding Database*;

- Especificamente desenhadas para a pesquisa de ncRNA é possível recorrer à *NONCODE*, mais direcionada para lncRNAs (Fang *et al.*, 2017), e à *Non-coding RNA Databases Resource (NRDR)*, uma plataforma que conjuga mais de 100 bases de dados de ncRNAs disponíveis na *internet* permitindo a pesquisa de qualquer espécie (Paschoal *et al.*, 2012);

- Dos ncRNAs, o que tem sido alvo de maior número de estudos e de desenvolvimento em termos de ferramentas bioinformáticas é o miRNA, sendo que, para este, estão disponíveis

inúmeras bases de dados tais como a miRBase, que concentra a maioria dos os miRNAs conhecidos até hoje, a *Rfam*, que apresenta coleções de famílias de RNAs (Rahul e Rajesh, 2016; Zhang *et al.*, 2017), a *miR2Disease*, um recurso abrangente de miRNAs desregulados em várias doenças humanas, a *miRCancer*, uma coleção de perfis de expressão de miRNAs em vários tipos de cancro humano e a *OncomiRDB*, que engloba miRNAs oncogénicos e supressores de tumores (Lukasik *et al.*, 2016).

✓ O DNA plasmídico obtido a partir dos vários clones foi analisado por sequenciação. Foram enviados 32 clones que foram sequenciados, em apenas um sentido (*reverse*), pela empresa *Stabvida*. Aquando da obtenção dos resultados, estes foram tratados de modo a identificar a sequência de interesse. A identificação foi feita pela determinação dos locais de hibridação dos *primers* M13 na base de dados bioinformática BLAST. As sequências obtidas foram submetidas a um alinhamento múltiplo com o programa computacional *Geneious*. O alinhamento múltiplo incluiu as sequências representativas de todos os clones enviados para sequenciação, com o intuito de aferir sobre a similaridade entre as mesmas. Adicionalmente, utilizou-se também a ferramenta bioinformática *RNAfold*, de modo a inferir se as sequências obtidas formariam estruturas secundárias e a retirar informação acerca da sua estabilidade. Finalmente, recorreu-se às bases de dados *European Nucleotide Archive*, RefSeq, BLASTN (fazendo-se vários alinhamentos tanto com o genoma de *Cantharellus cibarius* como com o genoma de *Homo sapiens*), *Ensembl* e *EnsemblFungi*, *MycobankDatabase*, *Fungal Barcoding Database*, NONCODE, NRDR, miRBase, Rfam, miR2Disease e OncomiRDB de modo a determinar possíveis similaridades com RNAs já existentes.

3.9. Tratamento de células Caco-2 com a fração CC3

Com o objetivo de estudar o mecanismo de desenvolvimento do cancro e os efeitos da citoterapia, na década de 70, estabeleceram-se, a partir de tumores gastrointestinais, várias linhas celulares epiteliais. Foi então que, em 1977, devido a estudos efetuados por Jorgen Fogh no *Sloan-Kettering Cancer Research Institute*, ficou conhecida a linha celular epitelial Caco-2, uma linha obtida a partir de um adenocarcinoma colorretal humano (Fogh *et al.*, 1977).

A linha celular Caco-2 tem sido vastamente utilizada como modelo de estudo da barreira epitelial intestinal uma vez que duas das suas maiores vantagens são a sua capacidade de

diferenciação espontânea em *monolayer* e a sua capacidade de expressar aspetos de diferenciação característicos de células intestinais maduras, fazendo assim com que estas células sejam consideradas ferramentas essenciais para estudos *in vitro* relacionados com a função e diferenciação das células intestinais (Lea, 2015).

Protocolo 16: Verificação do efeito antitumoral de CC3 em células Caco-2

Adesão das células à caixa de cultura:

1. Começou por se retirar um *stock* de células Caco-2 criopreservadas que foi colocado a 37°C de modo a atingir uma temperatura ótima para a execução do procedimento;
2. Em duas caixas T25, colocaram-se 4 mL de meio de cultura *amnio* completo, contendo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (*Gibco*TM), suplemento amniótico, penicilina, glutamina e soro fetal bovino (FBS, *Fetal Bovine Serum*) (*Gibco*TM);
3. Colocou-se o conteúdo da alíquota com as células na caixa T25 e incubou-se a 37°C até estas aderirem à mesma;

Preparação das lâminas:

4. Numa caixa de *Petri*, colocou-se uma quantidade suficiente de HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) (*Gibco*TM), de modo a lavar a lâmina que será posteriormente utilizada.
5. Deixou-se secar bem;

Colocar as células em lâminas

6. Uma vez aderidas, retirou-se o meio anterior;
7. Lavou-se a caixa e as respetivas células com HBSS de modo a retirar todos os componentes do meio antigo, bem como possíveis células mortas para que estas não sejam um fator inibitório da ação da tripsina que irá ser utilizada de seguida;
8. Colocou-se 1 mL de tripsina (*Gibco*TM) na caixa de cultura e deixou-se atuar por 2 minutos a 37°C ou até se observar o desprendimento das células à caixa de cultura;
9. Posteriormente, colocou-se 1 mL de meio previamente preparado contendo 2% de FBS, 1% de glutamina e 1% de ampicilina na caixa de cultura de modo a inibir a ação da tripsina;
10. Num *ependorf*, colocaram-se 20 µL de células juntamente com 20 µL de *Trypan Blue*;
11. Com auxílio de uma câmara de *Neubauer*, efetuou-se a contagem do número de células de modo a, posteriormente, se saber a quantidade de cultura a colocar na lâmina de forma a se obter uma concentração de 1×10^5 células por lâmina;

12. Finalizada a contagem, colocaram-se, aproximadamente, 208 μL de células Caco-2 num tubo de vidro juntamente com 1800 μL de meio de cultura;
13. Desta preparação, colocou-se 1 mL sobre duas lâminas (0,5 mL em cada, em zig-zag);
14. Numa das lâminas colocaram-se 25 μL de meio (lâmina controlo) e na outra, 25 μL de CC3 (1 mg CC3/100 μL HBSS);
15. As lâminas foram observadas e fotografadas às 0, 24 e 48h.

3.10. *Fluorescent in situ hybridization* (FISH)

A hibridização *in situ* por fluorescência (FISH, *Fluorescent In Situ Hybridization*) é uma técnica que foi inicialmente desenvolvida como uma ferramenta de mapeamento físico para mapear genes nos cromossomas. No entanto, após anos de avanços científicos, esta metodologia é, atualmente, muito utilizada para os mais diversos fins tais como a análise global de genomas, permitindo o diagnóstico de aneuploidias, microdeleções, microduplicações e rearranjos, análise citogenética do cancro e estudos de expressão e localização de RNAs. Avanços recentes têm também permitido melhorar a utilização de sistemas de imagem de elevada resolução para a posterior visualização direta da organização cromossómica intranuclear e do perfil de transcrição do RNA em células isoladas, permitindo assim visualizar a estrutura genómica intranuclear e a dinâmica transcricional subcelular de muitos genes, revelando a sua localização em vários processos biológicos (Cui *et al.*, 2016).

A técnica FISH é vastamente utilizada à escala laboratorial, pois é uma tecnologia de elevada sensibilidade e especificidade no reconhecimento de sequências específicas de DNA ou RNA, para além disso, tem aplicação direta tanto para cromossomas metafásicos como para núcleos interfásicos, permitindo também uma visualização de sinais de hibridação ao nível de uma única célula. Referindo, especificamente, ao RNA: esta técnica permite a deteção e localização de sequências específicas de RNA, em tecidos ou células individualizadas morfológicamente conservadas (Cui *et al.*, 2016). Dependendo do tipo de material a analisar, a técnica assume diferentes denominações, se o material a hibridar for DNA, denomina-se DNA-FISH, se for RNA, assume a denominação de RNA-FISH (em ambos os casos a sonda utilizada é de DNA).

Protocolo 17: PCR de marcação para posterior execução da técnica de RNA *Fluorescent in situ hybridization* (RNA-FISH) – Preparação da sonda

1. Preparou-se a mistura de reação apresentada na Tabela 3.11;

Tabela 3.11: Mistura de reação preparada para a realização do PCR de marcação.

Mistura de reação	Quantidade (µL)
DNA plasmídico (O_RT_Clone2)	1
Tampão PCR 10x [com (NH ₄) ₂ SO ₄] (MBI Fermentas, Thermo Scientific)	5
Mistura de dNTP's de marcação (Invitrogen, Life Technologies) ⁽¹⁾	5
MgCl ₂ a 25 mM (MBI Fermentas, Thermo Scientific)	3
“Primer M13 forward” (1 µg/mL) ⁽²⁾ (Invitrogen, Life Technologies)	1
“Primer M13 reverse” (1 µg/mL) ⁽³⁾ (Invitrogen, Life Technologies)	1
Digoxigenina-11-dUTP (1 mM) (Roche, Life Science)	1,5
Água ultrapura (Gibco, Invitrogen, Life Technologies)	31,5
Taq DNA polimerase (MBI Fermentas, Thermo Scientific)	1
Volume final (µL):	60

⁽¹⁾ Os nucleótidos dATP, dCTP e dGTP, encontram-se a uma concentração de 2 mM e o nucleótido dTTP encontra-se a uma concentração de 1,5 mM

⁽²⁾ “Primer M13 forward” (21 bp): 5'- CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'

⁽³⁾ “Primer M13 reverse” (21 bp): 5'- AGCGGATAACAATTCACACAGG-3'

2. De seguida, colocou-se a mistura de reação no termociclador. O programa utilizado está descrito na Tabela 3.12;

Tabela 3.12: Programa utilizado na reação de PCR de marcação.

Temperatura (°C)	Duração	Fase
94	5 minutos	Desnaturação inicial
94	30 segundos	Desnaturação <i>Annealing</i> Extensão
54	30 segundos	
72	90 segundos	
72	5 minutos	Extensão final
4	Indeterminado	Pausa

← 29 ciclos

Protocolo 18: RNA *Fluorescent in situ hybridization* (RNA-FISH)

As lâminas previamente preparadas e observadas, como descrito no **Protocolo 16**, foram utilizadas para a realização da técnica de RNA-FISH, tratando-se assim de células aderidas em lâmina colocadas num *quadriperm*.

Preparação do material alvo

1. Retirou-se o meio do *quadriperm* e efetuou-se duas lavagens das lâminas em 4 mL de *PBS* (*Phosphate-buffered saline*) *1x RNase free* de modo a remover todo o meio de cultura aí presente. Este processo deve ser rápido de modo a evitar a secagem das lâminas;

Fixação

Esta etapa permite que ocorra uma imobilização dos processos celulares, ficando estes processos bloqueados neste exato momento. Este fenómeno ocorre devido ao PFA (paraformaldeído) que tem uma ação de *crosslinking* proteico.

2. Adicionaram-se 4 mL de PFA a 2% às laminas e deixou-se atuar durante 20 minutos;
3. Efetuaram-se três lavagens em *PBS 1x RNase free*, com duração de 5 minutos cada banho;

Permeabilização

No processo anterior (fixação) ocorreu *crosslinkg* proteico, assim, de modo a tornar os alvos celulares disponíveis para a deteção, é necessário efetuar um passo de permeabilização com Triton X-100 a 0,5% (*RNase free*), sendo o tempo de atuação deste rigorosamente controlado de modo a que não ocorra perda celular. Esta é considerada a etapa mais importante do RNA-FISH, uma vez que dela depende o sucesso de todo o procedimento, pois as células devem ser permeabilizadas de modo a que a sonda consiga aceder ao núcleo das mesmas, mas sem afetar a morfologia e a capacidade de adesão das células ao substrato,.

4. Adicionaram-se 4 mL de Triton X-100 a 0,5% e deixou-se atuar durante alguns minutos, controlando ao microscópio invertido, de modo a que não ocorra levantamento celular;
5. Efetuaram-se três lavagens com *PBS 1x RNase free*, com duração de 5 minutos cada banho;

Desidratação

6. Procedeu-se à desidratação das lâminas em banhos sequenciais de etanol a 70%, 90% e 100%, tendo cada banho a duração de 3 minutos;

7. Deixou-se as lâminas secar ao ar;

Desnaturação da sonda

8. A 8 μ L de produto PCR marcado (ORT clone 2 – **Protocolo 16**) adicionaram-se 22 μ L de “solução de hibridação”, sendo esta mistura colocada no *termoblock* (*Eppendorf – Thermomixer confort*) a 35°C e a 650 rpm até estar completamente homogênea;
9. A sonda foi desnaturada a 85°C, durante 15 minutos no termociclador;
10. Após finalizada a desnaturação, a sonda foi imediatamente transferida para o gelo de modo a impedir a renaturação da mesma;

Hibridação *In Situ*

11. Colocaram-se 30 μ L de sonda desnaturada na lamela (repartidos em duas gotas) e, de seguida, foi colocada a lâmina por cima, sendo por fim, selada com cola apropriada;
12. As lâminas foram incubadas durante dois dias a 37°C numa câmara húmida;

Lavagens pós-hibridação

13. Após decorrido o período anterior, retiraram-se as lamelas das lâminas e, as mesmas, foram submetidas a 4 banhos sequenciais, de 5 minutos cada, a 42°C:

1º banho: 2xSSC (*Saline Sodium Citrate*)

2º e 3º banho: 0,1xSSC

4º banho: 2xSSC

14. Após os 4 banhos, as lâminas foram transferidas para uma solução de 4xT (*Detergent Wash Solution – 4xSSC em 0.05% Tween 20*), seguindo-se por uma passagem em PBST (*Phosphate Buffered Saline with Tween 20*) 0,05%, até serem utilizadas no passo seguinte;

Deteção dos locais de Hibridação

Como descrito no **Protocolo 16**, a sonda foi marcada com Digoxigenina-11-dUTP, assim, para a sua deteção vai ser utilizada anti-digoxigenina-rodamina (*Roche, Life Science*). De notar que a anti-digoxigenina-rodamina se encontra ligada à 5'TAMRA (5-carboxi-tetrametilrodamina, rodamina), que quando excitada no comprimento de onda de 542 nm, emite perto dos 568 nm, originando assim uma coloração vermelha;

15. Adicionaram-se 100 μ L de solução FBS 10%, de modo a proceder ao bloqueio dos locais de ligação inespecífica;

16. Colocou-se uma lamela por cima e incubaram-se as lâminas numa câmara húmida a 37°C, durante 30 minutos;
17. Foi preparada uma solução de deteção constituída por 0,5 µL de rodamina em 100 µL de FBS 5% (1:200), sendo esta quantidade preparada para cada lâmina. Uma vez que esta solução é fotossensível, deve ser preparada e manuseada ao abrigo da luz;
18. Após decorridos os 30 minutos de bloqueio, adicionaram-se 100 µL da solução de deteção preparada em cada lâmina sendo, de seguida, colocada uma lamela por cima;
19. As lâminas foram incubadas durante 1h a 37°C numa câmara húmida;
20. Decorrido este período, foram realizadas duas lavagens em PBST 0,05% e uma lavagem em 1xPBS, de 5 minutos cada uma, tendo em atenção que as lâminas devem estar sempre protegidas da luz;

Montagem das lâminas e visualização ao microscópio de fluorescência

21. Sem nunca deixar as lâminas secar, retirou-se o excesso de solução das mesmas;
22. Por fim, no centro de uma lamela, colocou-se uma gota de meio de montagem com DAPI (*4',6- diamino-2-phenylindole*) (*Mounting Medium with DAPI – Vectashield, Vector laboratories*) e deixou-se cair a lâmina em cima da lamela;
23. As lâminas foram, de seguida, observadas e analisadas ao microscópio de fluorescência.

Capítulo 4

Resultados

Capítulo 4: Resultados

✓ Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos através da execução dos protocolos descritos no capítulo anterior. A exposição dos mesmos será feita em subtópicos para facilitar a sua apresentação e compreensão. Inicialmente serão apresentados os resultados referentes à extração, isolamento e purificação de biopolímeros e à caracterização química de *Cantharellus cibarius* e, por fim, os resultados referentes à sequenciação da fração de interesse neste estudo (CC3) e os resultados demonstrativos da sua capacidade antitumoral.

4.1. Extração e isolamento de biopolímeros

De modo a proceder ao isolamento do material de elevado peso molecular (HMWM), foi necessário, em primeiro lugar, obter o material insolúvel em álcool (AIR), seguido da obtenção do material solúvel em água (WSM). Através da pesagem do material inicial e do material recolhido e liofilizado no final de cada processo foi possível concluir qual o rendimento do processo de isolamento de cada um destes materiais (Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Rendimento, em percentagem (%), obtido para o isolamento do AIR, WSM e HMWM de *Cantharellus cibarius*. Na tabela está representado o rendimento do isolamento de cada material relativamente à massa da fração anteriormente utilizada e à massa inicial de cogumelo liofilizado.

Material	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Rendimento (%) ⁽¹⁾	Rendimento (%) ⁽²⁾
AIR	90,62 g de <i>C. cibarius</i>	67,59 g de AIR	74,6	74,6
WSM	67,59 g de AIR	18,13 g de WSM ⁽³⁾	26,8	20,0
HMWM	16,83 g de WSM	1,77 g de HMWM	10,5	2,1

⁽¹⁾ Percentagem de material recuperado relativamente à massa da amostra anterior;

⁽²⁾ Percentagem de material recuperado relativamente à massa inicial de cogumelo liofilizado;

⁽³⁾ Das quais foram retiradas 1,3 g para análises complementares.

Cantharellus cibarius é constituído por 74,6% de AIR, do qual fazem parte proteínas, glicoproteínas e polissacáridos, que são insolúveis nestas condições. Os biopolímeros solúveis em água (WSM) foram isolados a partir do AIR, através da sua fervura em água e posterior filtração, e constituem apenas 26,8% do mesmo o que corresponde a 20,0% da massa inicial dos cogumelos secos. Tendo como referência o WSM, foi obtido 10,5% de HMWM, correspondendo a, aproximadamente, 2,1% da massa inicial dos cogumelos secos, o qual contém o material de interesse para o estudo, o RNA.

De seguida, foi realizado o fracionamento e purificação do HMWM, por cromatografia de troca aniônica, sendo possível isolar três frações distintas: CC1, CC2 e CC3, cujos rendimentos serão apresentados no tópico seguinte.

4.2. Fracionamento e purificação do material de elevado peso molecular (HMWM)

O HMWM foi submetido a cromatografia de troca aniônica de modo a ser fracionado e purificado resultando em três frações distintas: CC1, correspondente ao material não retido na coluna cromatográfica e CC2 e CC3, ambas correspondentes ao material retido na coluna.

O material foi ressuspensão em tampão inicial de acetato de sódio e sujeito a centrifugação de modo a remover o material insolúvel para, posteriormente, se proceder à sua injeção.

Do programa associado ao aparelho de cromatografia utilizado foi possível obter valores de absorvância relativos à amostra que passava no detetor do aparelho nos variados instantes de análise. A partir desses valores, construiu-se um cromatograma relativo à absorvância da amostra em função do tempo decorrido (Figura 4.1)

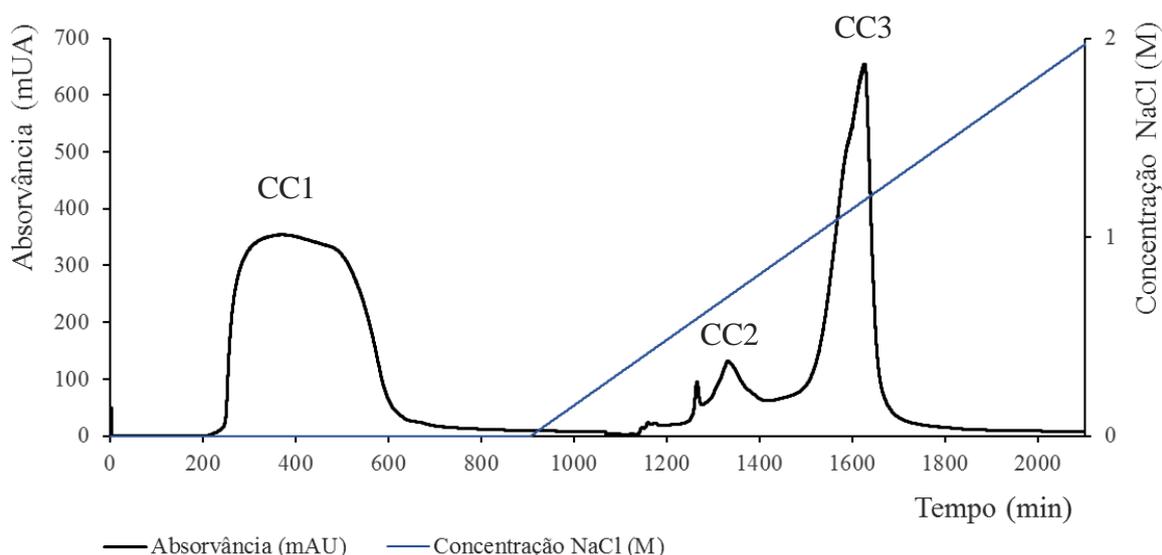


Figura 4.1: Cromatograma obtido por cromatografia de troca aniônica resultante da injeção e eluição do material de elevado peso molecular (HMWM) isolado de *Cantharellus cibarius*. Detecção realizada na zona do ultravioleta (UV) sendo utilizado um comprimento de onda de 257 nm. Na figura é também possível observar o gradiente de concentração de NaCl utilizado para o processo de eluição. O material não retido na coluna cromatográfica deu origem à fração CC1, o material eluído com um gradiente de 0 a 1 M de NaCl originou a fração CC2 e a eluição com concentrações de 1 a 2 M de NaCl deu origem à fração CC3.

Primeiramente, realizou-se a injeção do material na coluna com um fluxo de 0,1 mL/min, da qual resultou a fração não retida (CC1 – correspondente à primeira curva visualizada no cromatograma), sendo o tempo de retenção da mesma de, aproximadamente, 400 minutos e tendo atingido uma absorvância máxima de, aproximadamente, 350 mUA. O material não retido está dividido por 23 tubos (contendo 5 mL cada) que no final do processo foram juntos num só, resultando então na fração CC1.

De seguida, procedeu-se à eluição do material retido na coluna com um fluxo de 0,25 mL/min obtendo-se assim duas frações: a primeira resultante do gradiente de eluição de NaCl desde o instante inicial até atingir a concentração de 1 M, originando a fração CC2 com um máximo de absorvância de, aproximadamente, 150 mUA e a segunda, resultante da eluição do gradiente de NaCl desde a concentração de 1 M até atingir os 2 M, resultando na fração CC3, com um máximo de absorvância de, aproximadamente, 650 mUA. Deste procedimento resultaram, no total, 79 tubos com 3,75 mL cada. Ambas as frações podem também ser visualizadas através dos respetivos picos, no entanto para proceder à separação dos tubos recolhidos nas frações principais foi necessário a execução do procedimento de determinação colorimétrica de açúcares totais de modo a complementar os dados aqui obtidos.

Entre os 1450 e os 1650 min, no pico correspondente à fração CC3, verificou-se um valor de absorvância bastante elevado. Uma vez que a absorvância detetada é proporcional à concentração do material na amostra, presume-se que *C. cibarius* tem um elevado teor de RNA.

4.3. Caracterização química das frações

4.3.1. Determinação colorimétrica dos açúcares totais

Para analisar a presença de açúcares nas frações recolhidas, procedeu-se ao método do ácido fenol-sulfúrico, que consistiu na adição de fenol a 5% e H₂SO₄ concentrado à amostra e, por fim, na realização da leitura, de todos os 102 tubos recolhidos anteriormente, da absorvância a 490 nm. Com os dados obtidos, e recorrendo à ferramenta *Microsoft Excel 2016*, executou-se, de seguida, a construção do gráfico representado na Figura 4.2 que permitiu inferir, juntamente com o perfil de absorvância a 257 nm (Figura 4.1), quais os tubos que correspondem, especificamente, a cada fração principal (CC1, CC2 e CC3).

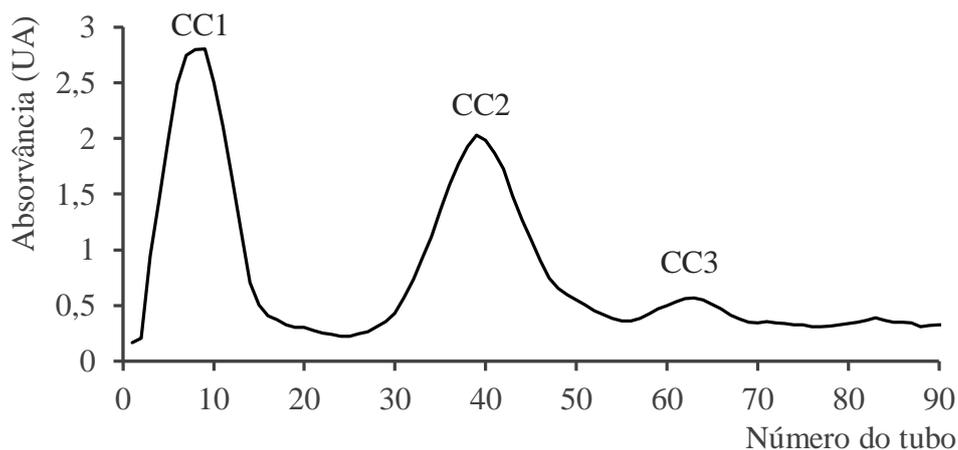


Figura 4.2: Cromatograma obtido no procedimento de pesquisa de açúcares totais do material de elevado peso molecular (HMWM) isolado de *Cantharellus cibarius*, pelo método do ácido fenol-sulfúrico. Absorvâncias lidas no espectrofotômetro UV-vis a 490 nm. Os tubos numerados de 1 a 23 deram origem à fração CC1, os de 24 a 53 à CC2 e os tubos numerados de 54 a 69 à fração CC3.

Por interligação de dados, sabemos então que a fração CC1 compreende os tubos de 1 a 23, a fração CC2 engloba os tubos de 24 a 53 e a fração CC3 corresponde aos tubos de 54 a 69, sendo os restantes 33 descartados por apenas serem constituídos por tampão e nenhum material de interesse.

Uma vez que a concentração em açúcares é proporcional ao valor de absorvância registrado, na Figura 4.2 verifica-se que as frações CC1 e CC2 apresentaram um elevado teor em açúcares e que a abundância relativa de açúcares na fração CC3 foi muito menor do que nas anteriores. A composição dos mesmos nas 3 frações foi determinada e será apresentada no tópico seguinte.

Após a execução do método do ácido fenol-sulfúrico, as frações foram então agrupadas de forma apropriada e sujeitas a diálise seguida de liofilização. Depois destes dois procedimentos foi executada a pesagem de cada fração e, recorrendo a esses valores, calculou-se o rendimento do processo de fracionamento/purificação para cada uma das frações recolhidas (Tabela 4.2).

Tabela 4.2: Rendimento, em percentagem (%), obtido para as frações CC1, CC2 e CC3, conseguidas após fracionamento do material de elevado peso molecular (HMWM) com uma massa inicial de 800 mg.

Fração	Massa inicial de HMWM (g)	Massa final da fração (g)	Rendimento (%)
CC1	0,800	0,170	21,3
CC2	0,800	0,163	20,3
CC3	0,800	0,118	14,8

Do material inicialmente utilizado (800 mg de HMWM), obtiveram-se 170 mg de fração CC1, o correspondente a 21,3% do material inicial, 162,7 mg de fração CC2, correspondendo a 20,3% do HMWM e 117,9 mg da fração CC3, correspondendo a 14,8% do material inicial.

Verificou-se que no final do processo se perderam 349,4 mg de HMWM, correspondendo a uma perda de, aproximadamente, 43,7% do material inicialmente pesado, recuperando-se 56,33% do material aplicado no procedimento. Esta perda de material corresponde ao material que permaneceu insolúvel durante o processo de redissolução da amostra e que foi removido por centrifugação antes da injeção, bem como ao material que pode ter ficado irreversivelmente adsorvido na coluna de troca aniónica.

4.3.2. Determinação da composição em açúcares

A composição em açúcares foi determinada por HPAEC-PAD para as amostras WSM, HMWM, CC1, CC2 e CC3 após hidrólise ácida com H₂SO₄.

Os padrões foram construídos a partir de 10 açúcares diferentes, com diferentes concentrações em cada padrão: Fucose (Fuc), Ramnose (Rha), Arabinose (Ara), Galactose (Gal), Glucose (Glc), Xilose (Xyl), Manose (Man), Ribose (Rib), Ácido galacturónico (GalA), Ácido glucurónico (GlcA), para além destes foi também adicionado um padrão interno (PI) de 2-desoxiglucose.

Finalizada a análise foram obtidos vários cromatogramas para os padrões, dos quais foram também obtidas curvas de calibração para cada um dos açúcares que permitiram, posteriormente, ficar a conhecer a quantidade de cada açúcar presente nas amostras.

Os cromatogramas relativos às frações analisadas podem ser observados, de seguida, nas Figuras 4.3 a 4.7.

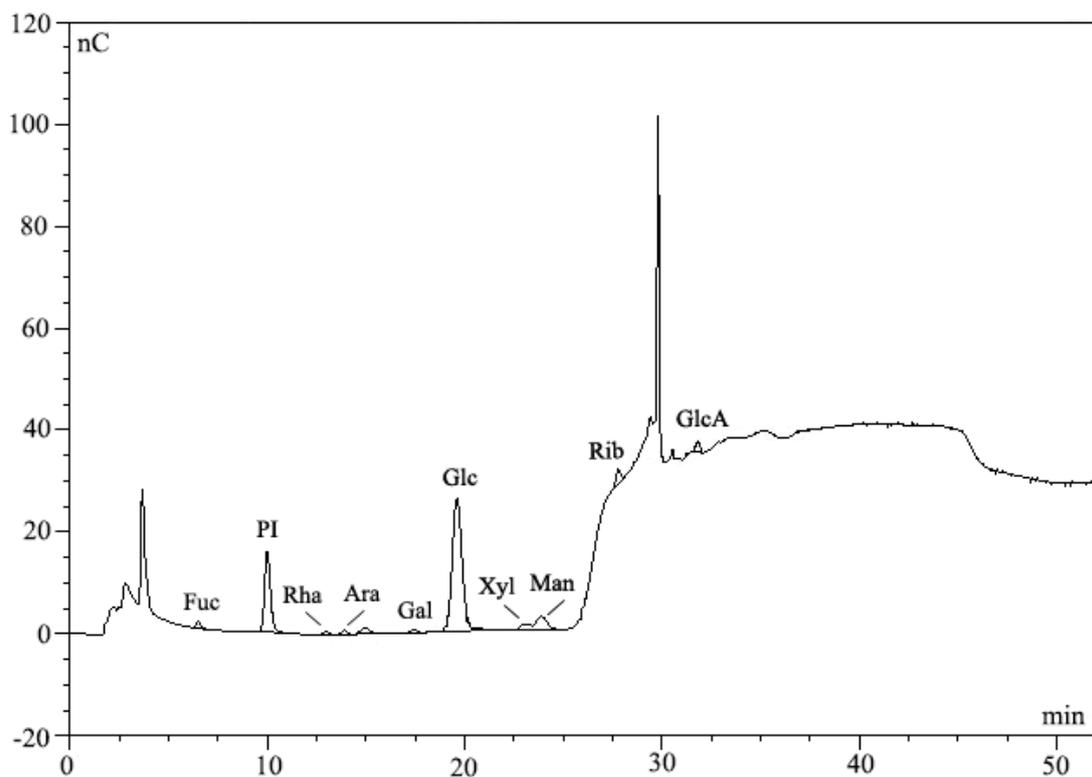


Figura 4.3: Cromatograma HPAEC-PAD de açúcares liberados após hidrólise ácida do material solúvel em água (WSM) isolado de *Cantharellus cibarius*.

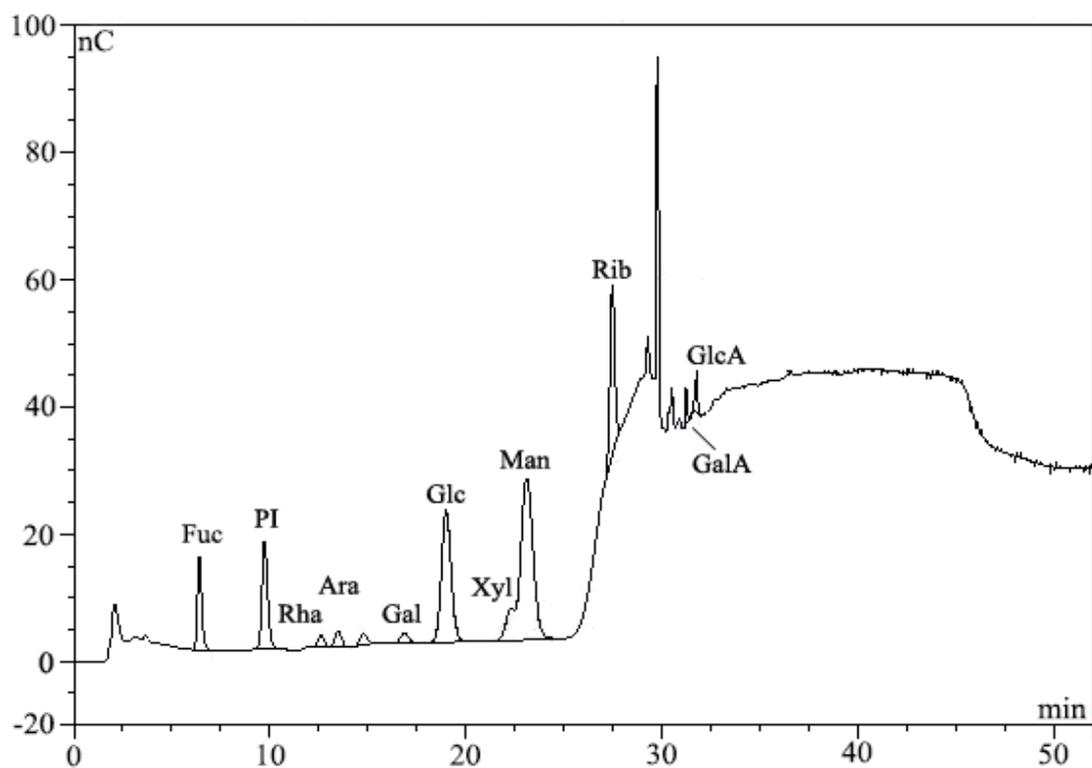


Figura 4.4: Cromatograma HPAEC-PAD de açúcares liberados após hidrólise ácida do material de elevado peso molecular (HMWM) isolado de *Cantharellus cibarius*.

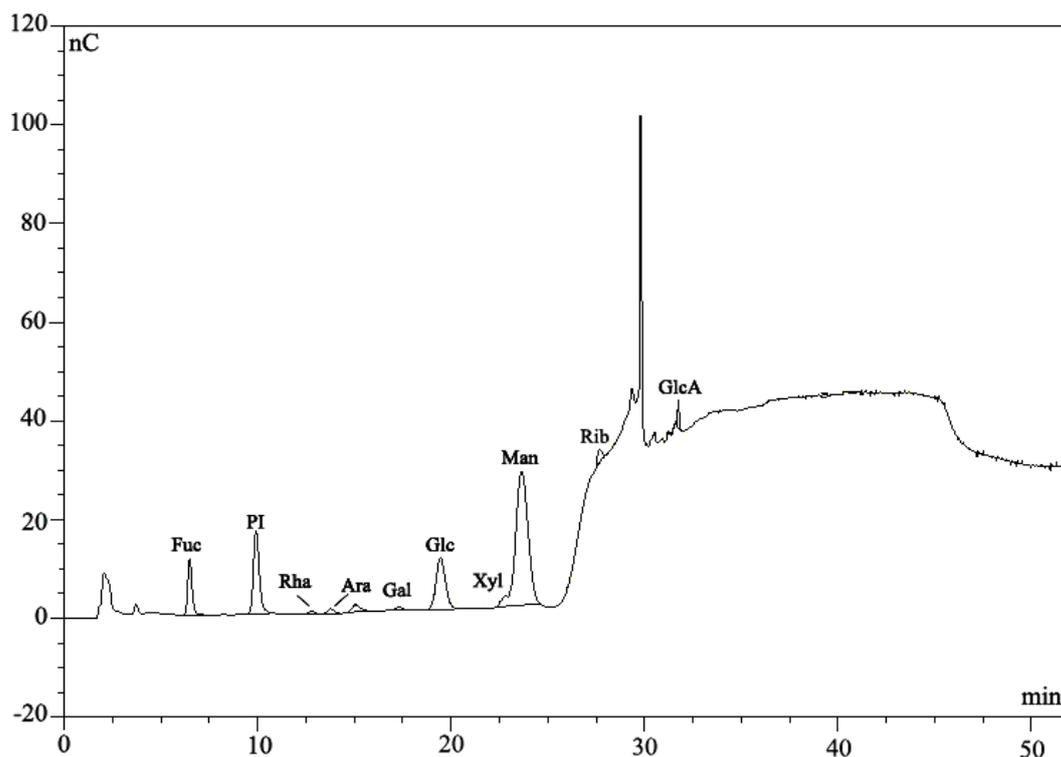


Figura 4.5: Cromatograma HPAEC-PAD de açúcares liberados após hidrólise ácida da fração CC1 isolada de *Cantharellus cibarius*.

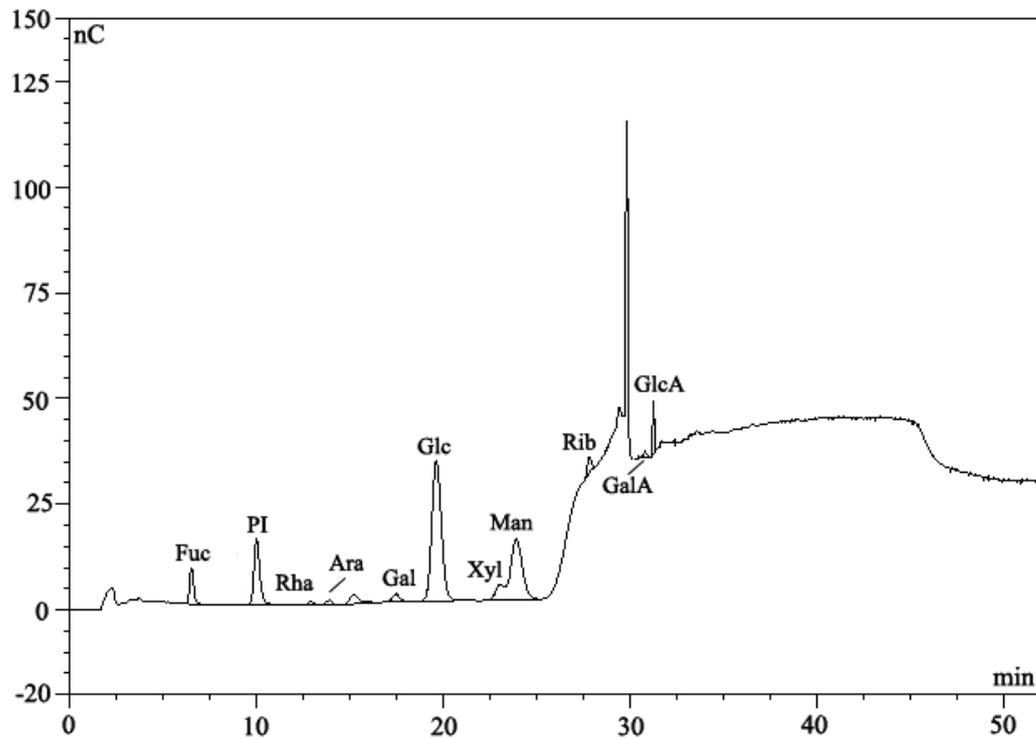


Figura 4.6: Cromatograma HPAEC-PAD de açúcares liberados após hidrólise ácida da fração CC2 isolada de *Cantharellus cibarius*.

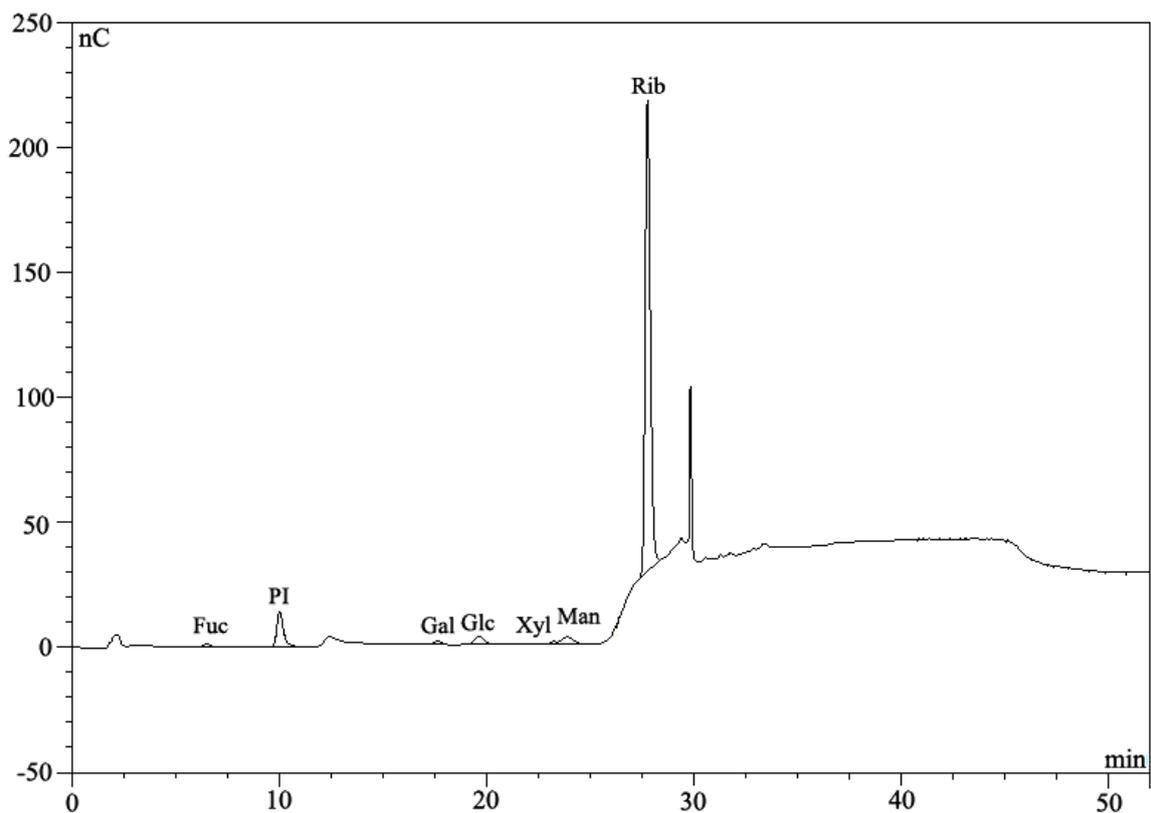


Figura 4.7: Cromatograma HPAEC-PAD de açúcares liberados após hidrólise ácida da fração CC3 isolada de *Cantharellus cibarius*.

A partir dos cromatogramas apresentados, por tratamento apropriado dos dados obtidos e recorrendo às curvas de calibração efetuadas para os padrões, construiu-se uma tabela resumo (Tabela 4.3) na qual se apresenta a composição em açúcares, em percentagem, de cada amostra analisada.

Tabela 4.3: Rendimento e composição em açúcares das amostras WSM e HMWM e das frações CC1, CC2 e CC3 extraídas e purificadas de *Cantharellus cibarius*. Valores obtidos recorrendo às curvas de calibração referentes a cada padrão de açúcar. Rendimento dado em percentagem \pm desvio padrão para $n = 3$.

Açúcar	WSM	HMWM	CC1	CC2	CC3
Fucose	$0,9 \pm 0,4$	$7,0 \pm 0,7$	$4,6 \pm 0,8$	$3,3 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,7$
Rha	$1,6 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,0$	$1,2 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,2$	n.d ⁽¹⁾
Ara	$0,7 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	n.d ⁽¹⁾
Gal	$1,5 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,7$	$1,3 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,6$	$1,2 \pm 0,2$
Glc	$19,4 \pm 1,1$	$14,3 \pm 1,0$	$6,6 \pm 1,0$	$25,1 \pm 1,2$	$2,1 \pm 0,5$
Xyl	$1,4 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,1$
Man	$0,7 \pm 0,2$	$26,2 \pm 0,3$	$27,0 \pm 0,2$	$14,6 \pm 0,9$	$1,3 \pm 0,5$
Rib	$0,4 \pm 0,0$	$2,8 \pm 0,3$	$0,2 \pm 0,0$	$0,4 \pm 0,0$	$22,4 \pm 1,0$
GalA	n.d ⁽¹⁾	$0,1 \pm 0,0$	n.d ⁽¹⁾	$0,7 \pm 0,1$	n.d ⁽¹⁾
GlcA	$1,2 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,0$	$0,5 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,3$	n.d ⁽¹⁾
Total de açúcares	$27,9 \pm 1,7$	$55,0 \pm 2,0$	$43,2 \pm 2,3$	$49,0 \pm 2,8$	$29,3 \pm 1,4$

⁽¹⁾ n.d – não detetado

Em relação ao material solúvel em água (WSM), foi possível observar que foram encontrados 9 dos 10 açúcares adicionados aos padrões, tendo sido o ácido galacturónico praticamente inexistente ou nulo, pelo que não foi detetado. Por observação das áreas referentes a cada pico (área proporcional à concentração de cada açúcar na amostra) no cromatograma (Figura 4.3) e da Tabela 4.3 verifica-se que o açúcar em maior quantidade foi a glucose, constituindo 19,4% deste material, distinguindo-se assim dos restantes que estão em muito menor quantidade. Os açúcares em menor quantidade foram a manose e a arabinose, que constituem 0,7% da totalidade da amostra. A amostra possuiu um total de 27,9% de açúcares.

Por observação do cromatograma (Figura 4.4) e da coluna na Tabela 4.3 relativa ao material de elevado peso molecular (HMWM) verifica-se que foram detetados os 10 açúcares adicionados aos padrões. O açúcar maioritário foi a manose, constituindo 26,2% do HMWM, seguido da glucose, com 14,3%. O açúcar em menor quantidade foi o ácido galacturónico, constituindo apenas 0,1% do material de análise. Esta fração possuiu um total de 55% de açúcares, uma quantidade bastante superior relativamente à fração anterior.

Na fração CC1, o açúcar presente em maior quantidade foi a manose, com 27% e o açúcar minoritário foi a ribose, não tendo sido detectado o ácido galacturónico. Esta fração apresentou 43,2% de açúcares.

Na fração CC2, o açúcar maioritário foi a glucose, constituindo cerca de 25,1% da fração. Os açúcares minoritários foram os mesmos detetados na fração anterior: ácido galacturónico e manose. Esta fração possuiu um total de 49% de açúcares.

Relativamente à fração de interesse, CC3, foi possível verificar que muitos dos açúcares anteriormente detetados não o foram, apenas estando presentes a fucose, galactose, glucose, xilose, manose e ribose. O açúcar maioritário é, sem margem para dúvidas, a ribose, constituindo cerca de 22,4% desta fração, o que mais uma vez vem confirmar a sua natureza rica em RNA. Todos os restantes açúcares apareceram em concentrações muito mais reduzidas. Esta fração possuiu um total de 29,3% de açúcares, ou seja, a ribose constituiu 76,5 % dos açúcares totais presentes em CC3, permitindo concluir que se encontra com um elevado grau de pureza. Quando comparado o teor de ribose presente na fracção CC3 com o teor presente no HMWM podemos concluir que a cromatografia de troca aniónica permitiu um enriquecimento (em 8 vezes) no teor de RNA, com a fracção CC3 a corresponder à quase totalidade do conteúdo de ribose presente no HMWM ($118 \pm 14\%$).

4.3.3. Pesquisa de ácidos nucleicos

a) Espectrofotometria de absorção UV-vis

De modo a confirmar a presença de ácidos nucleicos no cogumelo em estudo e a descartar a hipótese dos mesmos terem sido destruídos durante os procedimentos realizados (fervura em álcool, fervura em água, diálise e fracionamento), analisaram-se as amostras WSM e HMWM, e a fração CC3, por espectrofotometria UV-vis de onde se obteve um espectro que permitiu não só verificar a presença de ácidos nucleicos na amostra assim como ter uma ideia aproximada da abundância dos mesmos antes e depois do processo de diálise que distingue as duas amostras primeiramente analisadas e do processo de fracionamento do qual se obteve a última amostra.

Os espectros obtidos para cada uma das amostras apresentam-se nas Figuras 4.8, 4.9 e 4.10.

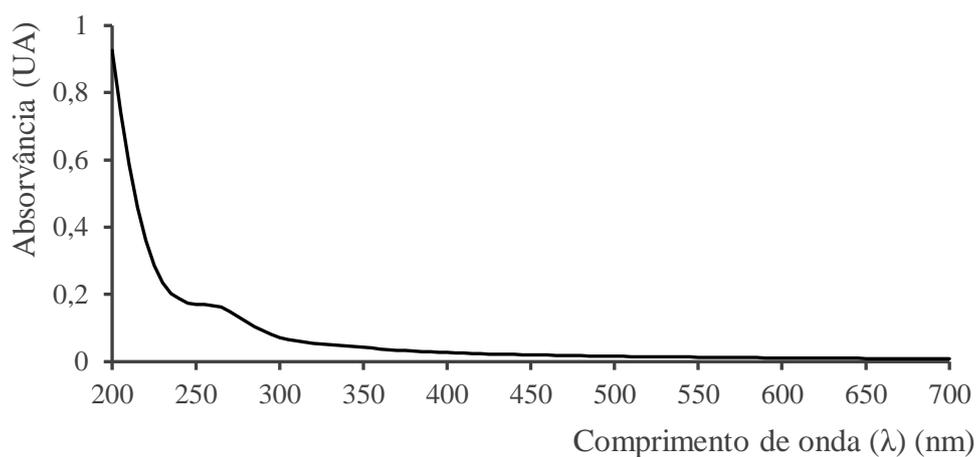


Figura 4.8: Espectro UV-vis das absorvâncias lidas em função do comprimento de onda (700-200 nm) do material solúvel em água (WSM) isolado de *Cantharellus cibarius*.

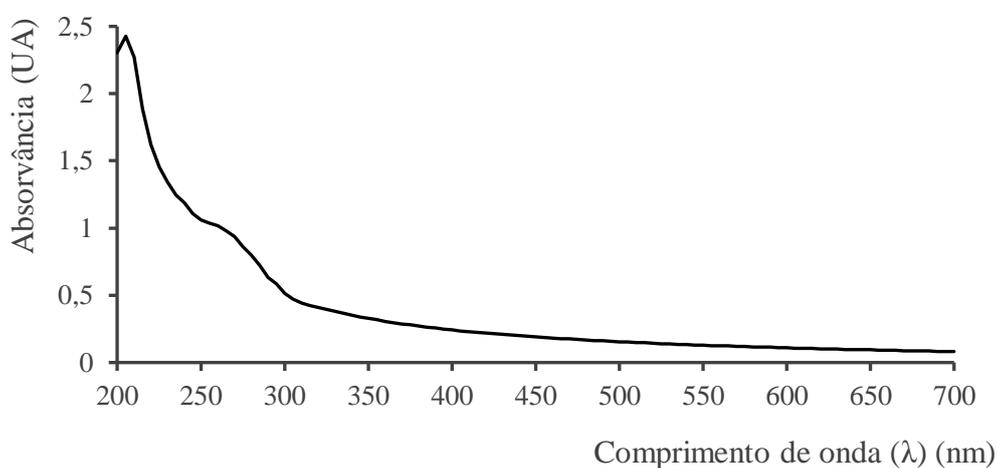


Figura 4.9: Espectro UV-vis das absorvâncias lidas em função do comprimento de onda (700-200 nm) do material de elevado peso molecular (HMWM) isolado de *Cantharellus cibarius*.

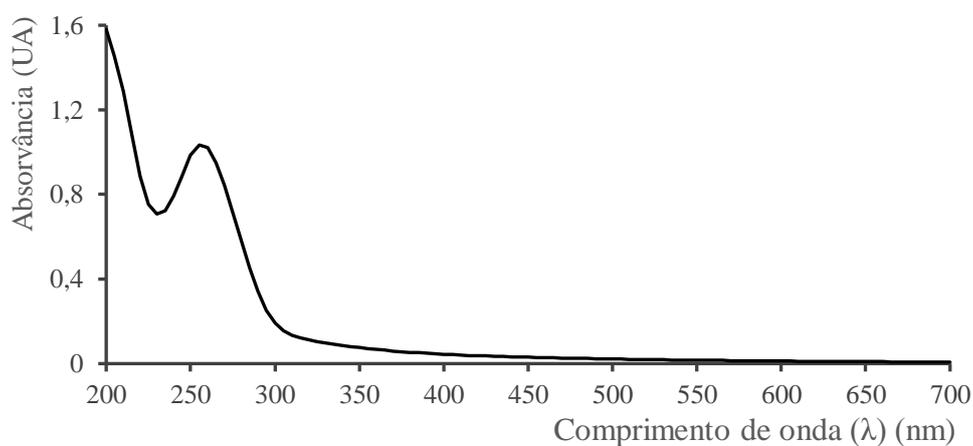


Figura 4.10: Espectro UV-vis das absorvâncias lidas em função do comprimento de onda (700-200 nm) da fração CC3 isolada de *Cantharellus cibarius*.

Como se pode observar nas figuras anteriores, os espectros apresentam um pico de absorvância na região de 257-260 nm. Uma vez que os ácidos nucleicos absorvem, tipicamente, nesse comprimento de onda, verifica-se que se obtiveram espectros típicos dos mesmos. Pela absorvância obtida em cada um dos espectros e de acordo com os resultados obtidos na análise de açúcares, a fracção CC3 apresenta uma abundância de ácidos nucleicos muito superior ao encontrado nas fracções WSM e HMWM. Nestas duas ultimas fracções, também os espectros de UV-Vis mostram a presença de ácidos nucleicos.

b) Eletroforese em gel de agarose

De modo a confirmar a natureza do ácido nucleico presente na amostra e de modo a obter uma ideia preliminar do tamanho do mesmo, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose à fracção CC3.

Dissolveu-se 1 mg de CC3 em 200 μ L de água (*Gibco DNase/RNase free*) e, em três *ependorfs*, colocaram-se quantidades crescentes de amostra: 1, 3 e 6 μ L, de modo a visualizar as diferenças em função da concentração colocada, procedendo-se, de seguida, à eletroforese a 120 mV durante 20 minutos.

No gel obtido (Figura 4.11) é possível identificar uma banda clara e intensa em cada poço, situada no fundo do gel, correspondente a RNA, e com uma intensidade progressivamente maior, à medida que a quantidade de amostra foi aumentada.

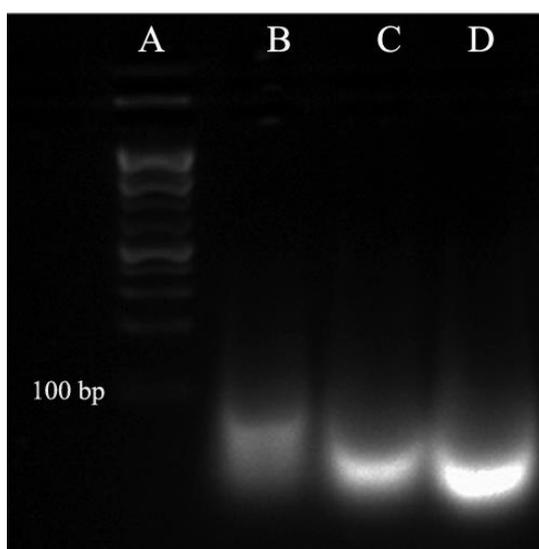


Figura 4.11: Gel de agarose obtido para a fracção CC3 isolada de *Cantharellus cibarius*. A - Marcador molecular 100 bp DNA Ladder (identificação de bandas entre 1000-100bp); B – Poço com 1 μ L de amostra CC3; C – Poço com 3 μ L de amostra CC3; D – Poço com 6 μ L de amostra CC3.

Comparando as bandas obtidas com o marcador molecular utilizado (*100 bp DNA Ladder*, que permite a identificação de bandas com tamanho entre 1000 e 100 bp), embora não seja possível aferir o tamanho exato do RNA em estudo, infere-se que o seu tamanho seja bastante pequeno, menor que 100 bp. Uma vez que a banda não é bem definida, pode-se também concluir, que existem moléculas de RNA com diferentes tamanhos menores que 100 bp.

Simultaneamente, de modo a complementar os resultados obtidos no gel, foi feita uma análise no *NanoDrop*, utilizando-se 1,5 µL de amostra e realizando-se 3 medições para a absorvância a 230, 260 e 280 nm. A respetiva média para cada absorvância assim como a relação A260/A280 e A260/A230 está representada na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Absorvâncias a 230, 260 e 280 nm e relação entre as absorvâncias a 260/280 nm e 260/230 nm da fração CC33 isolada de *Cantharellus cibarius*. Valores correspondentes à média ± desvio padrão para n = 3.

Abs 230	Abs 260	Abs 280	A260/A280	A260/A230
39,41 ± 0,26	78,98 ± 0,24	42,83 ± 0,15	1,84 ± 0,00	2 ± 0,01

Por observação dos dados obtidos, verifica-se que para A260/A280 obteve-se um valor de 1,84 e para A260/A230, um valor de 2, sendo então a relação entre A260/A230 superior à relação entre A260/A280. Relativamente aos valores de absorvância medidos individualmente, obteve-se um valor de 39,41 para a Abs 230, 78,98 para Abs 260 e 42,82 para Abs 280, verificando-se então que existe um pico aos 260 nm, comprimento de onda de absorção típico dos ácidos nucleicos, como já tinha sido verificado pela espectrofotometria de absorção UV-vis.

Inicialmente, foi colocada 1 mg de CC3 em 200 µL de H₂O, sendo portanto a concentração inicial da amostra de 5000 ng/µL. Através da análise no *NanoDrop*, foi possível ficar a conhecer a concentração estimada de RNA na fração CC3, sendo esta de 3159,2 ± 9,76 ng/uL (média ± desvio padrão para n=3), ou seja, 63,2 ± 0,20% da concentração inicial, o que nos indica que a fração CC3 é maioritariamente constituída por RNA, confirmando os resultados obtidos pela análise de açúcares.

c) Espectroscopia de infravermelho com transformadas de *Fourier* (FTIR)

A técnica FTIR é um tipo de espectroscopia de absorção, em que a energia absorvida se encontra na região do infravermelho do espectro eletromagnético. A técnica baseia-se no facto das ligações químicas presentes nas substâncias possuírem frequências de vibração específicas que correspondem a determinados níveis de energia. Caso a molécula receba radiação eletromagnética com a mesma energia de uma dessas vibrações, a luz será absorvida o que dará, posteriormente, origem a um espectro eletromagnético (Simonescu, 2012).

Com o objetivo de, mais uma vez, confirmar a natureza do ácido nucleico presente em CC3 e verificar a presença de possíveis contaminantes, realizou-se a análise FTIR numa região de varrimento dos 400 aos 5000 cm^{-1} , resultando no espectro representado na Figura 4.12.

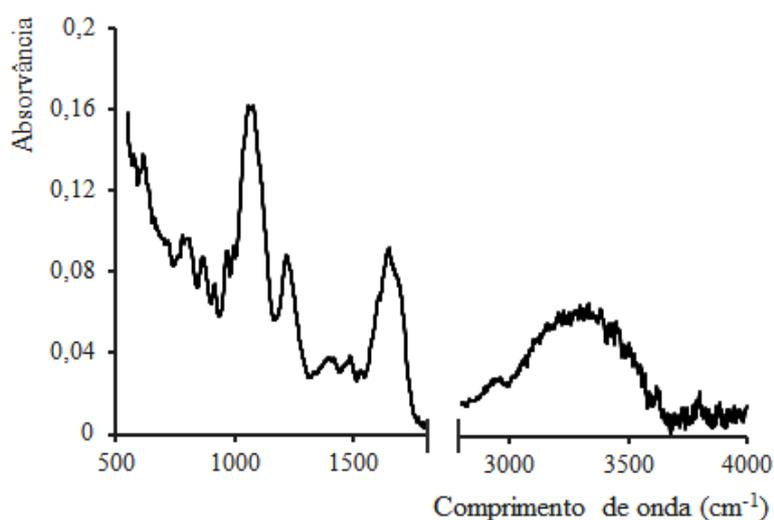


Figura 4.12: Espectro FTIR da fração CC3 isolada de *Cantharellus cibarius* na região de 500–4000 cm^{-1} .

Mais uma vez, a fração CC3 mostrou, claramente, características espectrais indicativas da sua natureza rica em RNA.

Na região de elevada energia, é possível observar uma ampla faixa de absorção centrada aos 3288 cm^{-1} , correspondente ao modo vibracional de alongamento da ligação N-H. E aos 2924 cm^{-1} uma banda correspondente ao modo vibracional de alongamento da ligação C-H do açúcar.

Entre os 1550 e os 1750 cm^{-1} é possível observar uma banda de elevada intensidade correspondente ao modo vibracional de alongamento das ligações N-H e movimentos vibracionais de alongamento de ligação dupla. A região onde se situam estes modos

vibracionais variam nos diferentes tipos de ácidos nucleicos pelo que sabemos, neste caso, se tratar de RNA.

Na região entre os 1300 e 1550 cm^{-1} existem alguns picos de intensidade mais fraca correspondentes a vibrações no plano relativas aos resíduos das bases que envolvem, principalmente, os modos de deformação no plano N-H e C-H que estão acoplados às vibrações do açúcar.

O pico situado por volta dos 1150 e 1300 cm^{-1} corresponde às vibrações de alongamento dos fosfatos simétrico e antissimétrico, não sendo possível, neste caso, a sua diferenciação.

Relativamente aos açúcares tipo-N, são visíveis três bandas de marcadores que aparecem na região dos 882-877, 865-860 e 815-802 cm^{-1} . Quanto aos açúcares do tipo-S aparece apenas uma única banda, aproximadamente nos 842-820 cm^{-1} .

4.3.4. Determinação quantitativa de fosfolípidos e determinação da composição em ácidos gordos da fração CC3

De modo a conhecer o teor em fosfolípidos da fração CC3, procedeu-se à quantificação dos grupos fosfato após extracção da fração CC3 com clorofórmio:metanol (2:1 v/v). A solução obtida foi sujeita a uma hidrólise ácida dos fosfolípidos com a libertação de fosfato inorgânico, o qual foi quantificado após reacção com o molibdato de amónio formando um complexo de cor azul-escura cuja absorvância foi lida num espectrofotómetro UV-vis.

A absorvância detetada pelo aparelho de espectrofotometria para a amostra CC3Lípidos foi de 0,041 UA assim, recorrendo à curva de calibração efetuada, infere-se que a concentração de fósforo na amostra seja de 0,001088 $\text{mg}/\mu\text{L}$. Por cálculos complementares, foi possível inferir a quantidade de fosfolípidos, em percentagem, presente na fração CC3. Assim, estima-se que a fração CC3 seja constituída por **0,54% de fosfolípidos**.

De modo a identificar a composição em ácidos gordos dos fosfolípidos presentes na fração CC3 isolada de *C. cibarius* estes foram analisados por cromatografia gasosa após transesterificação com metanol. Na Figura 4.13 é possível observar quais os ácidos gordos presentes. Apresenta-se também a Tabela 4.5 que resume a composição em ácidos gordos dos fosfolípidos da fração CC3, com o seu respetivo tempo de retenção e teor, em percentagem de área.

Tabela 4.5: Composição em ácidos gordos da fração CC3 isolada de *Cantharellus cibarius* com respetiva identificação, tempo de retenção e teor. Teor, dado em percentagem de área, tendo em conta apenas os 3 ácidos gordos detetados.

Ácido gordo	Tempo de retenção (min)	Teor (%)
Ácido mirístico	12,14	31,4
Ácido palmítico	18,95	65,4
Ácido palmitoleico	19,18	3,2

O cromatograma obtido revelou a presença de um total de 3 ácidos gordos nos fosfolípidos isolados da fração CC3: ácido mirístico, ácido palmítico e ácido palmitoleico, por respetiva ordem de saída (tempo de retenção). Destes, observa-se que o ácido palmítico é o que está em maior quantidade, constituindo cerca de 65,4% dos ácidos gordos detetados, seguindo-se do ácido mirístico com 31,4%. Em muito menor quantidade está o ácido palmitoleico com uma percentagem de apenas 3,2% relativamente à totalidade dos ácidos gordos encontrados nos fosfolípidos isolados da fração CC3.

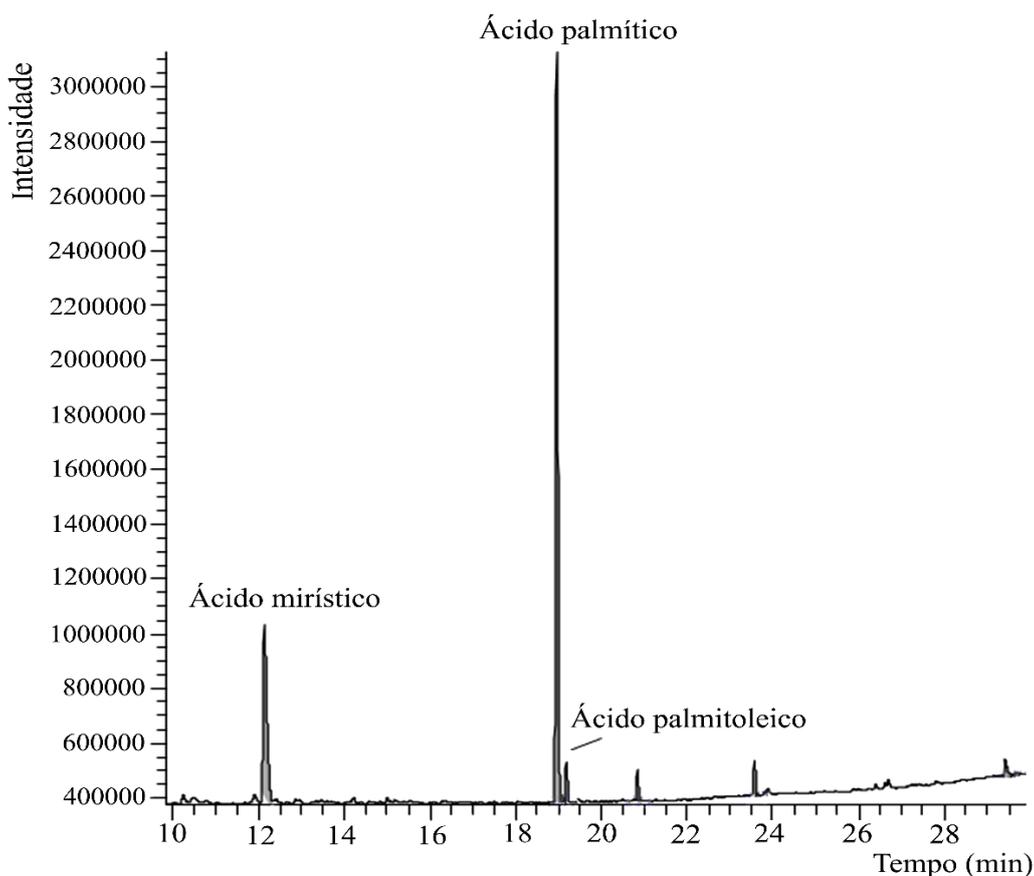


Figura 4.13: Cromatograma de análise de ácidos gordos, obtido por cromatografia gasosa, para a fração CC3 isolada de *Cantharellus cibarius*. Foram detetados, no total, três ácidos gordos, nomeadamente: ácido mirístico, palmítico e palmitoleico, por respetiva ordem de saída (tempo de retenção). A intensidade do pico é proporcional à quantidade de ácido gordo detetado, sendo assim o maioritário o ácido palmítico.

4.4. Clonagem de produtos PCR

Tomando como ponto de partida o RNA extraído do cogumelo *C. cibarius*, realizou-se a transcrição reversa do mesmo obtendo-se, deste modo, cDNA. Neste procedimento utilizou-se um *kit* que incluía o *primer Random Hexamers* e o *primer Oligo dT*. De seguida, recorreu-se à técnica DOP-PCR, na qual foram utilizados os *primers* 6MW e F/S (*primers* universais), com o objetivo de amplificar o cDNA obtido.

Os produtos da transcrição reversa obtidos com o *primer Oligo dT* (O_RT) e com o *primer Random Hexamers* (H_RT) assim como os produtos DOP-PCR obtidos com o *primer* 6MW (O_DOP_6MW e H_DOP_6MW) e com o *primer* F/S (O_DOP_F/S e H_DOP_F/S) foram então clonados, utilizando para o efeito o plasmídeo pUC19DNA/SmaI, no qual estão presentes o gene de resistência à ampicilina e o gene LacZ (gene do operão da lactose), que são os principais responsáveis pela posterior identificação dos clones que contêm o fragmento de DNA de interesse, e que são considerados como clones positivos.

As colónias obtidas pelo processo de clonagem foram submetidas a um *screening* por PCR, utilizando o *primer M13*, que se liga ao vetor perto do local de inserção, o que permite, posteriormente, confirmar se os clones possuem o plasmídeo com o inserto, ou não, e se são, portanto, positivos ou negativos, uma vez que o PCR das colónias positivas terá um produto de PCR com tamanho superior ao PCR das colónias negativas, pois as primeiras terão de ter um tamanho superior ao tamanho do *primer* utilizado. No total, foram obtidos 44 clones, 16 de O_RT, 4 de H_RT, 11 de O_DOP_6MW, 7 de O_DOP_F/S, 4 de H_DOP_6MW e 2 de H_DOP_F/S, sendo os resultados referentes ao seu cariz positivo/negativo visualizados através de um gel de agarose.

No gel de agarose, foi colocado o marcador molecular *100 bp DNA Ladder* e o clone *Lesser SA 1723 Clone 1* (Clone de DNA satélite bovino, que se sabia ser positivo, sendo, portanto, utilizado como controlo positivo). De seguida, começou por se depositar as amostras representativas dos clones obtidos, começando pelos clones O_RT, seguido dos H_RT, O_DOP_6MW, O_DOP_F/S, H_DOP_6MW e H_DOP_F/S. No total, obtiveram-se 32 clones positivos e 13 clones negativos. O gel resultante pode ser observado na Figura 4.14 e o resumo de quais os clones considerados como positivos/negativos, pode ser visualizado na Tabela 4.6.

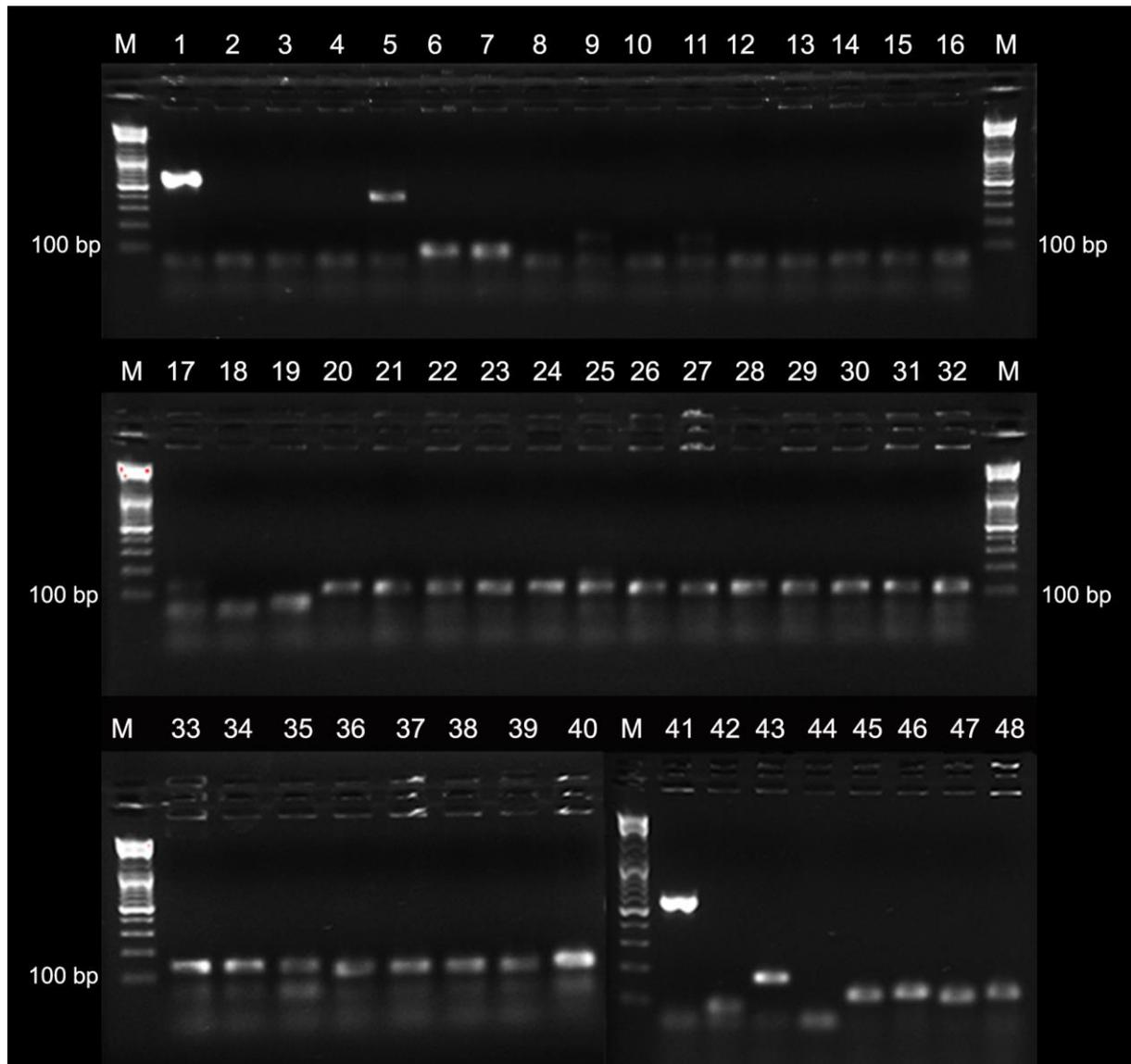


Figura 4.14: Gel obtido pelo procedimento de eletroforese em gel de agarose para os clones **O_RT**, **H_RT**, **O_DOP_6MW**, **O_DOP_F/S**, **H_DOP_6MW** e **H_DOP_F/S**. **M:** Marcador molecular *100 bp DNA Ladder* (identificação de bandas entre 1000-100bp), **1:** *Lesser SA 1723* Clone 1 – controlo positivo, **2:** **O_RT**_Clone3, **3:** **O_RT**_Clone4, **4:** **O_RT**_Clone5, **5:** **O_RT**_Clone6, **6:** **O_RT**_Clone7, **7:** **O_RT**_Clone6, **8:** **O_RT**_Clone9, **9:** **O_RT**_Clone10, **10:** **O_RT**_Clone11, **11:** **O_RT**_Clone12, **12:** **O_RT**_Clone13, **13:** **O_RT**_Clone14, **14:** **O_RT**_Clone15, **15:** **O_RT**_Clone16, **16:** **H_RT**_Clone1, **17:** **H_RT**_Clone2, **18:** **H_RT**_Clone3, **19:** **H_RT**_Clone4, **20:** **O_DOP_6MW**_Clone1, **21:** **O_DOP_6MW**_Clone2, **22:** **O_DOP_6MW**_Clone3, **23:** **O_DOP_6MW**_Clone4, **24:** **O_DOP_6MW**_Clone5, **25:** **O_DOP_6MW**_Clone6, **26:** **O_DOP_6MW**_Clone7, **27:** **O_DOP_6MW**_Clone9, **28:** **O_DOP_6MW**_Clone10, **29:** **O_DOP_6MW**_Clone11, **30:** **O_DOP_F/S**_Clone1, **31:** **O_DOP_F/S**_Clone2, **32:** **O_DOP_F/S**_Clone3, **33:** **O_DOP_F/S**_Clone4, **34:** **O_DOP_F/S**_Clone5, **35:** **O_DOP_F/S**_Clone7, **36:** **H_DOP_6MW**_Clone1, **37:** **H_DOP_6MW**_Clone2 **38:** **H_DOP_6MW**_Clone3, **39:** **H_DOP_6MW**_Clone5, **40:** **H_DOP_F/S**_Clone1, **41:** *Lesser SA 1723* Clone 1, **42:** **O_RT**_Clone1, **43:** **O_RT**_Clone2, **44:** **H_RT**_Clone3, **45:** **O_DOP_6MW**_Clone8, **46:** **O_DOP_F/S**_Clone6, **47:** **H_DOP_6MW**_Clone4, **48:** **H_DOP_F/S**_Clone2.

Tabela 4.6: Tabela resumo dos clones considerados como positivos e negativos. Os clones considerados como positivos foram aqueles cujo tamanho, no gel de agarose, aparentou ser um pouco superior a 100 bp (tamanho, aproximado, do *primer* M13 utilizado no procedimento).

Clone	+ / -	Clone	+ / -
O_RT_Clone1	-	O_DOP_6MW_Clone4	+
O_RT_Clone2	+	O_DOP_6MW_Clone5	+
O_RT_Clone3	-	O_DOP_6MW_Clone6	+
O_RT_Clone4	-	O_DOP_6MW_Clone7	+
O_RT_Clone5	-	O_DOP_6MW_Clone8	+
O_RT_Clone6	+	O_DOP_6MW_Clone9	+
O_RT_Clone7	+	O_DOP_6MW_Clone10	+
O_RT_Clone8	+	O_DOP_6MW_Clone11	+
O_RT_Clone9	-	O_DOP_F/S_Clone1	+
O_RT_Clone10	+	O_DOP_F/S_Clone2	+
O_RT_Clone11	-	O_DOP_F/S_Clone3	+
O_RT_Clone12	+	O_DOP_F/S_Clone4	+
O_RT_Clone13	-	O_DOP_F/S_Clone5	+
O_RT_Clone14	-	O_DOP_F/S_Clone6	+
O_RT_Clone15	-	O_DOP_F/S_Clone7	+
O_RT_Clone16	-	H_DOP_6MW_Clone1	+
H_RT_Clone1	-	H_DOP_6MW_Clone2	+
H_RT_Clone2	+	H_DOP_6MW_Clone3	+
H_RT_Clone3	-	H_DOP_6MW_Clone4	+
H_RT_Clone4	-	H_DOP_6MW_Clone5	+
O_DOP_6MW_Clone1	+	H_DOP_F/S_Clone1	+
O_DOP_6MW_Clone2	+	H_DOP_F/S_Clone2	+
O_DOP_6MW_Clone3	+		

Como é possível verificar, todos os clones que previamente tinham sido obtidos a partir dos produtos DOP_PCR, independentemente dos *primers* utilizados, foram considerados como positivos. Os clones obtidos a partir, apenas, do processo de transcrição reversa foram os que, na sua maioria, se apresentaram como negativos (13 clones negativos de 20 totais). Também é possível observar que, quando se utiliza o *primer* *Oligo dT* (na transcrição reversa), há um maior número de clones positivos e o mesmo acontece quando se utiliza o *primer* 6MW (no DOP-

PCR). Após isto, o DNA plasmídico dos clones considerados como positivos foi extraído e enviado para sequenciação.

4.5. Sequenciação e análise bioinformática

O DNA plasmídico obtido a partir dos vários clones positivos foi analisado por sequenciação, apenas no sentido *reverse*. Uma vez obtidos os resultados, as sequências foram tratadas bioinformaticamente de modo a eliminar a sequência correspondente ao *primer* M13 utilizado e a ficarmos apenas com a sequência de interesse. Na Tabela 4.7 é possível observar todas as sequências obtidas assim como o seu respetivo tamanho.

Tabela 4.7: Sequências obtidas a partir do DNA extraído dos clones considerados como positivos.

Nome do clone	Sequência	Tamanho
O_RT_Clone2	GCCTGCGGTTCGACTCTAGAGGATCCCCGATGGGTT CAGCAAGGTGTGTAGCTCGCTCTCTTGTTTGGGCG ATTTCTCCAGC	81 nt
O_RT_Clone6	Não foi possível sequenciar	
O_RT_Clone7	GGCCTGCAGGTCGACTCTAG	21 nt
O_RT_Clone8	Não foi possível sequenciar	
O_RT_Clone10	GCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCCTGGGTA TGGAG	40 nt
O_RT_Clone12	TGATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCC	32 nt
H_RT_Clone2	Não foi possível sequenciar	
O_DOP_6MW_Clone1	Não foi possível sequenciar	
O_DOP_6MW_Clone2	CTGCAGGGTCGACTCTAGAGGATCCCCCGACTCGA GTCGG	40 nt
O_DOP_6MW_Clone3	TGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCC GACTCGAGTCGG	47 nt
O_DOP_6MW_Clone4	CCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCCGACTC GAGTCGG	42 nt
O_DOP_6MW_Clone5	GCTGGCTGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCC CCGACTCGAGTCGG	49 nt
O_DOP_6MW_Clone6	Não foi possível sequenciar	
O_DOP_6MW_Clone7	CCTGGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCCGACTC GAGTCGG	42 nt
O_DOP_6MW_Clone8	GGCTGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCCG ACTCGAGTCGG	46 nt
O_DOP_6MW_Clone9	TGCTGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCCG ACTCGAGTCGG	46 nt
O_DOP_6MW_Clone10	Não foi possível sequenciar	
O_DOP_6MW_Clone11	TTGCAGGTCGAACTCTAGAGGATCCCCCGGACTCG AGTCCGACTCGAGT	49 nt

O_DOP_F/S_Clone1	CCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCCGGACTCG AGTCCGCGGACTCGAGT	52 nt
O_DOP_F/S_Clone2	CTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCCGGACTCGA GT	37 nt
O_DOP_F/S_Clone3	CCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCCGGACTCG AGTCCGCGGACTCGAGT	52 nt
O_DOP_F/S_Clone4	AGTTGCTGCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCC GGACTCGAGT	45 nt
O_DOP_F/S_Clone5	CTTGCTGGCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCC GGACTCGAGT	45 nt
O_DOP_F/S_Clone6	Não foi possível sequenciar	
O_DOP_F/S_Clone7	GGTTGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGG ACTCGAGTCCGCGGACTCGAGT	57 nt
H_DOP_6MW_Clone1	AGGGTCGACTCTAGAGGATCCCCCGACTCGAGTC GG	37 nt
H_DOP_6MW_Clone2	GCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCCGACTC GAGTCGG	42 nt
H_DOP_6MW_Clone3	GCTTGGATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCC CCCGACTCGAGTCGG	50 nt
H_DOP_6MW_Clone4	GGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCCGACT CGAGTCGG	43 nt
H_DOP_6MW_Clone5	GCAGGGTCGACTCTAGAGGATCCCCCGACTCGAGT CGG	38 nt
H_DOP_F/S_Clone1	GTCGACTCTAGAGGATCCCCCGGACTCGAGTCCGC GGACTCGAGT	45 nt
H_DOP_F/S_Clone2	GGCTGGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCACTCGA GTCCGCGGACTCGAGT	51 nt

De todas as 32 amostras enviadas para sequenciação, 7 não foram possíveis de sequenciar (O_RT_Clone6, O_RT_Clone8, H_RT_Clone2, O_DOP_6MW_Clone1, O_DOP_6MW_Clone6, O_DOP_6MW_Clone10 e O_DOP_F/S_Clone6), não se obtendo assim qualquer resultado relativamente às mesmas. Das sequências obtidas, há duas que se destacam pela sua diferença de tamanho relativamente às restantes: O_RT_Clone2, com 81 nt e O_RT_Clone7, com apenas 21 nt. Todas as outras apresentam tamanhos que oscilam entre os 32 e os 57 nt. De referir que pela eletroforese em gel de agarose, já era expectável obter sequências de RNA com tamanhos variados.

Através do programa computacional *Geneious*, executou-se um alinhamento múltiplo das sequências representativas de todos os clones enviados para sequenciação, com o objetivo de observar a similaridade entre as mesmas. Os resultados dados pelo programa podem ser observados nas Figuras 4.15 e 4.16 e na Tabela A.1 (Anexo B).

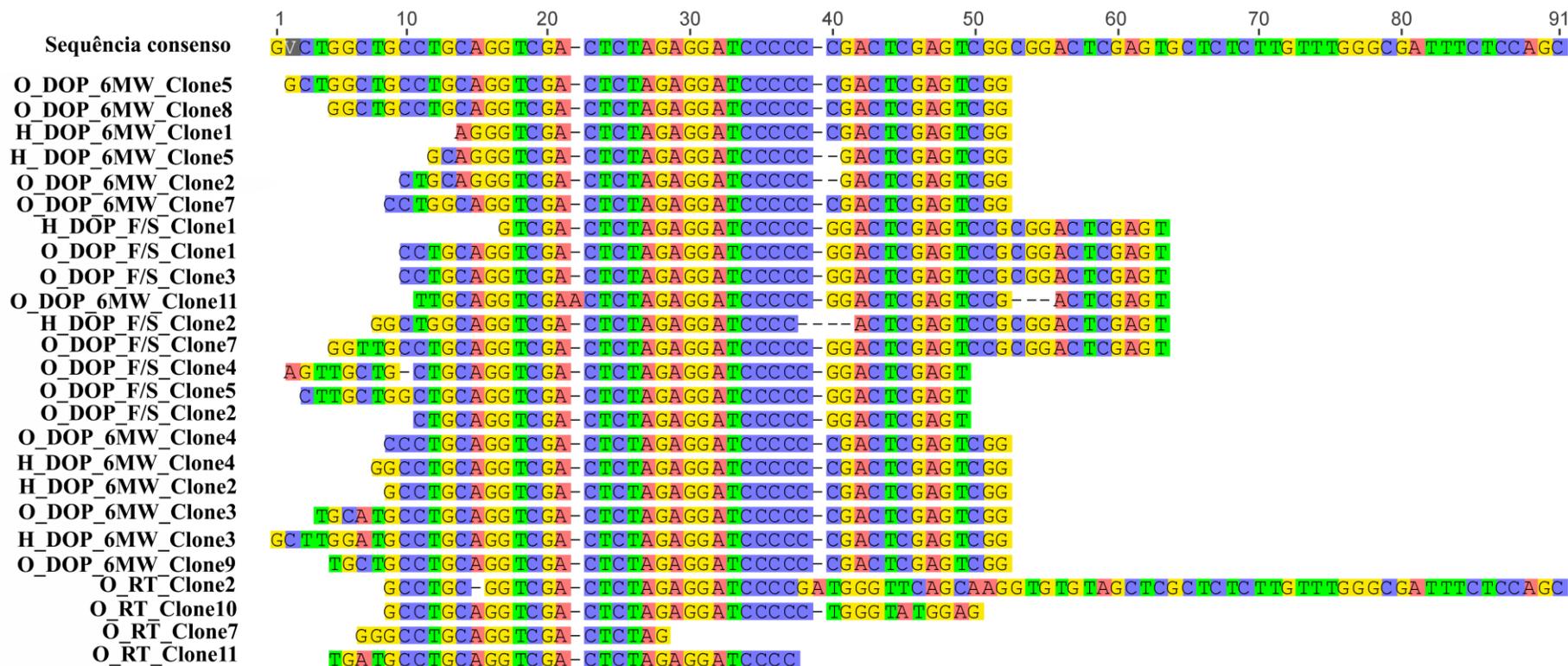


Figura 4.15: Alinhamento múltiplo, através do programa computacional *Geneious*, de todas as seqüências obtidas a partir dos clones enviados para sequenciação.

Na Figura 4.15 é possível observar o alinhamento geral de todas as sequências obtidas e na Figura 4.16 reduziu-se o alinhamento apenas a uma região em que a similaridade de todas as sequências mostrou ser bastante elevada.

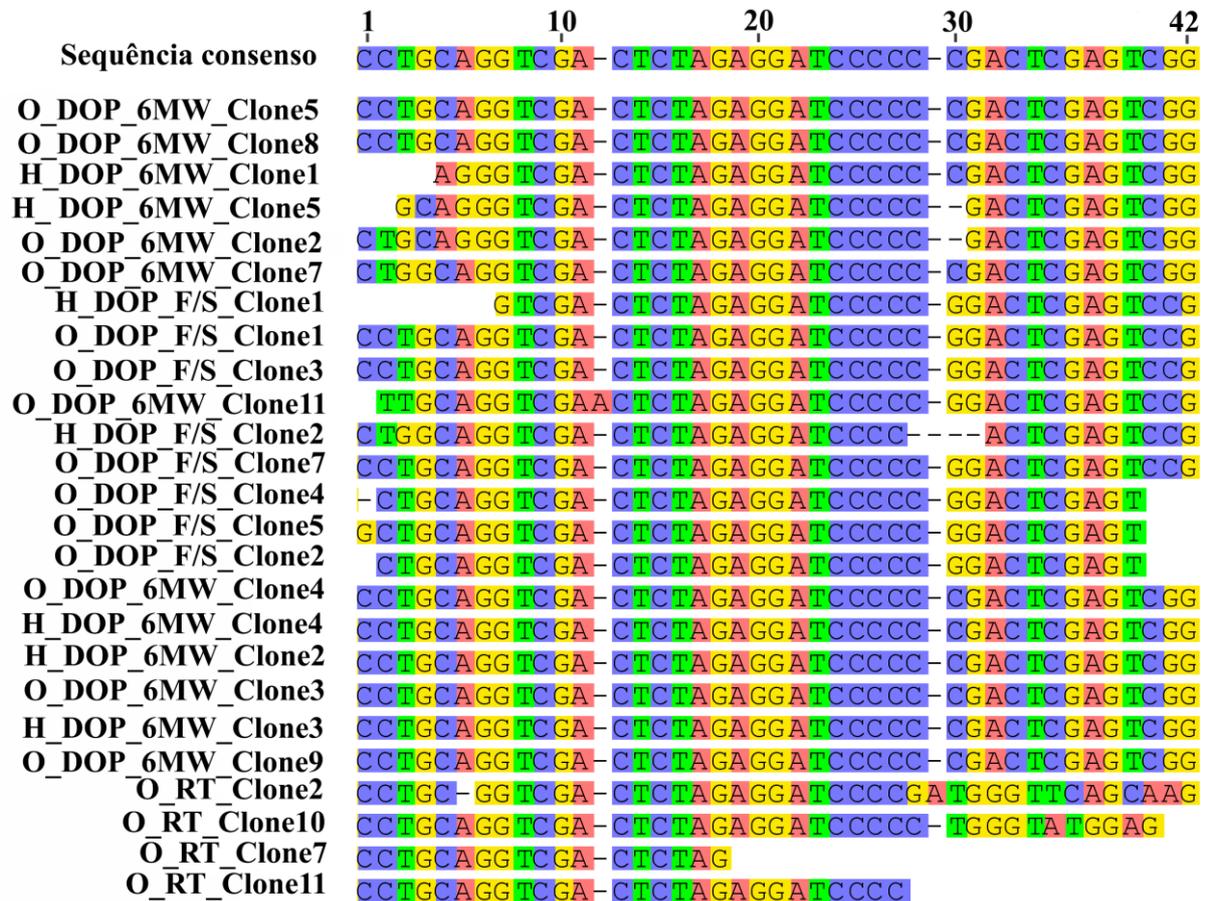


Figura 4.16: Alinhamento múltiplo, através do programa computacional *Geneious*, de todas as sequências obtidas a partir dos clones enviados para sequencição. Neste caso, é feita evidência para a região conservada presente em praticamente todos os clones, significando que todos são altamente similares.

No geral, as únicas sequências que se mostram ligeiramente diferentes das outras foram a O_RT_Clone2 e a O_RT_Clone10 que, apesar de incluírem também grande maioria da região conservada, no final das mesmas há uma ligeira alteração de nucleótidos relativamente às restantes. Falando especificamente da região conservada detetada, a sequência consenso pode ser dada por: CCTGCAGGTCGA-CTCTAGAGGATCCCCC-CGACTCGAGTCGG, uma sequência muito rica em guaninas (G) e citosinas (C), aproximadamente 66% da mesma, e onde “-“ representam *gaps*.

Na Tabela A.1 (Anexo B) encontra-se representada a percentagem de similaridade entre cada uma das sequências obtidas. É possível observar, marcado a vermelho, similaridades de

100% e marcado a azul, similaridades inferiores a 80%. Fazendo uma análise global, os resultados obtidos, relativamente à similaridade, são praticamente todos a cima de 80%, o que vem confirmar os dados registados nas figuras do alinhamento múltiplo (Figuras 4.15 e 4.16).

Como também foi observado na Figura 4.15, as sequências O_RT_Clone2 e O_RT_Clone10 eram as que se mostravam mais dissimilares das restantes, tendo a primeira um tamanho muito superior (81 nt) e portanto evidenciando similaridades abaixo dos 80%, sendo as mesmas similaridades entre os 60% e os 74%, relativamente às restantes sequências. No segundo caso, apesar do tamanho ser semelhante às demais, a sequência O_RT_Clone10 apresenta, no final, alguns nucleótidos diferentes, evidenciando similaridades entre os 66% e os 80%. Analisando as similaridades obtidas entre as restantes sequências, observa-se que as mesmas são bastante elevadas mostrando assim que as sequências são muito semelhantes entre si e voltando a confirmar a região conservada visualizada através do alinhamento múltiplo.

Depois de obtidas as sequências e efetuado o seu alinhamento, foram realizadas várias pesquisas BLASTN, nas quais foi feito o alinhamento de cada uma das sequências tanto com o genoma Humano (*Homo sapiens*) como com o genoma do próprio *C. cibarius*, no entanto, nenhuma similaridade significativa foi encontrada. Foram ainda realizadas várias pesquisas nas mais variadas bases de dados, que permitem verificar se as sequências em estudo já foram alguma vez identificadas e detetar possíveis similaridades com RNAs já catalogados. Relativamente à análise das mesmas, nenhuma semelhança com valores de *e-value* e *query cover* suficientemente elevados para serem consideradas significativas foram encontradas.

De seguida, através da ferramenta *RNAfold*, as sequências foram analisadas de modo a determinar possíveis estruturas secundárias e a avaliar a sua estabilidade. Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 4.8 na qual se pode observar, para além da estrutura secundária obtida, o tamanho e percentagem de A+T/U e G+C de cada sequência. Como é possível verificar, todas as sequências apresentam uma determinada estrutura secundária com elevada probabilidade e elevada percentagem de guaninas e citosinas.

Relativamente à energia livre mínima (MFE), quando menor o seu valor absoluto (quanto maior a sua negatividade) mais estável é a estrutura obtida. Para as sequências dadas, o valor de MFE varia entre -4,30 e -21,10 kcal/mol.

A probabilidade de cada par de base é dada pelas cores representadas nas estruturas sendo que a mesma varia, de forma crescente, entre 0 e 1.

Tabela 4.8: Estrutura secundária das sequências obtidas através da ferramenta bioinformática *RNAfold* com respectiva energia livre mínima (MFE), tamanho da sequência e percentagem de G+C e A+T/U.

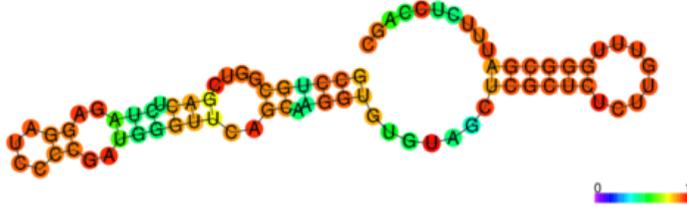
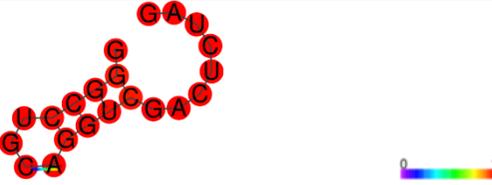
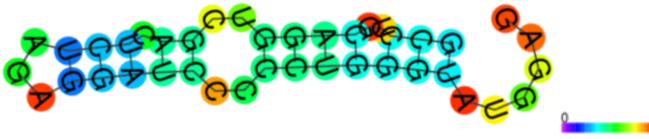
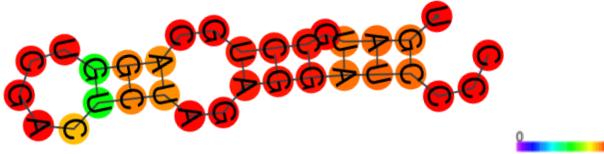
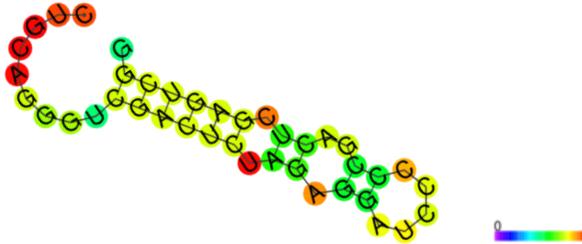
Nome	Estrutura	MFE (kcal/mol)	% A+T/U	% G+C	Tamanho (nt)
O_RT_Clone2		-21,10	42%	58%	81
O_RT_Clone7		-4,30	33,3%	66,7 %	21
O_RT_Clone10		-7,70	37,5%	62,5%	40
O_RT_Clone12		-5.30	40,6%	59,4%	32
O_DOP_6MW_Clone2		-11.80	35%	65%	40

Tabela 4.8: Estrutura secundária das sequências obtidas através da ferramenta bioinformática *RNAfold* com respectiva energia livre mínima (MFE), tamanho da sequência e percentagem de G+C e A+T/U. (Continuação)

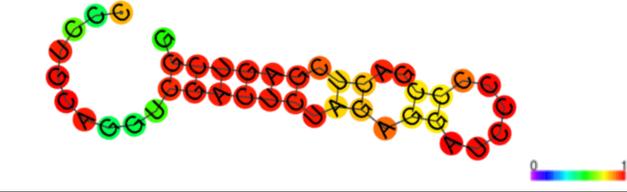
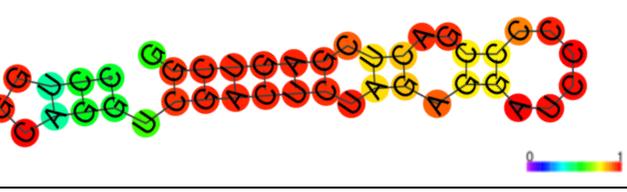
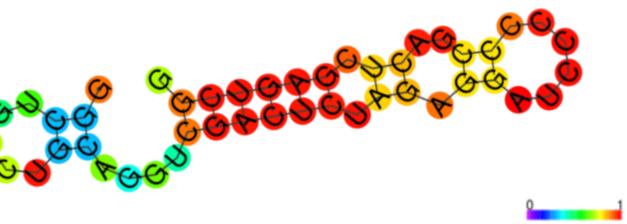
Nome	Estrutura	MFE (kcal/mol)	% A+T/U	% G+C	Tamanho (nt)
O_DOP_6MW_Clone3		-14,70	36,2%	63,8%	47
O_DOP_6MW_Clone4		-12,10	33,3%	66,7%	42
O_DOP_6MW_Clone5		-14,90	32,7%	67,3%	49
O_DOP_6MW_Clone7		-12,20	33,3%	66,7%	42
O_DOP_6MW_Clone8		-13,30	32,6%	67,4%	46

Tabela 4.8: Estrutura secundária das sequências obtidas através da ferramenta bioinformática *RNAfold* com respectiva energia livre mínima (MFE), tamanho da sequência e percentagem de G+C e A+T/U (continuação).

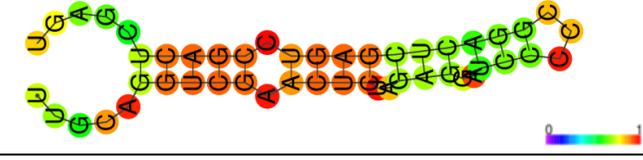
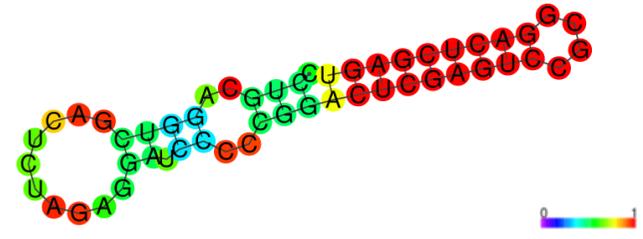
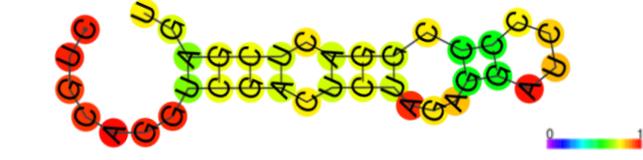
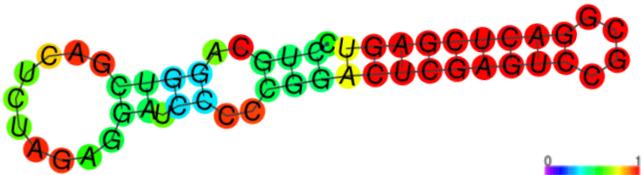
Nome	Estrutura	MFE (kcal/mol)	% A+T/U	% G+C	Tamanho (nt)
O_DOP_6MW_Clone9		-14,30	34,8%	65,2%	46
O_DOP_6MW_Clone11		-13,50	40,8%	59,2%	49
O_DOP_F/S_Clone1		-18,50	34,6%	65,4%	52
O_DOP_F/S_Clone2		-6,30%	37,8%	62,2%	37
O_DOP_F/S_Clone3		-18,50	34,6%	65,4%	52

Tabela 4.8: Estrutura secundária das sequências obtidas através da ferramenta bioinformática *RNAfold* com respectiva energia livre mínima (MFE), tamanho da sequência e percentagem de G+C e A+T/U (continuação).

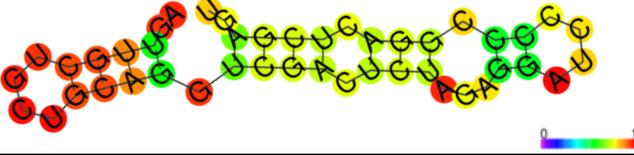
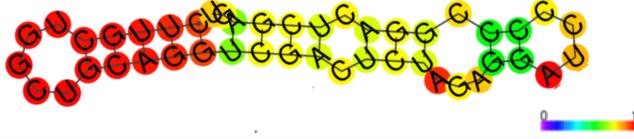
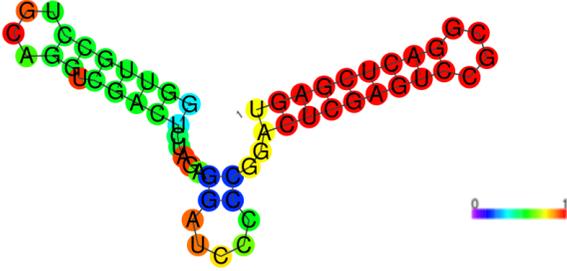
Nome	Estrutura	MFE (kcal/mol)	% A+T/U	% G+C	Tamanho (nt)
O_DOP_F/S_Clone4		-9,20	40%	60%	45
O_DOP_F/S_Clone5		-11,50	37,8%	62,2%	45
O_DOP_F/S_Clone7		-19,90	35,1%	64,9%	57
H_DOP_6MW_Clone1		-12,10	35,1%	64,9%	37
H_DOP_6MW_Clone2		-12,90	33,3%	66,6%	42

Tabela 4.8: Estrutura secundária das sequências obtidas através da ferramenta bioinformática *RNAfold* com respectiva energia livre mínima (MFE), tamanho da sequência e percentagem de G+C e A+T/U (continuação).

Nome	Estrutura	MFE (kcal/mol)	% A+T/U	% G+C	Tamanho (nt)
H_DOP_6MW_Clone3		-15,70	36%	64%	50
H_DOP_6MW_Clone4		-14,10	32,6%	67,6%	43
H_DOP_6MW_Clone5		-11,80	34,2%	65,8%	38
H_DOP_F/S_Clone1		-15,00	35,6%	64,4%	45
H_DOP_F/S_Clone2		-19,10	35,3%	64,7%	51

4.6. Tratamento de células Caco-2 com a fração CC3

Com o objetivo de demonstrar a atividade antiproliferativa da fração CC3 isolada de *C. cibarius*, a linha celular Caco-2 foi colocada em contacto com 25 µL de meio de cultura (lâmina controlo) e 25 µL da fração CC3 (1 mg/100 µL). As lâminas foram observadas e fotografadas às 0, 24 e 48h, sendo as imagens obtidas ilustradas na Figura 4.17.

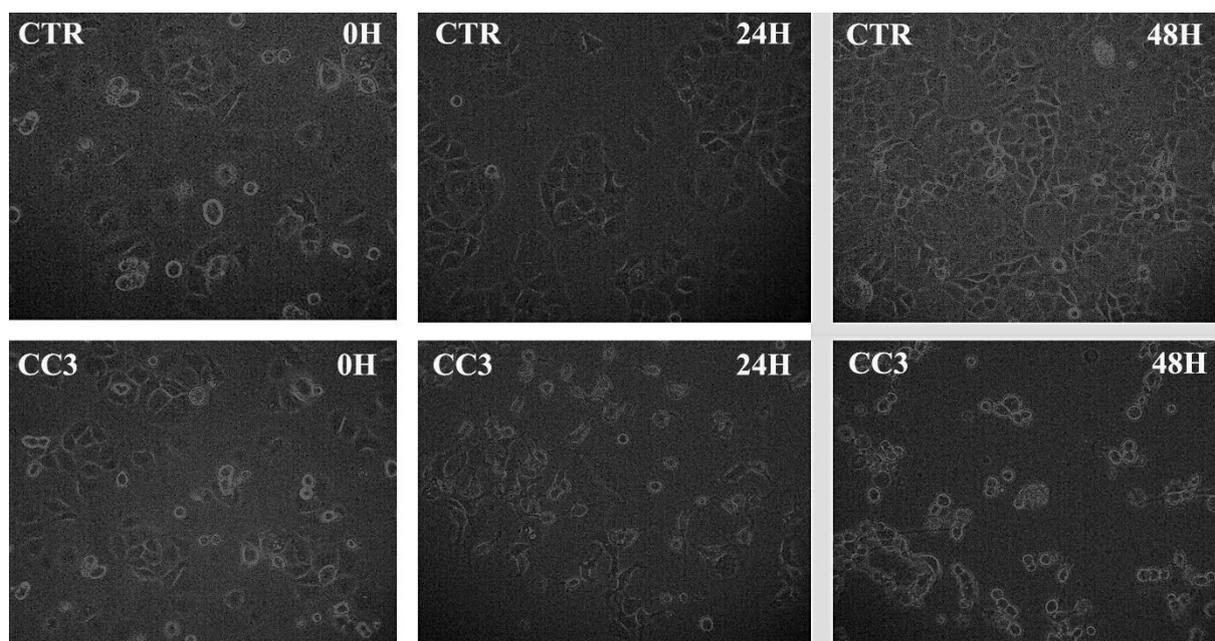


Figura 4.17: Indução de morte celular em células Caco-2 (células humanas de tumor colorretal) tratadas com a fração CC3 isolada de *Cantharellus cibarius*. As células foram postas em contacto com meio de cultura (lâmina controlo) (CTR) e com a fração CC3 e foram fotografadas às 0h, 24h e 48h.

Às 0h, a concentração de células nas duas lâminas (CTR e CC3), era semelhante. Ao fim de 48h, observa-se um aumento notório do número de células na situação controlo e, em contrapartida, na lâmina em que se depositou a fração CC3, verifica-se a ocorrência de morte celular das células Caco-2 aí presentes. Esta constatação vem evidenciar a atividade antitumoral da fração CC3.

4.7. RNA *Fluorescent in situ hybridization* (RNA-FISH)

Com o objetivo de detetar e localizar o RNA em estudo nas células Caco-2, previamente tratadas com a fração CC3 ao fim de 48h, procedeu-se à técnica de RNA-FISH.

Nesta técnica, utilizou-se um dos clones como sonda (O_RT_Clone2). Esta sonda, marcada com fluorescência, quando hibridada com o RNA alvo permite a visualização de sinais fluorescentes, neste caso, de cor vermelha devido ao fluorocromo utilizado. Deste modo,

através da utilização do microscópio de fluorescência, foi possível perceber se este ácido nucleico se teria integrado nas células.

Na Figura 4.18 é possível observar o resultado obtido pela técnica RNA-FISH. Para a lâmina controlo, aquela que continha células Caco-2 apenas com meio de cultura, como se pode constatar, nenhum RNA foi detetado nas células, pois não existe presença de coloração vermelha, correspondente à hibridação do mesmo com a sonda. Por outro lado, para a lâmina com células Caco-2 em contacto com a fração CC3, é bem evidente a presença de RNAs constituintes da fração CC3 que se acumulam tanto no citoplasma como no núcleo (contrastado com DAPI-azul) de todas as células presentes na lâmina.

Deste modo, evidencia-se, mais uma vez, a constituição desta fração neste ácido nucleico que se localiza tanto no núcleo como no citoplasma das células assim como a sua capacidade de, estando apenas em contacto com as mesmas, atravessar tanto a membrana celular como nuclear.

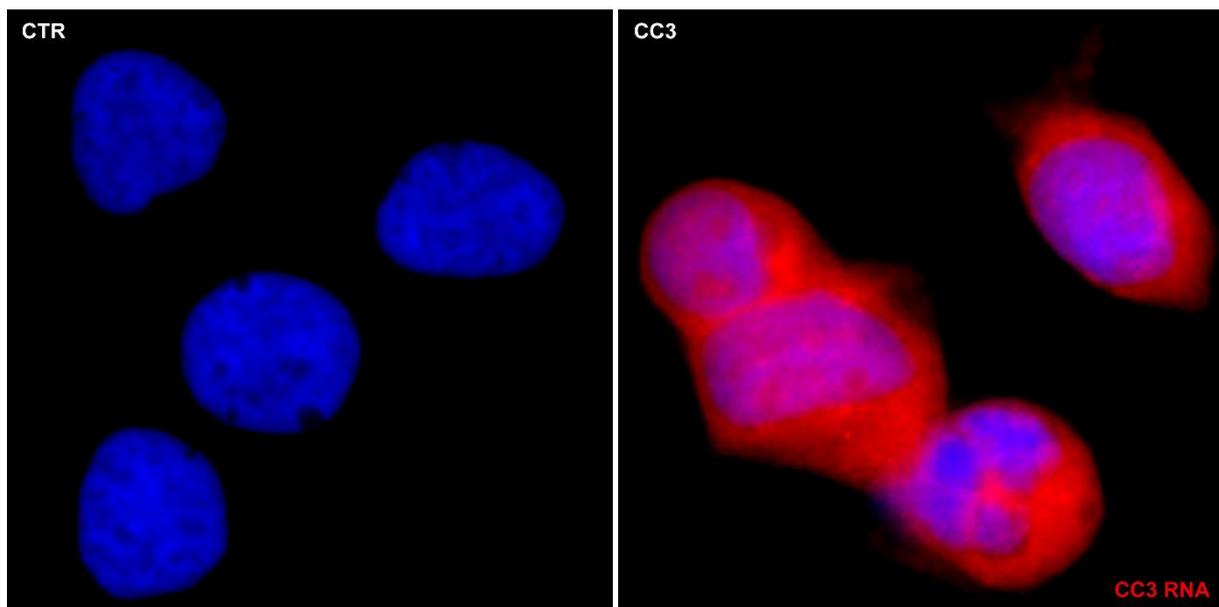


Figura 4.18: Imagens obtidas pela técnica de RNA-FISH.: CTR (Controlo): Células Caco-2 apenas com meio de cultura; CC3: - Células Caco-2 às quais foi adicionada a fração CC3 isolada de *Cantharellus cibarius*. Imagens obtidas ao fim de 48h em lâmina. Os sinais de RNA da fração CC3 estão representados a vermelho e os núcleos encontram-se contrastados com DAPI (a azul).

Capítulo 5

Discussão de resultados

Capítulo 5: Discussão de resultados

✓ Neste capítulo proceder-se-á à discussão dos resultados apresentados no capítulo anterior. A exposição dos mesmos será feita em subtópicos, no entanto de forma mais sintética do que no capítulo anterior, de modo a facilitar a sua apresentação e compreensão. Inicialmente serão discutidos os resultados referentes à extração, isolamento e purificação de biopolímeros e à caracterização química de *Cantharellus cibarius*. Por fim, serão debatidos os resultados referentes à sequenciação e análise bioinformática da fração de interesse neste estudo (CC3) e os resultados demonstrativos da sua capacidade antitumoral.

5.1. Extração e isolamento de biopolímeros

A fim de se proceder ao isolamento da fração CC3, principal fração de interesse para o presente estudo, foi necessário recorrer ao isolamento do material insolúvel em álcool (AIR), a partir do qual se executou o isolamento de material solúvel em água (WSM). Do WSM obteve-se o material de elevado peso molecular (HMWM) e finalmente, através da purificação deste, as frações CC1, CC2, CC3.

C. cibarius é constituído maioritariamente por material insolúvel em álcool (AIR), cerca de 74,6% da MS total, resultado que já era de esperar e que está de acordo com a literatura uma vez que os principais constituintes dos cogumelos são proteínas, glicoproteínas, polissacarídeos, lípidos e ácidos nucleicos (Jedidi *et al.*, 2016; Muszynska *et al.*, 2016). Assim, devido ao facto de estes serem insolúveis nas condições de realização deste procedimento (álcool), fazem parte da fração AIR (Marzullo e Danforth, 1964).

Para isolar os polímeros solúveis em água do cogumelo em estudo, o AIR foi submetido a fervura em água e liofilização do qual resultou o WSM. Este constitui apenas 26,8% do material anterior (AIR) (correspondendo a 20% do peso inicial do cogumelo seco), devido ao facto dos seus constituintes maioritários serem insolúveis no solvente utilizado (água). No WSM incluem-se, principalmente, polissacarídeos, ácidos nucleicos e proteínas. Esta redução de conteúdo também já seria de esperar uma vez que um dos grandes constituintes do AIR são polissacarídeos das paredes celulares e estes, na sua maioria, são insolúveis em água quente, não fazendo por isso parte do WSM..

Com o objetivo de obter material de elevado peso molecular (biopolímeros solúveis em água), o material obtido no passo anterior (WSM) foi submetido a diálise, originando assim o HMWM. Da totalidade do WSM, apenas 10,5% (cerca de 2% do peso inicial do cogumelo seco) é de elevado peso molecular, no qual se insere a matéria de interesse, o RNA. Esta redução deve-se essencialmente à perda de alguns polissacarídeos de baixo peso molecular e alguns compostos secundários que estariam em minoria, como é o caso dos compostos fenólicos que também são de baixo peso molecular (Ferreira *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012). Assim, o HMWM é maioritariamente constituído por polissacarídeos, complexos polissacarídeo-proteína, peptidoglicanos e lectinas (Lemieszek *et al.*, 2013).

O HMWM foi, adicionalmente, purificado por cromatografia de troca aniónica, procedimento que conduziu à obtenção das três frações enunciadas inicialmente: CC1, não retida na coluna cromatográfica e CC2 e CC3, retidas na coluna e posteriormente eluídas, sendo que para este procedimento foram utilizadas 800 mg de HMWM. Verificou-se que a fração CC1, correspondente ao material não retido na coluna cromatográfica, foi a mais abundante, constituindo 21,3% da amostra total utilizada, seguida da fração CC2 com 20,3% e da fração CC3 com 14,8%. Do material inicialmente utilizado, verifica-se que, por perdas ocorridas durante o processo realizado antes do fracionamento (ressuspensão do HMWM em tampão inicial, posterior centrifugação e remoção do material que não se dissolveu), devido a possíveis perdas ocorridas durante o processo de diálise realizado individualmente a cada uma das frações obtidas, bem como ao material que pode ter ficado irreversivelmente adsorvido na coluna de troca aniónica, se perderam 349,4 mg de HMWM, o que corresponde a 43,7% do material inicial, ou seja, o rendimento global da extração e purificação ronda os 56,33%. A fração correspondente ao material de interesse (CC3) foi a que apresentou menor quantidade, cerca de 14,8%.

5.2. Caracterização química das frações

5.2.1. Teor e composição em açúcares

Com o objetivo de analisar o teor e a composição em açúcares para as amostras WSM e HMWM e para as três frações purificadas: CC1, CC2 e CC3 efetuou-se a análise HPAEC-PAD após a hidrólise ácida do material, sendo a pesquisa realizada para 10 açúcares diferentes: Fuc, Rha, Ara, Gal, Glc, Xyl, Man, Rib, GalA e GlcA.

A amostra HMWM foi a que apresentou um teor em açúcares mais elevado, cerca de 55%. Como foi dito anteriormente, a amostra constituída por biopolímeros de elevado peso molecular solúveis em água quente (HMWM) é formada principalmente por polissacarídeos, complexos polissacarídeo-proteína, peptidoglicanos e lectinas sendo assim, os resultados obtidos são consistentes com a literatura (Lemieszek *et al.*, 2013). A composição e abundância em açúcares da amostra HMWM são consistentes com a presença de polissacarídeos, principalmente glucanas (Rop *et al.*, 2009) e mananas (Moreira e Filho, 2008). A presença de glucanas e mananas como principais componentes dos *Basidiomycetes* está de acordo com a literatura (Rop *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2014), sendo estes os constituintes maioritários da parede celular dos cogumelos (Bowman e Free, 2006; Sánchez, 2017). É ainda de salientar a importância que estes polissacarídeos têm demonstrado no organismo humano, em especial as glucanas que podem ser encontradas na forma solúvel em água e que têm mostrado ter uma atividade biológica pronunciada sobre vários sistemas do organismo como, por exemplo, o sistema imunológico (Rop *et al.*, 2009). Este facto permite concluir que o cogumelo em estudo não se destina apenas para o principal objetivo do presente trabalho mas que pode trazer também grandes vantagens para o tratamento de outras patologias, o que o torna um cogumelo bastante promissor para estudos adicionais devido aos restantes componentes que o constituem.

Em suma, infere-se que os principais componentes do HMWM de *C. cibarius* sejam, efetivamente polissacarídeos, os quais constituem a fração CC1, mas que, no entanto, o mesmo também contenha uma mistura de glicoproteínas e complexos polissacarídeo-proteína com diferentes quantidades de açúcar, que constituem a fração CC2. Este processo de separação baseia-se na capacidade de ligação das moléculas, carregadas negativamente, à resina da fase estacionária da coluna cromatográfica utilizada. Neste caso, foi utilizada como fase estacionária a resina *Q-Sepharose FF*, que é desenhada para reter proteínas e complexos proteicos (GE Life Sciences, 2014), explicando assim a origem das frações CC2 e no caso da fracção CC3 devido ao carácter altamente aniónico dos ácidos nucleicos.

A presença de complexos polissacarídeo-proteína em extratos de biopolímeros solúveis em água, já foi observada em outras espécies tais como *Agaricus blazei* (Schmidt *et al.*, 2009) e *Coriolus versicolor* (Ooi e Liu, 2000), assim como glicoproteínas, como é o caso das lectinas, que foram identificadas, por exemplo, nos cogumelos *Agaricus bisporus* (Wang *et al.*, 2012) e *Lentinula edodes* (Shen *et al.*, 2017), não sendo portanto exclusivas de *C. cibarius*. Estes componentes seriam também interessantes para um estudo posterior uma vez que muitos deles,

já isolados, apresentam várias propriedades promotoras da saúde, como por exemplo atividade antioxidante, imunomoduladora, antiviral, anticoagulante, antidiabética, anti-inflamatória, prebiótica e antitumoral (Asai *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2017; Wu, 2015).

Relativamente à fração CC3, a principal fração de interesse para o presente trabalho, como é possível observar na Tabela 4.3, constata-se que a mesma apresenta poucos açúcares na sua globalidade, pois no processo de purificação foi utilizado um gradiente crescente de sal (NaCl). De salientar que o principal açúcar encontrado é a ribose, dado este que coincide com estudos já previamente realizados no cogumelo *Boletus edulis* (Lemieszek *et al.*, 2016, 2013)

Como se sabe, a molécula de RNA é formada por uma cadeia de ribonucleótidos, que são, por sua vez, formados por um grupo fosfato, um açúcar e uma base azotada. O açúcar constituinte dos nucleótidos presentes numa cadeia de RNA é a ribose (Snustad e Simmons, 2011), que foi o açúcar encontrado em maior quantidade na fração CC3, confirmando assim a natureza deste ácido nucleico. De salientar que nenhum sinal de desoxirribose foi detetado (principal açúcar constituinte do DNA). Esta constatação vem, mais uma vez, efetivar o que se queria demonstrar no início do estudo: que a fração CC3 é, essencialmente, constituída por RNA.

5.2.2. Pesquisa de ácidos nucleicos

Já era conhecido, por investigações anteriores (Lemieszek *et al.*, 2016, 2013), que no cogumelo *Boletus edulis* a fração demonstradora de atividade antitumoral seria rica em RNA. O mesmo era de esperar para *Cantharellus cibarius* e, por esse motivo, procedeu-se ao estudo detalhado do tipo de ácido nucleico presente nesta fração de maneira a confirmar a sua natureza.

Inicialmente, submeteram-se as amostras WSM e HMWM e a fração CC3 a espectrofotometria UV-vis de modo a confirmar a presença de ácidos nucleicos nas mesmas. Nos espectros obtidos em cada análise verificou-se um máximo da absorvância aos 260 nm. Sabendo que os ácidos nucleicos absorvem, tipicamente, aos 260nm, verifica-se que se obtiveram espectros típicos dos mesmos (Deşjardins e Conklin, 2010). Comparando as amostras WSM e HMWM, o valor da absorvância a 260 nm foi mais elevado para a última, o que seria de esperar uma vez que os ácidos nucleicos se encontram em maior concentração do que no WSM. Tal facto acontece devido à realização do procedimento de diálise efetuado na amostra WSM, que permitiu purificar a mesma através da eliminação de diversos constituintes de baixo peso molecular, obtendo-se assim apenas o material de elevado peso molecular

(HMWM), onde o RNA, apesar de se encontrar na mesma quantidade, apresenta-se mais concentrado (mais puro). Na amostra CC3, o pico de absorvância observado é muito superior ao verificado nas amostras anteriores, o que já seria de esperar, uma vez que este dado é indicador da elevada pureza desta fração (devido ao processo de purificação a que foi submetida) que é constituída maioritariamente por RNA.

De seguida, realizou-se o procedimento de eletroforese em gel de agarose, no qual se utilizaram concentrações crescentes da amostra CC3 e no qual foi possível visualizar bandas no fundo do gel, cuja intensidade aumentava gradualmente com a concentração da amostra. A análise do gel permite inferir que se está perante uma amostra de RNA com tamanho reduzido, mas com várias moléculas de diferentes tamanhos.

Simultaneamente, realizou-se também uma análise no *NanoDrop* de modo a descartar contaminações e a saber a concentração de RNA na amostra em estudo.

A relação entre as absorvâncias a 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}) indica se a amostra estará contaminada com proteínas ou fenol. O valor ótimo para esta relação seria de 1,8 para DNA e 2 para RNA. Se o valor obtido for inferior ao valor ótimo significa que a amostra poderá estar contaminada com proteínas e/ou fenol, o que foi o caso, uma vez que se obteve um valor de 1,84, valor que seria ótimo para DNA, mas não o é para RNA. O mesmo estudo foi anteriormente efetuado no cogumelo *Boletus edulis*, que também terá sugerido presença de proteínas na fração, no entanto, estudos complementares efetuados (análise SDS-PAGE e coloração de prata) não mostraram qualquer evidência dessa contaminação (Lemieszek *et al.*, 2016). Os mesmos estudos teriam de ser efetuados para *C. cibarius* de modo a confirmar a ausência de contaminações.

A relação entre as absorvâncias a 260 e 230 nm (A_{260}/A_{230}) é uma segunda medida de pureza dos ácidos nucleicos que permite verificar se a amostra está contaminada com sais ou com algum solvente (*e.g.* EDTA e fenol) ou se houve algum problema com a amostra ou com o processo de extração. Por regra, para amostras puras, o valor de A_{260}/A_{230} é superior ao valor de A_{260}/A_{280} . O valor ótimo para esta relação é entre 2 e 2,2 sendo que, quando o valor é inferior a 2 indica que a amostra está contaminada com fenol ou outros reagentes e um valor superior a 2,2 poderá ser indicativo da utilização de um branco inadequado ou do local de deposição da amostra no *NanoDrop* conter alguma sujidade (Healthcare, 2012; Matlock, 2015). Para a A_{260}/A_{230} , obteve-se um valor de 2, valor situado no intervalo referido e superior ao valor da A_{260}/A_{280} , ou seja, é um valor adequado em termos de pureza.

Juntando todos os dados obtidos, pode-se concluir que a fração CC3 é uma amostra pura e com elevada concentração de RNA.

Por último, e com o objetivo de, mais uma vez, confirmar a natureza da amostra procedeu-se a uma análise FTIR que também demonstrou que esta se trata de um ácido nucleico, especificamente RNA, uma vez que se obteve um espectro característico do mesmo. Os espectros FTIR característicos dos ácidos nucleicos são divididos em duas partes distintas: açúcar e grupos fosfato. As bases (timina, adenina, citosina, guanina e uracilo) dão origem a vibrações purínicas e pirimidínicas na faixa dos 1800-1500 cm^{-1} . As bandas na região 1500-1250 cm^{-1} nos espectros de ácidos nucleicos são devidas ao acoplamento vibracional entre uma base e um açúcar, enquanto que na gama dos 1250-1000 cm^{-1} são devidas a vibrações de açúcar-fosfato. Para além disso, absorvâncias entre os 1121 e os 1244 cm^{-1} surgem, maioritariamente, devido aos fosfatos, no caso do RNA, e na região 1000-800 cm^{-1} observam-se as vibrações açúcar ou açúcar-fosfato (Lemieszek *et al.*, 2016; Sahu *et al.*, 2008; Stuart, 2004). Todas estas características foram observadas no espectro obtido para a fração CC3.

Todos os resultados obtidos com as metodologias realizadas para a “pesquisa de ácidos nucleicos” (espectrofotometria UV-vis, eletroforese em gel de agarose, quantificação por *NanoDrop* e FTIR) quando complementados com a “pesquisa do teor e composição em açúcares” vêm, inequivocamente, confirmar a especulação inicial de que o principal constituinte da fração portadora de atividade antiproliferativa seria o RNA.

5.2.3. Determinação quantitativa de fosfolípidos e determinação da composição em ácidos gordos da fração CC3

Para a determinação do teor de fosfolípidos presentes na fração CC3, estes foram previamente extraídos pelo Método de *Folch*. Para a determinação da sua composição em ácidos gordos, os fosfolípidos isolados foram transesterificados com metanol e analisados por cromatografia gasosa.

A quantificação de fosfolípidos e determinação da sua composição em ácidos gordos foi apenas realizada para a fração de interesse (CC3). Neste caso, não é possível recorrer à literatura de modo a comparar os resultados obtidos com o mesmo ou outro cogumelo, uma vez que, apesar dos imensos estudos existentes relativamente à composição em ácidos gordos de cogumelos (incluindo *C. cibarius*), para esta fração (fração obtida por eluição do material de elevado peso molecular com concentrações de sal a variar entre 1M a 2M), especificamente,

não existem quaisquer dados, não sendo, portanto, possível a sua comparação com estudos anteriormente publicados.

Segundo a literatura, os ácidos gordos maioritários em *C. cibarius* (quando analisado o cogumelo como um todo) são os ácidos gordos insaturados (Kalač, 2016; Muszynska *et al.*, 2016), nomeadamente os ácidos oleico e linoleico, seguido do ácido gordo saturado, ácido palmítico (Muszynska *et al.*, 2016). Relativamente à fração CC3 o mesmo não aconteceu na medida em que os ácidos gordos encontrados foram apenas três: dois dos quais saturados (ácido palmítico e mirístico) e um monoinsaturado (ácido palmitoleico). Estes dados podem ser explicados pelo facto de que, no presente estudo, não se avaliou o cogumelo na sua totalidade mas sim apenas a fração CC3, que sofreu vários procedimentos anteriores que culminaram na perda de vários componentes, purificando a mesma, o que era a finalidade pretendida.

A fase estacionária utilizada para o processo de purificação tem capacidade de reter moléculas aniónicas como, por exemplo, complexos proteicos e ácidos nucleicos. Assim, infere-se que os fosfolípidos detetados nesta fração estejam associados a proteínas/ácidos nucleicos ou, simplesmente, tenham ficado retidos na coluna por também serem moléculas aniónicas. Como é sabido, as membranas celulares são estruturas complexas formadas a partir de bicamadas lipídicas, proteínas de alta densidade e hidratos de carbono (Smith, 2012). Assim, o facto de serem encontrados 0,54% de fosfolípidos, pode ser explicado pela possível interação entre os mesmos e as proteínas/glicoproteínas constituintes da membrana celular, fazendo com que os primeiros ficassem retidos na coluna cromatográfica. A interação recorrente entre proteínas e fosfolípidos presentes nas membranas celulares já tem vindo a ser estudada por vários autores, não só em membranas celulares de fungos mas também de outros organismos, mostrando assim que a interação fosfolípido-proteína pode ocorrer através de múltiplos mecanismos desempenhando um papel crucial no bom funcionamento das membranas celulares (Chakrabarti e Khorana, 1975; Hsia *et al.*, 2015; Lee, 2011, 2003; Prudovsky *et al.*, 2013). No entanto, seriam necessários mais estudos de modo a confirmar a ocorrência desta interação e a explicar o porquê de os mesmos terem ficado retidos na coluna cromatográfica.

É sabido que, apesar dos fosfolípidos maioritariamente encontrados em fungos serem o fosfatidiletanolamina e o fosfatidilserina, a sua composição em termos de ácidos gordos varia (Gooday, 1995). Neste caso, uma vez analisada a composição em ácidos gordos da fração isolada, foram detetados os ácidos mirístico, palmítico e palmitoleico que estarão, portanto, associados aos fosfolípidos encontrados. No entanto, de modo a confirmar se os ácidos gordos

detetados estarão, efetivamente, acoplados aos fosfolípidos encontrados, teriam de ser feitos mais testes uma vez que a sua presença pode ocorrer pelo simples facto dos mesmos serem aniónicos e também poderem ter ficado acoplados à coluna cromatográfica.

O facto de serem encontrados fosfolípidos e ácidos gordos na fração CC3, é um resultado importante, uma vez que vários estudos mostram que a interação entre RNA e fosfolípidos pode ter implicações importantes na medida em que a mesma pode mediar a interação do RNA com a membrana celular, podendo favorecer a entrada destas moléculas na célula (Khvorova *et al.*, 1999; Michanek *et al.*, 2010; Vlassov e Yarus, 2002).

5.3. Sequenciação e análise bioinformática

De modo a determinar do tipo de molécula de RNA em causa, procedeu-se à sua sequenciação e posterior análise bioinformática. A partir das sequências obtidas (Tabela 4.7), realizou-se o seu alinhamento pelo programa computacional *Geneious* (Figuras 4.15 e 4.16). Através do mesmo programa, obteve-se também a Tabela A.1 (Anexo B), onde se encontram representadas as similaridades entre cada uma das sequências analisadas.

Consultando a Figura 4.15, representativa do alinhamento geral de todas as sequências, observa-se que as mesmas são bastante semelhantes entre si, havendo uma região conservada, com similaridade de, praticamente, 100 % entre todas elas (evidenciado na Figura 4.16). Os investigadores anseiam, cada vez mais, por conhecer a similaridade/dissimilaridade entre sequências uma vez que esta mostra estar intimamente correlacionada com as estruturas e funções biológicas das mesmas, sendo portanto este conhecimento bastante importante não só para a investigação básica como também para o desenvolvimento de novos fármacos (Hua *et al.*, 2014). O estudo desta região poderá ser um importante marco, uma vez que, poderá ser ela que, efetivamente, seja responsável pela atividade antitumoral observada na fração CC3.

De modo a confirmar se a sequência de RNA em causa já teria sido alguma vez identificada, procedeu-se a varias pesquisas BLASTN, nas quais se fez o alinhamento de cada uma das sequências em causa com o genoma de *Cantharellus cibarius* e com o genoma de *Homo sapiens*, assim como pesquisas nas mais variadas bases de dados, e nenhuma similaridade relevante foi encontrada. Atendendo ao facto de que o genoma Humano se encontra completamente sequenciado e que em relação ao genoma de *Cantharellus cibarius* menos estudos foram efetuados, infere-se que a sequência responsável pela morte celular de células cancerígenas se trate de uma sequência nova do genoma de *C. cibarius*, nunca antes

identificada, e que não existe no genoma Humano. Sendo, à partida, sequências de pequeno tamanho e tendo-se verificado que as mesmas tinham uma elevada percentagem em guaninas e citosinas, pensou-se que estas poderiam funcionar através de estruturas secundárias (Chan *et al.*, 2009; Galtier e Lobry, 1997). Assim, as mesmas foram sujeitas a análise bioinformática através do programa *RNAfold*, verificando-se que estas sequências têm tendência a formar estruturas secundárias com elevada probabilidade (Tabela 4.8).

Uma vez que quanto mais negativos forem os valores de MFE, mais estável será a sequência em causa (Pervouchine *et al.*, 2003; Trotta, 2014), os valores obtidos indicam que as mesmas têm tendência a formar estruturas secundárias estáveis, o que também pode explicar o facto desta molécula ser estável ao ponto de se conseguir visualizar por RNA-FISH, pois se a mesma não o fosse, não seria capaz de se integrar nas células. Desde modo e considerando todos os dados obtidos até então, sabe-se que esta molécula tem estabilidade suficiente para resistir a todos os processos de extração a que foi submetida e para que ocorra a sua entrada na célula, atravessando tanto a membrana celular como nuclear, permanecendo dentro da mesma sem ser degradada por todas as nucleases aí presentes (Houseley e Tollervey, 2009).

Dadas as evidências relativas ao pequeno tamanho da molécula em causa, à análise da sua sequência e ao fenótipo observado nas células, é possível inferir que o RNA em causa é um pequeno RNA que, de alguma forma, auxilia a regulação da via celular responsável pelo fenótipo de morte celular observado funcionando assim como regulador. Deste modo, infere-se que este RNA responsável pela atividade antitumoral estudada neste trabalho se trata de um sncRNA regulador.

5.4. Tratamento de células Caco-2 com a fração CC3 e RNA *Fluorescent in situ hybridization* (RNA-FISH)

Com o objetivo de demonstrar a atividade antitumoral da fração CC3 purificada a partir do HMWM isolado de *C. cibarius*, colocou-se a mesma em contacto com células de uma linha celular tumoral de cancro colorretal (Caco-2).

A atividade antiproliferativa desta fração, cuja constituição permanecia desconhecida, já tinha sido verificada, em estudos anteriores, contra células do carcinoma do cólon (HT29 e LS180) para os cogumelos *Cantharellus cibarius*, *Boletus edulis* e *Boletus spretus* (Cardoso,

2011). Importante referir que, na mesma investigação, as frações reveladoras de atividade antitumoral foram também colocadas em contacto com células normais do epitélio do cólon humano (CCD841) (na mesma gama de concentrações em que tinham sido testadas anteriormente) e nenhum efeito citotóxico foi observado.

No presente trabalho, colocou-se, em duas lâminas, células da linha celular Caco-2 em proliferação. Numa das lâminas adicionou-se apenas meio de cultura, funcionando como controlo negativo, e na outra adicionou-se a fração CC3 (previamente ressuspensa em tampão apropriado). Na primeira, observou-se uma contínua proliferação celular, sendo que as células se continuaram a dividir. Na lâmina que continha a fração de interesse, ao fim de algumas horas, verificou-se a ocorrência de morte celular das células presentes na mesma, concluindo-se assim que este RNA terá uma função crucial na ocorrência do fenótipo verificado. Estudos efetuados por Lemieszek *et al.* relativamente à fração CC3 isolada do cogumelo *C. cibarius* indicaram que o tipo de morte celular ocorrida em outras linhas celulares é a apoptose (artigo em preparação). No entanto, no presente trabalho foi utilizada outra linha celular pelo que, para determinar qual o tipo de morte celular ocorrido teriam de ser feitos mais ensaios (*e.g.* citometria de fluxo).

Utilizando as lâminas empregadas no procedimento anterior, procedeu-se à realização da técnica de RNA-FISH a qual tem como pressuposto detetar e localizar, intracelularmente, RNAs na célula. Nas imagens obtidas, foi possível visualizar que existe presença de RNAs constituintes da fração CC3 tanto no citoplasma como no núcleo da célula.

Esta observação indica que os RNAs provenientes do cogumelo *C. cibarius* se introduzem no interior das células atravessando tanto a membrana celular como nuclear. O modo como um RNA exógeno se introduz nas células pode variar consoante o RNA em causa, sendo que o mesmo pode entrar por mecanismos passivos e não específicos ou pode existir algum mecanismo específico de entrada (*e.g.* ligação a recetores específicos) (Saleh *et al.*, 2006). Neste caso, como é observável RNAs no citoplasma e núcleo das células, infere-se que o mecanismo de entrada seja, provavelmente, inespecífico.

É sabido que as membranas celulares das células cancerígenas diferem das membranas celulares das células saudáveis, nomeadamente a sua composição química, na medida em que as primeiras revelam manter elevadas concentrações de Na^+ no seu interior (Cone, 1970, 1975; Seeger e Wolz, 1990). Este facto faz com que a superfície externa da membrana fique carregada negativamente e com que o potencial membranar das células cancerígenas seja mais baixo comparativamente com as células saudáveis (Cure, 1991) o que por sua vez, leva a que estas

membranas tenham uma maior permeabilidade e condutividade (Haltiwanger, 2014). Este facto, acoplado com a presença de fosfolípidos na fração de interesse, poderá explicar a entrada do RNA no interior das células estudadas, uma vez que a interação fosfolípido-RNA pode favorecer a passagem do ácido nucleico através da membrana celular (Khvorova *et al.*, 1999; Michanek *et al.*, 2010; Vlassov e Yarus, 2002). No entanto, seriam necessários estudos adicionais de modo a perceber, ao certo, o mecanismo envolvido.

Os experimentos realizados por Lemieszek *et al.*, assim como os realizados na presente dissertação, mostram-se bastante promissores na medida em que sugerem, num futuro próximo, a possível utilização desta fração ou do RNA constituinte da mesma em terapias anticancerígenas, podendo trazer assim a descoberta de um possível novo alvo terapêutico.

Capítulo 6

Conclusões e perspectivas futuras

Capítulo 6: Conclusões e perspectivas futuras

O trabalho apresentado nesta dissertação constitui uma evidência clara da atividade antitumoral da fração CC3 isolada do cogumelo *Cantharellus cibarius*. Por isolamento e caracterização química da mesma, inserem-se na presente dissertação, demonstrações inequívocas de que o principal constituinte da fração de interesse é o RNA.

Tendo confirmado, por várias metodologias, que a molécula causadora de atividade antitumoral é o RNA, procedeu-se, neste trabalho, à sequenciação e análise bioinformática das sequências obtidas de modo a determinar qual seria o tipo de RNA em causa. Através dos resultados conseguidos, infere-se que se tratam de RNAs de tamanhos variados e reduzidos, com elevada percentagem em guaninas e citosinas e com capacidade para formar estruturas secundárias estáveis. Dadas estas evidências e tendo em consideração o fenótipo observado sugere-se que se trata de um sncRNA regulador.

De modo a confirmar se a sequência em análise já teria sido, outrora, identificada e catalogada, realizaram-se vários alinhamentos BLASTN, tanto com o genoma do próprio *Cantharellus cibarius* como com o genoma Humano, assim como pesquisas nas mais variadas bases de dados. Nenhuma similaridade relevante foi encontrada. Deste modo, conclui-se que a sequência responsável pela atividade anticancerígena seja uma sequência nova, nunca antes identificada, do genoma de *Cantharellus cibarius*.

Através da metodologia RNA-FISH, executada depois do tratamento de células Caco-2 com a fração CC3, nas quais ocorreu morte celular ao fim de algumas horas, foi possível observar que este sncRNA regulador, estando apenas em contacto com as células cancerígenas, é capaz de se introduzir nas mesmas, ultrapassando tanto a barreira celular como nuclear, acumulando-se no citoplasma e no núcleo e provocando, por conseguinte, o fenótipo celular descrito. O mecanismo de entrada nestas células não foi estudado neste trabalho, assim, como perspectiva futura, seria interessante verificar se em células saudáveis (nas quais já foi observado, em estudos anteriores, que não ocorre morte celular quando em contacto com a fração CC3) este RNA se integra, ou não, nas mesmas. Deste modo, poder-se-ia adquirir algum conhecimento *extra*, pois caso não se verificasse a presença de RNA no interior das células saudáveis poderia significar que a membrana celular das células cancerígenas teria alguma característica específica que permitisse a entrada do mesmo. Por outro lado, se ocorresse

entrada em ambas as células, poderia significar que o mecanismo de entrada é totalmente inespecífico mas, no entanto, o mecanismo de ação é apenas dirigido para células cancerígenas.

Uma vez demonstrada a atividade antitumoral e identificado o tipo de molécula em causa, procedeu-se, de forma ainda muito preliminar, à síntese artificial da sequência de interesse (*mimics*), tendo por base a região conservada, com o objetivo de observar, em trabalhos futuros, se esta resultará no mesmo fenótipo observado inicialmente pela colocação direta da fração CC3 em contacto com as células.

Assim, num futuro próximo, um dos principais objetivos de continuação deste trabalho será o teste do novo *mimics* em linhas celulares cancerígenas de modo a observar se terá, ou não, o mesmo fenótipo de morte celular. Caso os resultados sejam positivos, será interessante testar, adicionalmente, o *mimics*, em células saudáveis, de modo a verificar se este terá algum efeito negativo nas mesmas, provocando também a sua morte, ou se, por outro lado, este efeito de morte celular é observado apenas em células tumorais (tal como acontece com a utilização direta da fração CC3).

Posteriormente, seria igualmente relevante proceder a vários estudos de modo a decodificar qual será o tipo de sncRNA regulador aqui presente e a sua estratégia de entrada nas células e o modo como provoca, tão rapidamente e a baixas concentrações, a morte celular de um elevado número de células.

Na verdade, ainda muitas pesquisas têm de ser efetuadas. No entanto, o maior e principal objetivo desta investigação será, no futuro, proceder a estudos *in vivo* de modo a confirmar a ação desta molécula podendo, posteriormente, proceder à sua incorporação em fármacos de modo a que seja utilizada como um novo alvo terapêutico contra determinados tipos de cancro.

Capítulo 7

Referências

Capítulo 7: Referências

Referências Bibliográficas

- Aken B., Achuthan P., Akanni W., Amode M., Bernsdorff F., Bhai J., Billis K., Carvalho-Silva D., Cummins C., Clapham P., Gil L., Girón C., Gordon L., Hourlier T., Hunt S., Janacek S., Juettemann T., Keenan S., Laird M., Lavidas I., Maurel T., McLaren W., Moore B., Murphy D., Nag R., Newman V., Nuhn M., Ong K., Parker A., Patricio M., Riat S., Sheppard D., Sparrow H., Taylor K., Thormann A., Vullo A., Walts B., Wilder P., Zadissa A., Kostadima M., Martin F., Muffato M., Perry E., Ruffier M., Staines D., Trevanion S., Cunningham F., Yates A., Zerbino R. e Flicek P.** (2017) Ensembl 2017. *Nucleic Acids Research* 45: D635–D642.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. e Walter P.** *Molecular Biology of the Cell*. (2008) 5ª Edição. Garland Science, New York.
- Alexopoulos C., Mims C. e Blackwell M.** *Introductory mycology*. (1996) 4ª Edição. Jhon Wiley & Sons Inc., New York.
- Arneson N., Hughes S., Houlston R. e Done S.** (2008) PCR-Based Whole Genome Amplification. *CSH Protocols* 3 (1): 1–6.
- Asai Y., Takaori K., Yamamoto T. e Ogawa T.** (2004) Protein-bound polysaccharide isolated from basidiomycetes inhibits endotoxin-induced activation by blocking lipopolysaccharide-binding protein and CD14 functions. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 43: 91–98.
- Asif H., Akram M., Saeed T., Khan M., Akhtar N., Rehman R., Shah S., Ahmed K. e Shaheen G.** (2011) Carbohydrates. *International Research Journal of Biochemistry and Bioinformatics* 1 (1): 001–005.
- Axelsson M. e Gentili F.** (2014) A single-step method for rapid extraction of total lipids from green microalgae. *PLoS ONE* 9 (2): e89643.
- Azevedo C. e Sunkel C.** (2012) *Biologia Celular e Molecular*. 5ª Edição. LIDEL, Lisboa.
- Beck J., Benson D., Coleman J., Hoepfner M., Johnson M., Maglott D., Mizrachi I., Morris R., Ostell J., Pruitt K., Rubinstein W., Sayers E., Sirotkin K. e Tatusova T.** (2014) The NCBI Handbook. 2ª Edição. Bethesda (MD).
- Beltrán-Anaya F., Cedro-Tanda A., Hidalgo-Miranda A. e Romero-Cordoba S.** (2016) Insights into the regulatory role of non-coding RNAs in cancer metabolism. *Frontiers in Physiology* 7: 1–21.
- Beluhan S. e Ranogajec A.** (2011) Chemical composition and non-volatile components of Croatian wild edible mushrooms. *Food Chemistry* 124: 1076–1082.
- Biesalski H., Dragsted L., Elmalfa I., Grossklaus R., Müller M., Schrenk D., Walter P. e Weber P.** (2009) Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition* 25: 1202–1205.

- Bowman S. e Free S.** (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays* 28 (8): 799–808.
- EBrown T.** (2010) *Gene cloning and DNA analysis: An introduction*. 6ª Edição. John Wiley & Sons, Inc.
- Cardoso C.** (2011) Isolamento, caracterização química e avaliação da atividade antitumoral de polissacarídeos de cogumelos silvestres comestíveis. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Qualidade Alimentar), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Cargill M.** (2016) A History of Medicinal Mushrooms. *Spirit of Change Magazine*: 22–26.
- Carson S., Miller H. e Witherow D.** (2012) *Molecular Biology Techniques: A Classroom Laboratory Manual*. 3ª Edição. Elsevier Inc., London.
- Chakrabarti P. e Khorana H.** (1975) New approach to the study of phospholipid-protein interactions in biological membranes. Synthesis of fatty acids and phospholipids containing photosensitive groups. *Biochemistry* 14 (23): 5021–5033.
- Chan C., Carmack C., Long D., Maliyekkel A., Shao Y., Roninson I. e Ding Y.** (2009) A structural interpretation of the effect of GC-content on efficiency of RNA interference. *BMC Bioinformatics* 10 (Suppl 1): S33.
- Chassenieux C., Durand D., Jyotishkumar P. e Thomas S.** (2013) Biopolymers: State of the art, new challenges and opportunities. In: *Handbook of biopolymers-based materials: From blends and composites to gels and complex networks*, Thomas S, Durand D., Chassenieux C. e Jyotishkumar P. (ed). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 1–6.
- Chen S., Liang H., Yang H., Zhou K., Xu L., Liu J. e Lai B.** (2017) Long non-coding RNAs: The novel diagnostic biomarkers for leukemia. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 55: 81–86.
- Cheung P.** (2008) *Mushrooms as functional foods*. 1ª Edição. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
- Cheung P.** (2013) Mini-review on edible mushrooms as source of dietary fiber: Preparation and health benefits. *Food Science and Human Wellness* 2: 162–166.
- Cochrane G., Akhtar R., Aldebert P., Althorpe N., Baldwin A., Bates K., Bhattacharyya S., Bonfield J., Bower L., Browne P., Castro M., Cox T., Demiralp F., Eberhardt R., Faruque N., Hoad G., Jang M., Kulikova T., Labarga A., Leinonen R., Leonard S., Lin Q., Lopez R., Lorenc D., Mcwilliam H., Mukherjee G., Nardone F., Plaister S., Robinson S., Sobhany S., Vaughan R., Wu D., Zhu W., Apweiler R., Hubbard T. e Birney E.** (2008) Priorities for nucleotide trace, sequence and annotation data capture at the Ensembl Trace Archive and the EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucleic Acids Research* 36: D5–D12.
- Cohn J., Kamili A., Wat E., Chung R. e Tandy S.** (2010) Dietary phospholipids and intestinal cholesterol absorption. *Nutrients* 2: 116–127.
- Collins F., Green E., Guttmacher A. e Guyer M.** (2003) A vision for the future of genomics research. *Nature* 422: 835–847.
- Cone C.** (1970) Variation of the transmembrane potential level as a basic mechanism of mitosis control. *Oncology* 24: 438-470.

- Cone C.** (1975) The role of surface electrical transmembrane potential in normal and malignant mitogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 238: 420-35.
- Corthell J.** (2014) Agarose gel electrophoresis. In: *Basic molecular protocols in neuroscience: Tips, tricks and pitfalls*. Elsevier Inc. 21–25.
- Cui C., Shu W. e Li P.** (2016) Fluorescence *in situ* Hybridization: Cell-based genetic diagnostic and research applications. *Frontiers in cell and developmental biology* 4 (89): 1–11, 2016.
- Cure J.** (1991) Cancer an electrical phenomenon. *Resonant* 1(1): 937-951.
- Desjardins P. e Conklin D.** (2010) NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of visualized experiments* 45: e2565.
- Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P. e Smith F.** (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350–356.
- Ebrahimzadeh M., Nabavi S., Nabavi S. e Eslami S.** (2010) Antioxidant and free radical scavenging activities of culinary-medicinal mushrooms, golden chanterelle *Cantharellus cibarius* and angel's wings *Pleurotus porrigens*. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 12: 265–272.
- European Commission.** (2010) Functional food - Studies and reports. Bruxelas, Bélgica.
- Exiqon.** (2014) miRCURY LNA™ microRNA Mimics. *Instruction manual v1.0*: 1–14.
- Falandysz J. e Drewnowska M.** (2015) Macro and trace elements in common Chanterelle (*Cantharellus cibarius*) mushroom from the European background areas in Poland: Composition, accumulation, dietary exposure and data review for species. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 50: 374–387.
- Fang S., Zhang L., Guo J., Niu Y., Wu Y., Li H., Zhao L., Li X., Teng X., Sun X., Sun L., Zhang M., Chen R. e Zhao Y.** (2017) NONCODEV5: a comprehensive annotation database for long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Research* : 1–7.
- Fares F. e Jensen C.** (2016) Using Human cancer cell lines as *in vitro* model for testing the efficacy of CDBPA; a new anticancer drug. *Journal of Tissue Science & Engineering* 7 (2): 1000168.
- Ferreira D., Adegas F. e Chaves R.** (2013) The Importance of cancer cell lines as *in vitro* models in cancer methylome analysis and anticancer drugs testing. In: *Oncogenomics and Cancer Proteomics - Novel approaches in biomarkers discovery and therapeutic targets in cancer*, López-Camarillo C. e Aréchaga-Ocampo E. (ed). InTech. 139–166.
- Ferreira I., Vaz J., Vasconcelos M. e Martins A.** (2010) Compounds from wild mushrooms with antitumor potential. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 10 (5): 424–436.
- Ferreira P.** (2009) miRNAs – Conhecimento actual aplicado à medicina. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra - Instituto de anatomia patológica.

- Fogh J., Fogh J. e Orfeo T.** (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell line producing tumors in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute* 59 (1): 221–226.
- Folch J., Less M., Stanley H.** (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* 226: 487–509.
- Forrest M. e Khalil A.** (2017) Review: Regulation of the cancer epigenome by long non-coding RNAs. *Cancer Letters*. 1-7
- Fortino V.** (2012) Sequence analysis in bioinformatics: methodological and practical aspects. Tese (Doutoramento em Biologia de Sistemas), Università Degli Studi di Salerno.
- Foster J. e Woodruff H.** (1943) Microbiological Aspects of Penicillin: I. Methods of Assay. *Journal of Bacteriology* 46: 187–202.
- Galtier N. e Lobry J.** (1997) Relationships between genomic G+C content, RNA secondary structures, and optimal growth temperatures in prokaryotes. *Journal of Molecular Evolution* 44: 632–636.
- Gantier M. e Williams B.** (2007) The response of mammalian cells to double-stranded RNA. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 18 (5-6): 363–371.
- García J. e Agüero S.** (2015) Fosfolípidos: Propiedades y efectos sobre la salud. *Nutrition Hospitalaria* 31 (1): 76–83.
- Garrett M.** (2001) Cell cycle control and cancer. *Current Science* 81 (5): 515–522.
- GE Life Sciences.** (2014) Sepharose Fast Flow ion exchange media and prepacked column formats. *Ion Exchange Chromatography*: 8, 2014.
- Giacco R., Giulio B., Vitale M. e Cozzolino R.** (2013) Functional Foods: Can food technology help in the prevention and treatment of diabetes? *Food and Nutrition Sciences*: 827–837.
- Gomes C., Spencer H., Ford K., Michel L., Baker A., Emanuelli C., Balligand J. e Devaux Y.** (2017) The function and therapeutic potential of long non-coding RNAs in cardiovascular development and disease. *Molecular Therapy: Nucleic Acid* 8: 494–507.
- Gooday G.** (1995) Cell membrane. In: *The Growing Fungus*, Gow N. e Gadd G. (ed). Chapman & Hall. 63–74.
- Goodspeed A., Heiser L., Gray J., Costello J. e Health O.** (2016) Tumor-derived cell lines as molecular models of cancer pharmacogenomics. *Molecular cancer research* 14 (1): 3–13.
- Guaadaoui A., Benaicha S., Elmajdoub N., Bellaoui M. e Hamal A.** (2014) What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus. *International Journal of Nutrition and Food Sciences* 3 (3): 174–179.
- Hall L.** (2010) *DNA and RNA*. 1ª Edição. The Rosen Publishing Group, Inc.
- Haltiwanger S.** (2014) Why electroporation is a useful technique for cancer treatments. In: *Electroporation-Based Therapies for Cancer*, Sundararajan R. (ed). Elsevier. 103–125.
- Han J., Xie H., Sun Q., Wang J., Lu M., Wang W., Guo E. e Pan J.** (2014) Bioinformatic identification and experimental validation of miRNAs from foxtail millet (*Setaria italica*). *Gene* 546 (2): 367–377.

- Hassan M., Rouf R., Tiralongo E., May T. e Tiralongo J.** (2015) Mushroom lectins: Specificity, structure and bioactivity relevant to human disease. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 7802–7838.
- Healthcare G.** (2016) Principles of ion exchange. In: *Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing: Principles and Methods*. General Electric Company. 11000421 AC: 11–25.
- Healthcare G.** (2012) *Spectrophotometry - Handbook*. General Electric Company. 29-0331-82 AB.
- Hernandez L., Kim M., Lyle L., Bunch K., House C., Ning F., Noonan A. e Annunziata C.** (2016) Gynecologic oncology characterization of ovarian cancer cell lines as *in vivo* models for preclinical studies. *Gynecologic Oncology* 142 (2): 332–340.
- Hong M., Wang N., Tan H., Tsao S-W. e Feng Y.** (2015) MicroRNAs and chinese medicinal herbs: New possibilities in cancer therapy. *Cancers* 7: 1643–1657.
- Houseley J. e Tollervey D.** (2009) The many pathways of RNA degradation. *Cell* 136: 763–776.
- Hsia C-Y., Richards M. e Daniel S.** (2015) A review of traditional and emerging methods to characterize lipid–protein interactions in biological membranes. *Analytical Methods* 7: 7076–7094.
- Hua K., Yu Q., Tang J., Zhang R., Zhang Z. e Xie X.** (2014) The similarity/dissimilarity analysis of protein sequence based on nucleotide triplet codon. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 6 (7): 200–207.
- Huang Y., Ren H-T., Zou Q., Wang Y-Q. e Zhang J-L.** (2017) Computational identification and characterization of miRNAs and their target genes from five cyprinidae fishes. *Saudi Journal of Biological Sciences* 24: 1126–1135.
- Inamura K.** (2017) Major tumor suppressor and oncogenic non-coding RNAs: Clinical relevance in lung cancer. *Cells* 6 (12): cells6020012.
- Jafari M., Al-Qahtani M. e Shay J.** (2017) Role of miRNAs in human cancer metastasis : implications for therapeutic intervention. *Seminars in Cancer Biology* 44: 117-131
- Jansson M. e Lund A.** (2012) MicroRNA and cancer. *Molecular Oncology* 6 (6): 590–610.
- Jantaramanant P., Sermwittayawong D., Noipha K., Hutadilok-Towatana N. e Wititsuwannakul R.** (2014) Beta-glucan-containing polysaccharide extract from the grey oyster mushroom [*Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing.] stimulates glucose uptake by the L6 myotubes. *International Food Research Journal* 21 (2): 779–784.
- Jedidi I., Ayoub I., Philippe T. e Bouzouita N.** (2016) Chemical composition and non-volatile components of three wild edible mushrooms collected from northwest Tunisia. *Mediterranean Journal of Chemistry* 5 (3): 434–441.
- Kalač P.** (2009) Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry* 113: 9–16.

- Kalač P.** (2016) *Edible mushrooms: Chemical composition and Nutritional Value*. 1ª Edição. Academic Press.
- Kaushik S. e Kaushik N.** (2016) Non-coding RNA Research Non-coding RNAs in skin cancers : An update. *Non-coding RNA Research* 1: 83-86.
- Khalili M., Ebrahimzadeh M., Omrani F. e Karami M.** (2014) Antihypoxic activities of the golden Chanterelle Mushroom, *Cantharellus cibarius* (higher Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 16 (4): 339–344.
- Khvorova A., Kwark Y-G., Tamkun M., Majerfeld I. e Yarus M.** (1999) RNAs that bind and change the permeability of phospholipid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 10649–10654.
- Kiernan J.** (2007) Indigogenic substrates for detection and localization of enzymes. *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission* 82 (2): 73–103.
- Kim D., Kim J. e Baek D.** (2014) Global and local competition between exogenously introduced microRNAs and endogenously expressed microRNAs. *Molecules and cells* 37 (5): 412–417.
- Kim J., Tay D. e Carcache de Blanco E.** (2008) NF-κB inhibitory activity of compounds isolated from *Cantharellus cibarius*. *Phytotherapy research* 22: 1104–1106.
- Kirk P., Cannon P., Minter D. e Stalpers J.** (2008) *Dictionary of the Fungi*. 10ª Edição. CABI Europe - UK.
- Kolundžić M., Stanojković T., Radović J., Tačić A., Dodevska M., Milenković M., Sisto F., Masia C., Farronato G., Nikolić V. e Kundaković T.** (2017) Cytotoxic and Antimicrobial Activities of *Cantharellus cibarius* Fr. (Cantarellaceae). *Journal of Medicinal Food* 00 (0): 1-7.
- Koontz L.** (2013) Agarose gel electrophoresis. In: *Methods in Enzymology*. 1º Edição Elsevier Inc. 35–45.
- Kozarski M., Klaus A., Vunduk J., Zizak Z., Niksic M., Jakovljevic D., Vrvic M. e Griensven.** (2015) Nutraceutical properties of the methanolic extract of edible mushroom *Cantharellus cibarius* (Fries): primary mechanisms. *Food & Function* 6: 1875–1886.
- Kozonova J. e Povarona N.** (2015) Leading trends in the european functional food market. *Холодильна Техніка Та Технологія* 51 (4): 92–96.
- Kumar R., Tapwal A., Pandey S. e Borah R.** (2013) Macro-fungal diversity and nutrient content of some edible mushrooms of Nagaland, India. *Nusantara Bioscience* 5 (1): 1–7, 2013.
- Lea T.** (2015) Caco-2 Cell Line. In: *The Impact of Food Bio-Actives on Gut Health - In Vitro and Ex Vivo Models*, Verhoeckx K., Cotter P., López-Expósito I., Kleiveland C., Lea T., Mackie A., Requena T., Swiatecka D. e Wichers H. (ed). Springer International Publishing. 103–111.
- Lee A.** (2003) Lipid-protein interactions in biological membranes: A structural perspective. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1612: 1-40.
- Lee A.** (2011) Lipid–protein interactions. *Biochemical Society Transactions* 39: 761–766.

- Lemieszek M., Cardoso C., Nunes F., Barros A., Marques G., Pożarowski P. e Rzeski W.** (2013) *Boletus edulis* biologically active biopolymers induce cell cycle arrest in human colon adenocarcinoma cells. *Food & function* 4: 575–85.
- Lemieszek M., Ribeiro M., Alves H., Marques G., Nunes F. e Rzeski W.** (2016) *Boletus edulis* ribonucleic acid - a potent apoptosis inducer in human colon adenocarcinoma cells. *Food & Function* 0: 1–13.
- Li C. e Chen Y.** (2015) Small and long non-coding RNAs: Novel targets in perspective cancer therapy. *Current genomics* 16: 319–26.
- Li D-W., Castañeda-Ruiz R. e LaMondia J.** (2016) Evolution of fungi and update on ethnomycolgy. In: *Biology of Microfungi*, Li D-W. (ed). Springer International Publishing, 236–263.
- Li J., Wang L., Liang H., Li J., Wang X., Wang L., Wang Y. e Cong W.** (2015) Prediction of pre-microRNA secondary structure based on reverse complementary folding. *IFAC-PapersOnLine* 48-28: 239–244.
- Mabrouk M., Hamdy M., Mamdouh M., Aboelfotoh M. e Kadah Y.** (2006) BIOINFTool : Bioinformatics and sequence data analysis in molecular biology using Matlab. *Cairo International Biomedical Engineering Conference*.
- Magdeldin S.** (2012) Gel Electrophoresis - Principles and Basics. 1ª Edição. InTech.
- Marshall E. e Nair N.** (2009) *Make money by growing mushrooms - FAO Diversification Booklet 7*. Roma, Itália.
- Martirosyan D. e Singh J.** (2015) A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique?. *Functional Foods in Health and Disease* 5: 209–223.
- Marzullo G. e Danforth W.** (1964) Composition of ethanol - Insoluble assimilatory products of oxidative assimilation of acetate by *Euglena gracilis*. *Journal of general microbiology* 34: 21–29.
- Matlock B.** (2015) Assessment of nucleic acid purity. *Technical Note 52646 - Thermo Fisher Scientific*.
- McHugh A.** (2016) *Hygrophoropsis Aurantiaca*, The False Chanterelle. *Crazy About Mushrooms*. Disponível em: <http://blog.crazyaboutmushrooms.com/chanterelle-mushroom-lookalikes-pick-right-mushrooms/>. Consultado a: 21 Outubro 2016.
- McNair H. e Miller J.** (2009) *Basic Gas Chromatography*. 2ª Edição. John Wiley & Sons, Inc.
- McNaught A. e Wilkinson A.** (2014) IUPAC Compendium of chemical terminology. 2ª Edição. Oxford.
- Melo I.** (2010) Fungos. In: *Guia de Campo do Dia B*. Lisboa.
- Méndez-Espinoza C., García-Nieto E., Esquivel A., González M., Bautista E., Ezquerro C. e Santacruz L.** (2013) Antigenotoxic potential of aqueous extracts from the chanterelle mushroom, *Cantharellus cibarius* (higher basidiomycetes), on human mononuclear cell cultures. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 15 (3): 325–332.

- Michanek A., Kristen N., Höök F., Nylander T. e Sparr E.** (2010) RNA and DNA interactions with zwitterionic and charged lipid membranes — A DSC and QCM-D study. *Biochimica et Biophysica Acta* 1798: 829–838.
- Michor F., Nowak M. e Iwasa Y.** (2006) Stochastic dynamics of metastasis formation. *Journal of Theoretical Biology* 240: 521–530.
- Moreira L. e Filho E.** (2008) An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79: 165–178.
- Muszynska B., Kala K., Firlej A. e Sulkowska-Ziaja K.** (2016) *Cantharellus cibarius* - Culinary-medicinal mushroom content and biological activity. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* 73 (3): 589–598.
- Nagata Y., Shimizu E., Hibio N. e Ui-Tei K.** (2013) Fluctuation of global gene expression by endogenous miRNA response to the introduction of an exogenous miRNA. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 11171–11189.
- Ng J., Cho W. e Sze D.** (2016) The use of medicinal mushroom or herb as effective immunomodulatory agent. *Herbal Medicine* 2 (1): 1–13.
- Nielsen S.** (2010) Phenol-sulfuric acid method for total carbohydrates. In: *Food Analysis Laboratory Manual*, Nielsen S. (ed). Springer International Publishing. 47–53.
- Nile S. e Park S.** (2014) Total, soluble and insoluble dietary fibre contents of wild growing edible mushrooms. *Czech Journal of Food Sciences* 32 (3): 302–307.
- Niu N. e Wang L.** (2015) *In vitro* human cell line models to predict clinical response to anticancer drugs. *Pharmacogenomics* 16 (3): 273–285.
- Ocañas F., Parra A., Guerrero G., Garcia J., Ocañas L., Foroughbakhch R. e Martinez M.** (2014) 1-Introduction. In: *Applied Botany - A text Book*. Puspaa Publishing House. 190–206.
- Ooi V. e Liu F.** (2000) Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Current Medicinal Chemistry* 7: 715–729.
- Ouzouni P., Petridis D., Koller W. e Riganakos K.** (2009) Nutritional value and metal content of wild edible mushrooms collected from West Macedonia and Epirus, Greece. *Food Chemistry* 115: 1575–1580.
- Pappalardo G. e Lusk J.** (2016) The role of beliefs in purchasing process of functional foods. *Food Quality and Preference* 53: 151–158.
- Paschoal A., Maracaja-Coutinho V., Setubal J., Simões Z., Verjovski-Almeida S. e Durham A.** (2012) Non-coding transcription characterization and annotation. *RNA Biology* 9: 274–282, 2012.
- Pervouchine D., Graber J. e Kasif S.** (2003) On the normalization of RNA equilibrium free energy to the length of the sequence. *Nucleic acids research* 31 (9): e49.
- Pickard M., Mourtada-Maarabouni M. e Williams G.** (2013) Long non-coding RNA GAS5 regulates apoptosis in prostate cancer cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta* 1832: 1613–1623.

- Prudovsky I., Kumar T., Sterling S. e Neivandt D.** (2013) Protein-phospholipid interactions in nonclassical protein secretion: Problem and methods of study. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 3734–3772.
- Rahul C. e Rajesh M.** (2016) Conserved miRNA detection in the ESTs of *Ganoderma lucidum*. *Research Journal of Biotechnology* 11 (5): 34–42.
- Rathore H., Prasad S. e Sharma S.** (2017) Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. *PharmaNutrition* 5: 35–46.
- Reis A., Rudnitskaya A., Blackburn G., Fauzi N., Pitt A. e Spickett C.** (2013) A comparison of five lipid extraction solvent systems for lipidomic studies of human LDL. *The Journal of Lipid Research* 54 (7): 1812–1824.
- Reis F., Martins A., Vasconcelos M., Morales P. e Ferreira I.** (2017) Functional foods based on extracts or compounds derived mushrooms. *Trends in Food Science & Technology* 66: 48–62.
- Ribeiro B., Pinho P., Andrade P., Baptista P. e Valentão P.** (2009) Fatty acid composition of wild edible mushrooms species: A comparative study. *Microchemical Journal* 93: 29–35.
- Rohrer J.** (2013) Analysis of carbohydrates by High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAE-PAD). *Technical note 20 - Thermo Fisher Scientific*.
- Rop O., Mlcek J. e Jurikova T.** (2009) Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutrition Reviews* 67 (11): 624–631.
- Rouser G., Fleischer S. e Yamamoto A.** (1970) Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 5 (5): 494–496.
- Rupaimoole R. e Slack F.** (2017) MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* 16: 203-222.
- Saha B. e Racine F.** (2011) Biotechnological production of mannitol and its applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89: 879–891.
- Sahu R., Mordechai S. e Manor E.** (2008) Nucleic acids absorbance in Mid IR and its effect on diagnostic variates during cell division: A case study with lymphoblastic cells. *Biopolymers* 89 (11): 993–100.
- Saleh M., Rij., Hekele A., Gillis A., Foley E., Farrell P. e Andino R.** (2006) The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. *Nature Cell Biology* 8 (8): 793–802.
- Sánchez C.** (2017) Bioactives from mushroom and their application. In: *Food Bioactives - Extraction and biotechnology applications*, Puri M. (ed). Springer International Publishing, 23–57.
- Sandhu S.** (2010) *Recombinant DNA Technology*. 1ª Edição. I.K. International Publishing House.

- Schmidt T., Pavinatto F., Caseli L., Gonzaga M., Soares S., Ricardo N. e Oliveira O.** (2009) Interaction of polysaccharide-protein complex from *Agaricus blazei* with Langmuir and Langmuir-Blodgett films of phospholipids. *Journal of Colloid and Interface Science* 330: 84–89.
- Scienova.** (2013) *Guide: Sample dialysis in the lab*. 1ª Edição. Versão 1.31. Scienova GmbH.
- Seeger P. e Wolz S.** (1990) Successful biological control of cancer: By combat against the causes. Neuwieder Verlagsgesellschaft mbH.
- Shen H., Shao S., Chen J. e Zhou T.** (2017) Antimicrobials from mushrooms for assuring food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 16 (2): 316–329.
- Silva A., Vicente H. e Baptista-Ferreira J.** (2013) *Guia do colector de cogumelos - para os cogumelos silvestres comestíveis com interesse comercial em Portugal*. 1ª Edição. Direção-Geral da Agricultura e Desenvolvimento Rural.
- Silva B., Barreira J. e Oliveira M.** (2016) Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: Extraction, biochemistry and protected-delivery technologies. *Trends in Food Science & Technology* 50: 144–158.
- Silva D., Rapior S., Fons F., Bahkali A. e Hyde K.** (2012) Medicinal mushrooms in supportive cancer therapies: An approach to anti-cancer effects and putative mechanisms of action. *Fungal Diversity* 55: 1–35.
- Simonescu C.** (2012) Application of FTIR spectroscopy in environmental studies. In *Advanced Aspects of Spectroscopy*. INTECH, 49–84.
- Smith A.** (2012) Lipid-protein interactions in biological membranes: A dynamic perspective. *Biochimica et Biophysica Acta* 1818: 172–177.
- Snustad D. e Simmons M.** (2011) *Principles of Genetics*. 6ª Edição. John Wiley & Sons, Inc.
- Straus L., Morales M., Carretero J. e Marín-Arroyo A.** (2015) “The Red Lady of El Mirón”. Lower Magdalenian life and death in oldest dryas Cantabrian Spain: An overview. *Journal of Archaeological Science* 60: 134–137.
- Stuart B.** (2004) *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and applications*. John Wiley & Sons, Inc.
- Taofiq O., Martins A., Barreiro M. e Ferreira I.** (2016) Anti-inflammatory potential of mushroom extracts and isolated metabolites. *Trends in Food Science & Technology* 50: 193–210.
- Telenius H., Carter N., Bebb C., Nordenskjöld M., Ponder B. e Tunnacliffe A.** (1992) Degenerate oligonucleotide-primed PCR: General amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13 (3): 718–725.
- Thatoi H. e Singdevsachan S.** (2014) Diversity, nutritional composition and medicinal potential of Indian mushrooms: A review. *African Journal of Biotechnology* 13 (4): 523–545.
- Tornatore L., Sandomenico A., Raimondo D., Low C., Rocci A., Tralau-Stewart C., Capece D., D’Andrea D., Bua M., Boyle E., Duin M., Zoppoli P., Jaxa-Chamiec A., Thotakura A., Dyson J., Walker B., Leonardi A., Chambery A., Driessen C., Sonneveld**

- P., Morgan G., Palumbo A., Tramontano A., Rahemtulla A., Ruvo M. e Franzoso G.** (2014) Cancer-selective targeting of the Nf-KB survival pathway with Gadd45B/Mkk7 inhibitors. *Cancer Cell* 26: 495–508.
- Trotta E.** (2014) On the normalization of the minimum free energy of RNAs by sequence length. *PLoS ONE* 9 (11): e113380.
- Vamanu E.** (2012) *In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of ethanolic extract of lyophilized mycelium of *Pleurotus ostreatus* PQMZ91109. *Molecules* 17 (4): 3653–367.
- Vamanu E. e Nita S.** (2014) Bioactive compounds, antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from *Cantharellus cibarius*. *Revista de Chimie* 65 (3): 372–380.
- Verhoeckx K., Cotter P., Kleiveland C., Lea T., Mackie A. e Requena T.** (eds). (2015) The impact of food bioactives on health. 1ª Edição. Springer International Publishing.
- Vlassov A. e Yarus M.** (2002) Interaction of RNA with phospholipid membranes. *Molecular Biology* 36 (3): 389–393.
- Wu W.** (ed). (2011) *MicroRNA and cancer - Methods and protocols*. Humana Press.
- Wang C., Wei L., Guo M. e Zou Q.** (2013) Computational approaches in detecting non-coding RNA. *Current Genomics* 14: 371–377.
- Wang X., Zhang J., Wu L., Zhao Y., Li T., Li J., Wang Y. e Liu H.** (2014) A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China. *Food Chemistry* 151: 279–285.
- Wang Y., Liu Y., Wang H., Li C., Qi P. e Bao J.** (2012) *Agaricus bisporus* lectins mediates islet β -cell proliferation through regulation of cell cycle proteins. *Experimental biology and medicine* 237: 287–96.
- Wani B., Bodha R. e Wani A.** (2010) Nutritional and medicinal importance of mushrooms. *Journal of Medicinal Plants Research* 4 (24): 2598–2604.
- Wasser S.** (2014) Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. *Biomedical journal* 37: 345–356.
- Wilding J. e Bodmer W.** (2014) Cancer cell lines for drug discovery and development. *Cancer Research* 74 (9): 2377–2385.
- Williams G. e Stoeber K.** (2012) The cell cycle and cancer. *Journal of Pathology* 226: 352–364.
- Williams P.** (2011) Natural polymers: Introduction and overview. In: *Renewable Resources for Functional Polymers and Biomaterials*. Royal Society of Chemistry, 1–14.
- Wirtz D., Wirtz D., Konstantopoulos K. e Searson P.** (2011) The physics of cancer : The role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nature Reviews Cancer* 11(7): 512–522.
- Wu J-Y.** (2015) Polysaccharide-protein complexes from edible fungi and applications. In: *Polysaccharides - Bioactivity and Biotechnology (Volume 2)*, Ramawat G., Mérillon J-M. (eds). Springer International Publishing, 927–938.

- Yang H., Christison T. e Lopez L.** (2016) Determination of total inorganic arsenic in fruit juice using high-pressure capillary ion chromatography. *Technical Note 145 - Thermo Fisher Scientific*.
- Zhang H., Silva B. e Cui J.** (2017) miRDis: a web tool for endogenous and exogenous microRNA discovery based on deep-sequencing data analysis. *Briefings in Bioinformatics*: bbw140.
- Zhao D., Wang Y., Luo D., Shi X., Wang L., Xu D., Yu J. e Liang Y.** (2010) PMirP: A pre-microRNA prediction method based on structure – sequence hybrid features. *Artificial Intelligence In Medicine* 49: 127–132.
- Zhao Y-J., Ni Q. e Wang Z-Z.** (2009) Identification of microRNA precursors with new sequence-structure features. *Journal of Biomedical Science and Engineering* 2: 626–631.

Referências Eletrônicas

- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).** (2017) FAOSTAT - Statistics Database. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RF>. Consultado a: 18 de outubro de 2016.
- Jakapovich I.** (1999) Medicinal mushrooms and their use. *Dr Myko San - Health from Mushrooms*. Disponível em: <http://www.zdravljeizgljiva.hr/en/medicinal-mushrooms-and-their-use/>. Consultado a: 12 de outubro de 2016.
- Kirk M.** (2017). Species Details: *Cantharellus cibarius* Fr., 1821. In: *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 20th December 2017*, Roskov Y., Abucay L., Orrell T., Nicolson D., Bailly N., Kirk P.M., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., De Wever A., Nieukerken E. van, Zarucchi J. e Penev L., (eds). Disponível em: <http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/d559a81b53a76b75917da6188d69b49d>. Consultado a: 26 de outubro de 2017.
- Kuo M.** (2015) *Hygrophoropsis aurantiaca*. *MushroomExpert.Com*. Disponível em: http://www.mushroomexpert.com/hygrophoropsis_aurantiaca.html. Consultado a: 21 de outubro de 2016.
- Lukasik A., Wójcikowski M. e Zielenkiewicz P.** (2016) Tools4miRs – one place to gather all the tools for miRNA analysis. *Bioinformatics*. Disponível em: <https://tools4mirs.org/>. Consultado a: 21 de outubro de 2017.
- San M.** (2015) Medicinal mushroom traditions in the West. *Myko San - Health from Mushrooms*. Disponível em: <http://mykosan.com/medicinal-mushrooms-western-traditional-medicine/>. Consultado a: 15 de outubro de 2016.
- San M.** (2015) Medicinal mushroom traditions of the East. *Myko San - Health from Mushrooms*. Disponível em: <http://mykosan.com/medicinal-mushrooms-traditions-of-the-east/>. Consultado a: 15 de outubro de 2016.
- USDA.** (2016) Basic Report: 11239, Mushrooms, Chanterelle, raw. *National Nutrient Database for Standard Reference Release* 28. Disponível em: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2989?manu=&fgcd=&ds=>. Consultado a: 27 de outubro de 2016.

Referências Fotográficas

Adam Arendell. (2011) *Omphalotus illudens* (Schwein). Disponível em: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:2011-12-20_Omphalotus_illudens_\(Schwein.\)_Bresinsky_%26_Besl_190464.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:2011-12-20_Omphalotus_illudens_(Schwein.)_Bresinsky_%26_Besl_190464.jpg). Consultado a: 20 de junho de 2017.

Andreas Kunze. (2007) *Chanterelle (Cantharellus cibarius)*. Disponível em: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:2007-07-14_Cantharellus_cibarius.jpg. Consultado a: 20 de junho de 2017.

Holger Krisp. (2012) *False Chanterelle - Hygrophoropsis aurantiaca* (Ringingen, Alemanha). Disponível em: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:False_Chanterelle_Hygrophoropsis_aurantiaca.jpg. Consultado a: 20 de junho de 2017.

John Chybowski. (2005) *Omphalotus olearius* (Lindenhurst, Illinois, USA). Disponível em: https://en.wikipedia.org/wiki/File:Omphalotus_olearius_in_NE_IL.JPG. Consultado a: 20 de junho de 2017.

Anexos

ANEXO A

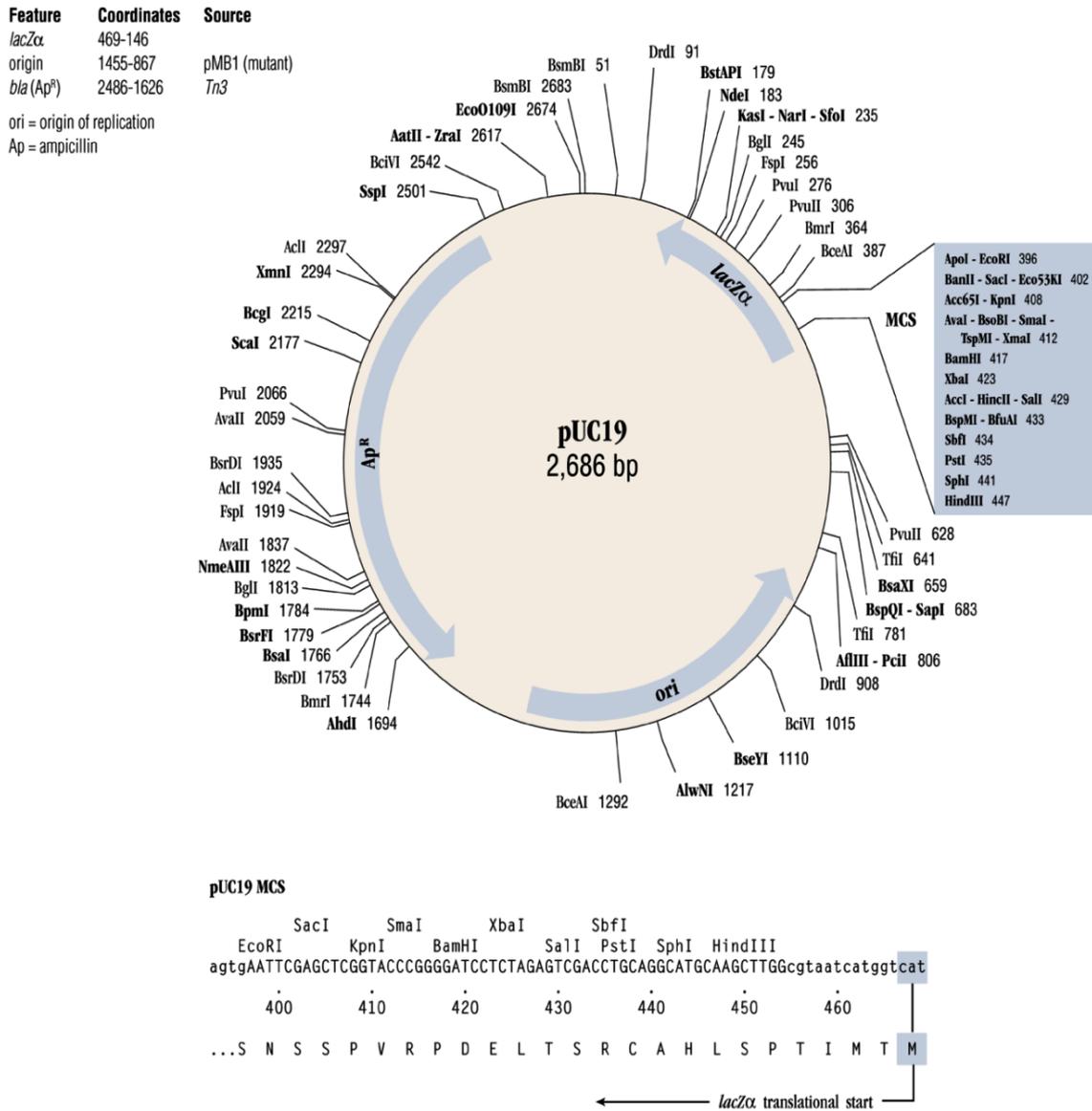


Figura A.1: Mapa do vetor pUC19DNA/SmaI. Adaptado do manual da New England BioLabs.

ANEXO B

Tabela A.1: Similaridades entre as várias sequências obtidas a partir dos clones sequenciados com evidência para similaridades de 100% (vermelho) e similaridades a baixo dos 80% (azul).

	ODOP_6MW_C15	ODOP_6MW_C18	HDOP_6MW_C11	HDOP_6MW_C15	ODOP_6MW_C12	ODOP_6MW_C17	HDOP_FS_C11	ODOP_FS_C11	ODOP_FS_C13	ODOP_6MW_C111	HDOP_FS_C12	ODOP_FS_C17	ODOP_FS_C14	ODOP_FS_C15	ODOP_FS_C12	ODOP_6MW_C14	HDOP_6MW_C14	HDOP_6MW_C12	ODOP_6MW_C13	HDOP_6MW_C13	ODOP_6MW_C19	ORT_C12	ORT_C110	ORT_C17	ORT_C12	
ODOP_6MW_C15	100%																									
ODOP_6MW_C18	100%	100%																								
HDOP_6MW_C11	94.595%	94.595%	100%																							
HDOP_6MW_C15	87.179%	87.179%	97.297%	100%																						
ODOP_6MW_C12	85.366%	85.366%	97.297%	100%	100%																					
ODOP_6MW_C17	92.857%	92.857%	94.595%	89.744%	90.244%	100%																				
HDOP_FS_C11	94.118%	94.118%	94.118%	94.118%	94.118%	94.118%	100%	100%																		
ODOP_FS_C11	95.122%	95.122%	89.189%	84.615%	82.927%	90.244%	100%		100%																	
ODOP_FS_C13	95.122%	95.122%	89.189%	84.615%	82.927%	90.244%	100%	100%																		
ODOP_6MW_C111	90.244%	90.244%	86.842%	82.500%	82.927%	90.244%	91.304%	90.385%	90.385%																	
HDOP_FS_C12	83.721%	83.721%	83.784%	84.211%	85.000%	88.095%	93.333%	90.385%	90.385%	84.615%																
ODOP_FS_C17	93.478%	93.478%	89.189%	84.615%	82.927%	88.095%	100%	100%	100%	90.385%	88.889%															
ODOP_FS_C14	89.130%	93.023%	91.176%	86.111%	81.579%	87.179%	100%	97.368%	97.368%	94.737%	82.500%	93.023%														
ODOP_FS_C15	93.333%	93.023%	91.176%	86.111%	81.579%	87.179%	100%	97.368%	97.368%	94.737%	82.500%	93.023%	95.556%													
ODOP_FS_C12	97.297%	97.297%	91.176%	86.111%	83.784%	91.892%	100%	100%	100%	94.737%	86.486%	100%	100%													
ODOP_6MW_C14	97.619%	97.619%	94.595%	87.179%	85.366%	95.238%	94.118%	95.122%	95.122%	90.244%	83.333%	92.857%	92.308%	92.308%	97.297%											
HDOP_6MW_C14	97.674%	97.674%	94.595%	87.179%	85.366%	92.857%	94.118%	95.122%	95.122%	90.244%	86.047%	93.023%	92.500%	92.500%	97.297%	97.619%										
HDOP_6MW_C12	100%	100%	94.595%	87.179%	85.366%	92.857%	94.118%	95.122%	95.122%	90.244%	85.714%	95.238%	94.872%	94.872%	97.297%	97.619%	100%									
ODOP_6MW_C13	95.745%	95.652%	94.595%	87.179%	85.366%	92.857%	94.118%	95.122%	95.122%	90.244%	83.721%	91.304%	88.636%	88.636%	97.297%	97.619%	97.674%	100%								
HDOP_6MW_C13	93.878%	97.826%	94.595%	87.179%	85.366%	92.857%	94.118%	95.122%	95.122%	90.244%	83.721%	93.478%	86.957%	88.889%	97.297%	97.619%	97.674%	100%	97.872%							
ODOP_6MW_C19	97.826%	97.826%	94.595%	87.179%	85.366%	92.857%	94.118%	95.122%	95.122%	90.244%	83.721%	91.304%	95.349%	95.349%	97.297%	97.619%	97.674%	100%	93.478%	95.652%						
ORT_C12	74.419%	74.419%	68.421%	65.000%	64.286%	67.442%	60.870%	64.151%	64.151%	58.491%	59.259%	64.815%	75.000%	75.000%	76.316%	72.093%	74.419%	74.419%	74.419%	74.419%	74.419%					
ORT_C110	80.000%	80.000%	71.429%	67.568%	66.667%	72.500%	75.000%	79.487%	79.487%	74.359%	70.000%	80.000%	79.487%	79.487%	81.081%	77.500%	80.000%	80.000%	80.000%	80.000%	80.000%					
ORT_C17	90.476%	90.476%	85.714%	75.000%	72.222%	84.211%	100%	100%	100%	88.889%	90.000%	90.476%	85.714%	85.714%	100%	94.737%	100%	100%	90.476%	90.476%	90.476%					
ORT_C12	93.750%	93.750%	91.304%	84.000%	81.481%	89.286%	100%	100%	100%	92.593%	89.655%	93.750%	93.750%	93.750%	100%	96.429%	96.552%	100%	93.750%	96.875%	96.875%					

