



FIGURA 1. *Lentinula edodes*.  
Foto: Martin Wall.

Amin Karmali <sup>a</sup>

Sónia Martins <sup>a</sup>

Eduardo Rosa <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Chemical Engineering and Biotechnology Research Center of Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Rua Conselheiro Emídio Navarro 1959-007 Lisboa, Portugal.

<sup>b</sup> Centro de Investigação e de Tecnologias Agro-ambientais e Biológicas do Departamento de Agronomia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Apartado 1013, Quinta de Prados, 5001-801 Vila Real, Portugal  
erosa@utad.pt

## PL09

### Isolamento de polissacáridos livres e proteína-polissacáridos de estirpes de cogumelos e o seu efeito nas células de carcinoma humanas *in vitro*

#### Resumo

Várias estirpes de cogumelos (ex: *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum* e *Grifola frondosa*) foram cultivadas por fermentação submersa em resíduos agro-industriais a 26° C e 150 rpm, durante duas semanas. Os polissacáridos intra e extracelulares foram purificados por técnicas cromatográficas bem como pela tecnologia de membranas e as preparações purificadas foram parcialmente caracterizadas por várias técnicas analíticas designadamente HPLC, FTIR e sua composição aminoacídica e de glúcidos. Os valores de Mr dos polissacáridos estavam na gama de 9-64 KDa e a análise por HPLC revelou picos de UV e RI com tempos de retenção de cerca de 6 e 12 minutos, respectivamente. A análise por FTIR apresentou várias bandas de absorção que são características destes polissacáridos nomeadamente 846,5; 1.032,3; 1.186,4; 1471; 1648,8; 2739,6 y 3419,3/cm. As preparações purificadas de polissacáridos foram usadas para analisar o seu efeito na proliferação celular de linhas celulares de carcinoma humanos de cólon HCT15, HCT116 e de útero RL 95. A viabilidade celular e a actividade metabólica destas linhas celulares foram determinadas usando azul de tripano e MTT, respectivamente. A indução de apoptose celular devido à presença de alguns polissacáridos em linhas celulares de carcinoma humanos foi investigada usando citocromo C e caspase como marcadores de apoptose celular. Os resultados obtidos sugerem fortemente que algumas preparações purificadas de polissacáridos apresentam inibição de crescimento celular bem como a indução de apoptose celular comparado com as linhas celulares sem qualquer tipo de polissacáridos. O trabalho de I&D em curso visa usar estes polissacáridos *in vivo* em humanos e animais com diferentes tipos de carcinoma.

#### Palavras chave

*Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, polissacáridos, apoptose celular, linhas celulares de carcinoma.

## Aislamiento de polisacáridos y proteínas, polisacáridos de cepas de hongos y su efecto en el carcinoma de células humanas *in vitro*

### Resumen

Varias cepas de hongos (por ejemplo: *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum* y *Grifola frondosa*) fueron cultivadas por fermentación sumergida en residuos agroindustriales a 26 °C y 150 rpm, durante dos semanas. Los polisacáridos intra y extracelulares se purificaron mediante técnicas cromatográficas así como por tecnología de membranas y las preparaciones purificadas fueron parcialmente caracterizadas por diversas técnicas analíticas, incluyendo HPLC, FTIR y la determinación de su contenido de aminoácidos y carbohidratos. Los valores de Mr de los polisacáridos se encontraban en el rango de 9 a 64 kDa y el análisis por HPLC mostró picos de UV e IR con tiempos de retención de alrededor de 6 y 12 minutos, respectivamente. El análisis por FTIR mostró varias bandas de absorción que son características de estos polisacáridos, a 846,5; 1.032,3; 1.186,4; 1471; 1648,8; 2739,6 y 3419,3/cm. Los preparados de polisacáridos purificados fueron utilizados para examinar su efecto sobre la proliferación celular de líneas celulares de carcinoma de colon humano HCT15, HCT116 útero y RL 95. La viabilidad celular y la actividad metabólica de estas líneas celulares se determinaron utilizando el azul de Tripán y MTT, respectivamente. La inducción de apoptosis sobre líneas celulares de carcinoma humano, debida a la presencia de algunos polisacáridos, se investigó usando el citocromo C y la caspasa como marcadores de apoptosis celular. Los resultados sugieren que algunos preparados de polisacáridos purificados inhiben el crecimiento celular o inducen la apoptosis. El trabajo de I+D en curso tiene como objetivo utilizar estos polisacáridos *in vivo* en animales y seres humanos con diferentes tipos de cáncer.

### Palabras clave

*Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, polisacáridos, apoptosis celular, líneas celulares de carcinoma.

## Isolation of free and protein-bound polysaccharides from mushroom strains and their effect on human carcinoma cell lines *in vitro*

### Abstract

Several mushroom strains (i.e. *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum* and *Grifola frondosa*) were grown by submerged fermentation in agro-industrial wastes at 26°C and 150 rpm, for two weeks. Intracellular and extracellular polysaccharides were isolated by chromatographic techniques as well as by membrane technology and purified preparations were partially characterized by several analytical techniques such as HPLC, FTIR and the determination of their amino acid and carbohydrate compositions. The Mr values of such polysaccharides were in the range of 9 – 64 kDa and HPLC analysis revealed peaks of UV and RI with retention times of about 6 and 12 minutes, respectively. FTIR analysis exhibited several absorption bands which are characteristics of these polysaccharides, namely 846,5; 1.032,3; 1.186,4; 1471; 1648,8; 2739,6 y 3419,3/cm. Purified preparations of polysaccharides were used to study their effect on cell proliferation of human carcinoma cell lines *in vitro* such as colon carcinoma cell lines HCT15, HCT116 and SW480 and endometrium carcinoma cell line RL 95. Cell viability and metabolic activity of such cell lines were determined using trypan blue and MTT, respectively. The induction of cell apoptosis due to the presence of some polysaccharides in human carcinoma cell lines was investigated using cytochrome C and caspase as cellular apoptosis markers. The data obtained strongly suggest that some purified preparation of polysaccharides inhibited cell growth as well as induction of cell apoptosis compared with cell lines without any polysaccharide. R+D work is in progress to use such polysaccharides *in vivo* both in humans as well as in animals with several types of carcinoma.

### Key words

*Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, polysaccharides, cell apoptosis, carcinoma cell lines.

*Agradecimientos: Os autores agradecem a FCT pelo financiamento ( PTDC/AGR-AAM/74526/2006) e o financiamne-to base da FCT para a unidade de I & D 702.*

### Referências bibliográficas

1. Wasser, S.P.; Weis, A.L. (1999). Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycete mushrooms: a modern perspective. Review Critical Review Immunol. 19: 65-96.
2. Israilides, C; Kletsas, D; Arapoglou, D; Philippoussis A; Pratsinis, H; Ebringerová, A; Hřibalová, V; Harding S.E. (2008). In vitro cytostatic and immunomodulatory properties of the medicinal mushroom *Lentinula edodes* Phytomedicine 15: 512–519.