

Andréa Vanessa Ferreira Belik

Ação da fração polissacarídica de *Agaricus blazei* sobre o desenvolvimento tumoral, a atividade linfoproliferativa e a produção de citocinas por esplenócitos de camundongos com tumor subcutâneo de Ehrlich.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu- Universidade Estadual Paulista, para a obtenção do título de Mestre em Patologia

Orientador: Prof. Dr. Ramon Kaneno

Botucatu

2003

Andréa Vanessa Ferreira Belik

Ação da fração polissacarídica de *Agaricus blazei* sobre o desenvolvimento tumoral, a atividade linfoproliferativa e a produção de citocinas por esplenócitos de camundongos com tumor subcutâneo de Ehrlich.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu- Universidade Estadual Paulista, para a obtenção do título de Mestre em Patologia

Orientador: Prof. Dr. Ramon Kaneno

Botucatu – SP

2003

SUMÁRIO

I. Revisão bibliográfica	1
Introdução.....	1
Participação de citocinas na resposta antitumoral.....	3
Tumor de Ehrlich	7
Potencial imunomodulador de cogumelos comestíveis.....	9
Cogumelo <i>Agaricus blazei</i>	11
II. Referências Bibliográficas	17
III. Manuscrito	29
Resumo	30
Introdução	31
Material e Métodos	33
Resultados	40
Discussão	51
Referências bibliográficas	58
IV. Apêndice	63

I-Revisão Bibliográfica

Introdução

Atualmente, o câncer (neoplasia maligna) se constitui na segunda causa de morte por doença no Brasil e o Instituto Nacional do Câncer, órgão do Ministério da Saúde, estima que, no ano de 2003, haverão 402.190 casos novos e 126.960 óbitos pelas diferentes formas da doença, valores bem superiores aos estimados para o ano anterior. Para o sexo masculino, são esperados 186.155 casos novos e 68.350 óbitos, enquanto, para o sexo feminino são estimados 216.035 casos e 58.610 óbitos (INCA, 2003).

As neoplasias malignas são classificadas de acordo com a origem embrionária dos tecidos dos quais são derivados. Mais de 80% são carcinomas, neoplasias que se originam de células epiteliais, como a pele ou o revestimento epitelial de órgãos e glândulas internas. Assim, as neoplasias malignas mais comuns na população como as de cólon, bexiga, próstata e pulmão são carcinomas. Os sarcomas são derivados do tecido mesenquimatoso, como ossos, gordura e cartilagem. Os linfomas são neoplasias de natureza linfóide, enquanto leucemias são neoplasias malignas de células hematopoéticas de origem medular que se mantêm em suspensão (Weinberg, 1996; Goldsby, 2000; Cotran, 2000). A neoplasia caracteriza-se pelo crescimento desordenado de células, acompanhado de infiltração progressiva, invasão e destruição do tecido circunjacente, que pode resultar em metástases para outras regiões do corpo (Cotran, 2000). Em alguns casos, clones de células cancerosas podem deslocar-se, invadindo os vasos sanguíneos ou linfáticos, através dos quais são transportados para órgãos distantes, onde podem iniciar novo foco proliferativo denominado metástase (Cotran, 2000; Goldsby, 2000). Cerca de 30% dos pacientes com diagnóstico de tumores sólidos (excluindo-se os cânceres de pele não melanoma)

desenvolvem metástases, fato que reduz acentuadamente a possibilidade de cura desses pacientes (Cotran, 2000).

A causa básica do desenvolvimento neoplásico está relacionada ao funcionamento inadequado de genes reguladores da proliferação das células transformadas. Em condições normais o crescimento celular é controlado por duas classes de genes, uma que codifica proteínas indutoras da transmissão de sinais positivos para a proliferação (proto-oncogenes), e outra que participa do controle negativo da proliferação (genes supressores). Após alterações mutacionais, os proto-oncogenes se tornam ativados atuando como oncogenes, proporcionando estímulos para o crescimento celular desordenado ao passo que a inativação dos genes supressores desempenha papel chave na progressão da maioria dos cânceres humanos (Cotran, 2000).

Além dos fatores genéticos, o desenvolvimento do câncer é fortemente dependente da influência do ambiente. A maioria dos cânceres humanos, cerca de 80% a 90%, está relacionada a carcinógenos encontrados no ambiente, incluindo o ambiente ocupacional (e.g. indústrias químicas e afins) e hábitos associados ao meio sócio-cultural (e.g. estresse, alimentação, tabagismo, exposição à luz solar) (INCA, 2003). Estudos experimentais têm demonstrado que fatores de natureza variada como agentes físicos (e.g. raio ultravioleta, radiação ionizante), químicos (e.g. presentes no cigarro) e biológicos (e.g. vírus do papiloma, vírus Epstein-Barr) são capazes de induzir agressão ao genoma e levar ao desenvolvimento neoplásico, fenômeno constituído de múltiplas etapas (Cotran, 2000, Harris, 1991, Loeb & Loeb, 2000). As células transformadas podem passar a expressar antígenos reconhecíveis pelo sistema imune, desencadeando uma resposta imune específica na tentativa de conter o crescimento tumoral.

Participação de citocinas na resposta antitumoral

A relação entre o hospedeiro e o crescimento neoplásico vem sendo objeto de estudo desde o final do século XIX e pelo menos em alguns casos, a capacidade de desenvolvimento de uma resposta imune eficiente pode ser fundamental na resistência ao crescimento tumoral. Os linfócitos são o principal componente do infiltrado de células mononucleares em tumores sólidos, embora em muitas neoplasias humanas os linfócitos infiltrantes tumorais (TIL) sejam representados por uma mistura heterogênea de linfócitos T, células “natural killer” (NK), linfócitos B e macrófagos (Schreiber & Rowley, 1999; Blanch et al., 1990). Neste sentido, vários autores têm demonstrado que TILs isolados de tumores humanos exercem atividade antitumoral *in vivo* ou *in vitro* contra diferentes linhagens de células tumorais (Wang et al., 1997; Nash et al., 1998; Ito et al., 1999). Assim, a experimentação animal e investigações clínicas têm demonstrado que os linfócitos T, que controlam o desenvolvimento da resposta imunológica específica, são essenciais na rejeição tumoral (Schreiber, 1997; Schreiber & Rowley, 1999). Os linfócitos T CD8⁺ podem ser efetivos na resposta antitumoral, pois reconhecem peptídeos de antígenos tumorais apresentados em associação com a molécula de classe I do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) da célula transformada. Células CD8⁺ com ação citolítica (CTL), são capazes de eliminar células infectadas por vírus e células neoplásicas por meio da secreção de grânulos citotóxicos e/ou indução de apoptose da célula alvo (Abbas, 2000; Stittes, 2000). Essas células, quando ativadas, são capazes de secretar citocinas como IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- β e em menor quantidade, IL-2 (Abbas, 2000; Schreiber, 1999), direta ou indiretamente ligadas à resposta antitumoral.

As células T CD4⁺, que atuam preferencialmente como células T auxiliares (Th) apesar de não promoverem lise direta de células tumorais, estimulam outras células do sistema imunológico através da secreção de citocinas (Abbas, 2000; Ossendorp et al., 2000) que regulam a intensidade e duração da resposta imunológica, estimulando ou inibindo a ativação, proliferação e/ou diferenciação de várias células e regulando a secreção de anticorpos ou de outras citocinas (Abbas, 2000; Goldsby, 2000). De acordo com o padrão de secreção de citocinas, as células Th são caracterizadas como Th1 ou Th2, cujo equilíbrio é fundamental para o estabelecimento de uma resposta imune eficiente (Abbas, 2000; Mossman & Sad, 1996; Ossendorp et al., 2000). Dependendo das citocinas produzidas durante a interação tumor:hospedeiro pode ocorrer a inibição ou o favorecimento do crescimento tumoral (Seung et al., 1999; Schreiber & Rowley, 1999).

Alterações nos níveis de citocinas têm sido relatadas em estudos experimentais e clínicos tanto *in vivo* como *in vitro* (Romagnoni, 1996; Mocellin et al., 2001). Neste sentido, Coley em 1894, já havia observado que alguns pacientes com câncer que contraíam infecções bacterianas severas, apresentavam remissão do tumor. Este efeito foi posteriormente atribuído à ação de endotoxinas sobre a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) pelos macrófagos, ocasionando lesão do tecido tumoral (Parmiani et al., 1999). Assim, o TNF- α , citocina produzida principalmente por macrófagos, é conhecido como um mediador capaz de eliminar células tumorais (Liles & Van Voorhis, 1995; Tracey, 1994). Esta citocina é considerada um mediador chave na inflamação, na resposta do hospedeiro a injúrias, invasão por microrganismos e parasitas ou nas neoplasias. Desse modo o TNF- α ativa macrófagos e em casos de neoplasias, pode apresentar citotoxicidade para células tumorais (Tracey, 1994). Por outro lado, observa-se

que embora o TNF- α iniba a angiogênese em altas concentrações, esta citocina estimula o crescimento tumoral quando presente em baixas concentrações (Beissert et al., 1989; Seung et al., 1999; Schreider & Rowley, 1999).

Outra citocina que exerce efeitos antitumorais, através de mecanismos diretos ou indiretos, é o interferon gama (IFN- γ), produzido principalmente pelas células NK e linfócitos Th1 em resposta a um estímulo imunológico (Abbas, 2000). As suas principais propriedades biológicas são indução da produção de reativos intermediários do oxigênio e nitrogênio e potente estimulação de macrófagos com aumento de sua atividade microbicida (Stites, 2000; Whintrout & Varesio, 1991). Esta citocina também estimula a transcrição de genes de IL-1 e TNF- α e moléculas do MHC de classes I e II, o que amplifica a fase de reconhecimento do antígeno na resposta imune (Goldsby, 2000).

O IFN- γ também ativa os linfócitos T promovendo sua diferenciação para Th1 e inibindo o perfil Th2. Além disso, esta citocina aumenta a citotoxicidade das células NK, ativa as células endoteliais para adesão de linfócitos T, além de potencializar o efeito do TNF- α sobre as mesmas (Stites, 2000; Abbas, 2000). O IFN- γ ainda apresenta atividade antiproliferativa direta e propriedades anti-angiogênicas. Entre os tumores humanos, tem sido demonstrada a expressão de altos níveis de IFN- γ em regressões espontâneas primárias de carcinomas de célula basal (Wong et al., 2000) e melanoma (Lowes et al., 1997). *In vitro*, a citotoxicidade dos TILs isolados de melanoma (Hom et al., 2000), ou dos cânceres de ovário e bexiga (Goedegebuure et al., 1997) está associada à citocinas do perfil Th1 e altos níveis de expressão de IFN- γ . Após administração intravenosa da combinação de IL-2 e IL-12 em pacientes com carcinoma de células renais metastáticas ou com melanoma, observou-se que a resposta imunológica está associada com elevados níveis de IFN- γ

(Gollob et al., 2000). No modelo murino de carcinoma de células escamosas oral, Thomas et al., 2000 observaram que a regressão tumoral induzida por IL-2 é dependente de IFN- γ , pois o mesmo não ocorre em animais “knock out” de genes que codificam IFN- γ . Por outro lado, Poehlein et al., (2001) observaram que a regressão de metastases pulmonares em tais camundongos, tratados com imunoterapia adotiva é mediada por células T e independente de IFN- γ .

A interleucina-10 (IL-10), é uma potente citocina imunossupressora, produzida por linfócitos T, macrófagos, queratinócitos e linfócitos B, e apresenta como principais atividades biológicas a supressão da atividade de macrófagos (por exemplo, apresentação de antígenos e atividade microbicida), a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e a indução de proliferação de linfócitos B e secreção de imunoglobulinas (Liles & Van Voorhis, 1995; Abbas, 2000). Alguns autores têm demonstrado que a citocina IL-10 é produzida por uma variedade de tumores sólidos, favorecendo o desenvolvimento tumoral (Tetsuhiro et al., 1999). A expressão de mRNA da IL-10 tem sido encontrada numa variedade de tumores humanos, incluindo o de ovário (Pisa et al., 1992), bexiga (Venetsanakos et al., 1995), células renais (Nakagomi et al., 1995) e melanomas (Kruger-Krasagakes et al., 1994), especialmente de lesões metastáticas (Sato, 1996). Apesar desta citocina ter sido associada com a inibição do crescimento de melanoma murino (Walos et al., 1999), a proliferação de várias linhagens de células de melanoma humano foi aumentada por IL-10 exógena, sugerindo que esta citocina age como um mecanismo de escape tumoral (Wojtowicz-Praga et al., 1997; Sato, 1996, Yue et al., 1997). Por outro lado, na presença de IL-2, a proliferação de células T CD8⁺ ativadas pode ser promovida pela IL-10 (Groux et al., 1998) e a atividade de células NK pode ser aumentada pela

combinação de IL-10 e IL-18 (Cai et al., 1999). Embora o uso de citocinas venha sendo testado em várias triagens clínicas, modelos experimentais continuam sendo fundamentais no estudo da resposta imune aos tumores, bem como das diferentes formas de manipulação da resposta.

Tumor de Ehrlich

O tumor de Ehrlich é originário de tumor mamário espontâneo de camundongo, não-metastático, descrito pela primeira vez por Ehrlich & Apolant (1905). Este tumor foi mantido em animais de experimentação pela transplantação sucessiva no tecido subcutâneo e estudos posteriores demonstraram que as células do tumor de Ehrlich eram capazes de crescer em suspensão no fluído ascítico e desde então, este tumor tem sido mantido em animais de laboratório tanto na forma ascítica, quando implantado na cavidade peritoneal, como na forma sólida, quando implantado no tecido subcutâneo. Estas células são capazes de se desenvolver em qualquer linhagem de camundongo, não sendo afetadas pela incompatibilidade entre antígenos do MHC, e não regridem espontaneamente (Sigiura et al., 1965; Carry et al., 1979; Fecchio, 1989).

Uma das características principais do tumor de Ehrlich é que na forma ascítica sua presença não induz resposta inflamatória em camundongos (Fecchio et al., 1990), entretanto, foi demonstrado que camundongos da linhagem CAF₁ (originária do cruzamento de BALB/c e A/J) apresentam resistência ao tumor de Ehrlich, fato que parece estar relacionado à capacidade desses animais de produzir e sustentar uma resposta inflamatória ao tumor (Bergami et al., 1996). O tumor de Ehrlich possui mecanismos de escape que suprimem o sistema imune do hospedeiro, como demonstrado pela redução da

capacidade de resposta dos linfócitos aos mitógenos (Subiza et al., 1989; Kumagai et al., 1995) e pela progressiva diminuição da atividade das células NK esplênicas (Parhar & Lala, 1985; Parhar & Lala, 1988). Neste sentido, demonstrou-se que células do tumor de Ehrlich liberam substâncias com atividade semelhante ao TGF- β e não possuem receptores específicos para tais substâncias, sugerindo assim que a função desta citocina seria o controle negativo sobre as células de defesa do organismo (Elexpuru et al., 1997).

Kanayama et al. (1982) demonstraram que o crescimento tumoral foi facilitado quando os linfonodos regionais ou o baço foram removidos de animais inoculados com tumor de Ehrlich, sugerindo a importância da resistência imunológica do hospedeiro aos tumores.

Os linfócitos Th esplênicos do hospedeiro, nos primeiros dias de implantação do tumor, apresentam-se drasticamente diminuídos e esta redução é acompanhada por uma redução no número de células CD4⁺ secretoras de IFN- γ (Segura et al., 1997). Aledo et al., (1998) demonstraram uma resposta aguda e rápida, caracterizada por uma diminuição tanto de células CD4 como de CD8. Ao contrário, outras populações esplênicas como macrófagos e células derivadas da medula óssea (CD18) aumentaram significativamente. Na incubação *in vitro* de células esplênicas com mitógeno observou-se que a presença do tumor induz um estado de reduzida capacidade de resposta das células T, principalmente afetando células CD8 e diminuindo a expressão de IFN- γ (Segura et al., 2000). O implante do tumor de Ehrlich na cavidade peritoneal de camundongos a partir do 10º dia de crescimento induziu aumento dos níveis de produção de IL-2 e IL-6, mas não de IL-10 e TNF- α (Gentile, 2001). Não há descrição na literatura sobre o efeito deste tumor sobre a produção de outras citocinas envolvidas na resposta imune como IL-12, IL-4 e TNF- α e

também não se conhece os efeitos do tumor em sua forma sólida, sobre a produção de citocinas.

Potencial imunomodulador de cogumelos comestíveis

O crescente aumento na incidência e a mortalidade por câncer, tem estimulado a busca de métodos terapêuticos em várias direções. Apesar do avanço tecnológico e desenvolvimento de novas drogas antitumorais, muitos pacientes continuam a buscar formas de terapia alternativa, fenômeno observado mesmo em países desenvolvidos como os Estados Unidos e Alemanha (Ernsk & Cassileth, 1997). Entre os chamados “produtos naturais”, várias espécies de cogumelos comestíveis e medicinais têm sido muito explorados quanto ao seu potencial antitumoral (Solomon & Weis, 1999; Kidd, 2000). Pesquisas extensivas sobre complexos polissacarídicos de cogumelos têm contribuído para a aplicação de algumas espécies na medicina, devido aos seus efeitos antitumoral e imunomodulatório (Vicent et al., 1999).

Entre as diferentes espécies estudadas, há relatos de que complexos polissacarídicos provenientes do cogumelo *Tricholoma mongolium* foram capazes de ativar macrófagos, estimulando a apresentação de antígenos por estas células, aumentando a proliferação de células T e inibindo o crescimento de sarcoma 180 implantado em camundongos BALB/c (Wang et al., 1996a). Estes autores também demonstraram que o complexo polissacarídeo-peptídeo extraído do cogumelo *Coriolus versicolor* aumentou a resposta de células T a mitógenos tanto *in vivo* como *in vitro* e não exerceu atividade citotóxica direta contra diferentes linhagens de células (Wang et al., 1996b). Isolado do cogumelo *Flammulina velutipes*, o polissacarídeo injetado no peritônio de camundongos foi capaz de induzir

proliferação de linfócitos esplênicos, e exibiu potente atividade antitumoral contra sarcoma 180 *in vivo*, mas não foi eficiente *in vitro* (Leung et al., 1997). O polissacarídeo GL-B isolado do cogumelo *Ganoderma lucidum* inibiu o crescimento de sarcoma 180 *in vivo*, de maneira dose-dependente e quando adicionado às culturas de macrófagos ou linfócitos, observou-se indução de apoptose e inibição da proliferação das células da linhagem mielóide HL-60 (Zhang & Lin, 1999). Foi extraído da cultura de micélio do cogumelo *Phellinus linteus*, um polissacarídeo (PL) que exibiu atividade imunoestimulante e antitumoral tanto *in vivo* quanto *in vitro*, estimulando a proliferação celular, citotoxicidade das células T citolíticas, aumentando as funções das células NK, macrófagos e a resposta humoral (Kim, 1996). Posteriormente, alguns dos autores deste trabalho, demonstraram que o PL prolongou a sobrevivência de camundongos inoculados com células de melanoma (B16F10) e reduziu a frequência de metástases pulmonares em camundongos inoculados com células de câncer pulmonar (NCI-H23) embora não exerça citotoxicidade direta para estas duas linhagens de células tumorais. Os autores concluíram que a atividade antitumoral do PL é devido a potencialização da imunidade do hospedeiro (Han et al., 1999).

Os efeitos sobre a produção de citocinas também têm sido investigados. A lectina purificada do corpo de frutificação do cogumelo comestível *Volvariella volvacea* (VVL) demonstrou atividade estimulatória potente sobre linfócitos esplênicos e também aumentou a expressão transcricional de IL-2 e IFN-gama (She et al., 1998). Camundongos pré-tratados com BCG foram injetados com lentinana, uma 1-3- β -D-glucana, extraída de *Lentinula edodes* antes da administração de LPS. O pré-tratamento com a glucana induziu inibição de 89% da produção de TNF- α , induzida por LPS e uma moderada redução de 25% de IL-1 β , enquanto não observou-se diferenças significativas nos níveis de IL-6 e IL-10

(Masihi et al., 1997). Diferentemente, Liu et al. (1998), demonstraram que após adição de *L. edodes* em culturas celulares (murinas e humanas), a expressão de genes codificadores de IL-2 e TNF- α aumentaram de maneira dose-dependente, sugerindo que *L. edodes* pode induzir resposta imunológica dependente dos linfócitos T. Estes autores, em 1999, observaram que, de modo similar à lentinana, o PSPC (complexo polissacarídeo-proteína extraído de *Lentinula edodes*), também apresenta ação imunomoduladora. Os polissacarídeos, administrados a camundongos normais, aumentam a expressão de mRNA de IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IFN- γ e GM-CSF em macrófagos peritoniais e células mononucleares do baço.

Cogumelo *Agaricus blazei*

Complexos polissacarídicos obtidos do cogumelo *Agaricus blazei* ss. Heinem. (*A. blazei*), também têm sido avaliados quanto à sua atividade antitumoral, mas ainda são controversos os dados encontrados nos estudos sobre seu papel imunomodulatório na resposta antitumoral.

O *A. blazei* é um cogumelo comestível popularmente conhecido como cogumelo do sol e faz parte de uma divisão do Reino Fungi, denominada Basidiomycota, representada por organismos saprófitas que necessitam de matéria orgânica encontrada na natureza para o seu desenvolvimento. Este cogumelo tem excelente valor nutricional, contendo proteínas, gorduras (ácidos graxos), fibras, açúcares, minerais como P, Fe, Ca, Zn, Cu, Mn, e vitaminas (B1, B2, C, K, D, niacina entre outras) (Mizuno et al., 1990a). Originário da

Mata Atlântica, da região sul do Estado de São Paulo, nos anos 70 foi levado para o Japão, onde se iniciaram as pesquisas sobre suas prováveis propriedades medicinais.

Nas investigações iniciais sobre as propriedades do cogumelo *A. blazei*, Kawagishi et al., (1989, 1990) realizaram extrações sequenciais com etanol, oxalato de amônio e hidróxido de sódio e, através de cromatografia em gel, obtiveram várias frações do produto, testadas quanto à atividade antitumoral no modelo de sarcoma 180. Os melhores resultados foram apresentados por uma fração constituída de cadeias simples de (1→6)-β-glucopiranosil (43,3%) e de proteínas (50,2%), com conteúdos elevados de alanina e leucina, e baixas concentrações de metionina, histidina e tirosina (Kawagishi et al., 1990). Posteriormente Itoh et al., (1994) demonstraram que esta mesma fração era constituída de complexos protéico-polissacarídicos, responsáveis pela ação imunoestimulante. Outros estudos indicaram que a ação imunoestimulante é devida a beta-glucanas presentes tanto na porção solúvel quanto insolúvel das preparações aquosas de *A. blazei* (Mizuno et al., 1990a, 1990b). Este mesmo grupo isolou ainda um segundo polissacarídeo, uma glucomanana de micélios de *A. blazei* cultivados em meio líquido diferente dos compostos isolados do corpo de frutificação (Mizuno et al., 1999).

De modo similar aos demais cogumelos estudados, a ação antitumoral dos produtos isolados do cogumelo *A. blazei* é atribuída a sua atividade imunoestimulante, uma vez que ação citotóxica direta não tem sido relatada. Neste sentido, Ito et al., (1997) observaram que o complexo protéico-polissacarídico isolado, denominado ATOM (antitumor organic substance Mie) não apresentou atividade citotóxica direta contra diferentes linhagens de células tumorais testadas. Assim, produtos do cogumelo *A. blazei* têm a capacidade de estimular mecanismos imunológicos como a atividade fagocítica de macrófagos (Ito et al.,

1997), atividade natural killer (Ghoneum, 1995; Ito et al., 1997) e células T citolíticas (Ebina et al., 1998) de camundongos. Há algumas décadas, vêm sendo realizados estudos sobre a atividade antitumoral de polissacarídeos, 1,6- β -glucanas, complexo protéico-glucana, α -glucana e heteroglucanas do cogumelo *A. blazei* (Ohno et al., 1986; Kawagish et al., 1989, Itoh et al., 1994, Ito et al., 1997, Fujimiya et al., 1998, Mizuno et al., 1998, Mizuno et al., 1999, Fujimiya et al., 1999, Solomon & Weis, 1999) em diferentes modelos de tumor murino. Entretanto não há relatos sobre sua eficiência no homem e são escassas as informações sobre a efetividade dos extratos aquosos, comumente consumidos pela população.

A análise de linfócitos esplênicos usando citometria de fluxo mostrou que as percentagens de células T (CD3⁺), T-auxiliares (CD4⁺) e células T citolíticas (CD8⁺) estavam aumentadas em animais tratados com uma fração extraída de *A. blazei* solúvel em água quente, comparados com animais tratados apenas com salina. Deste modo, polissacarídeos de *A. blazei* podem ser agentes profiláticos efetivos, protegendo o homem contra o câncer, pela estimulação de linfócitos (Mizuno et al., 1998). Ao contrário, Nakajima et al., (2002), não encontraram diferenças significativas nas percentagens de células CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺. Mas demonstraram que o extrato solúvel em água quente induziu aumento na produção de anticorpos, aumentou a população de células MAC-1⁺ (granulócitos, monócitos e células NK) e CD25⁺ (macrófagos, linfócitos T e B). Este extrato ainda aumentou a expressão de mRNA de IL-6 e IL-1 β , tanto em macrófagos peritoniais como em células esplênicas. Cheung et al. (2002) demonstraram que a administração oral de β -glucanas aumentou o efeito antitumoral de anticorpos monoclonais (mAb) contra tumores estabelecidos em camundongos.

Em estudos prévios de nosso grupo, não observamos efeitos significativos da administração de extrato aquoso de *A. blazei* sobre a produção de anticorpos antitumorais (dados não publicados). Também constatamos que o extrato aquoso de *A. blazei* inibiu o crescimento do tumor de Ehrlich subcutâneo e o extrato obtido à temperatura ambiente (22°C) foi mais eficiente em aumentar a sobrevivência dos animais. Entretanto, o extrato aquoso não foi capaz de aumentar a atividade linfoproliferativa e nem das células NK. Mais concordante com a literatura, o extrato hexânico de *A. blazei* foi capaz de restaurar a atividade das células NK (Santos, 1998).

Proteoglicanas ácido-solúveis (ATF) isoladas de basidiocarpos de *A. blazei*, exerceram proteção contra o desenvolvimento do fibrossarcoma Meth A, quando inoculados *in situ*. Estes autores observaram ainda que o tratamento confere proteção contra o desenvolvimento de células tumorais inoculadas subsequentemente em local distante do sítio primário (Fujimiya et al., 1998; Ebina & Fujimiya, 1998; Fujimiya et al., 1999 e Oshiman et al., 2002). Fujimiya et al., (1998) sugerem que inibição do desenvolvimento tumoral deve-se à estimulação da atividade NK, evidenciada pelo aumento de células NK1.1⁺ no infiltrado intratumoral. Os dados apresentados indicam também que o tratamento favorece a geração de células citotóxicas específicas, uma vez que apresentam atividade lítica contra células tumorais singênicas (Meth A). Além disso, observaram que o extrato ATF induz apoptose nas células tumorais *in vitro* como caracterizado pela fragmentação de DNA e expressão do marcador Apo 2.

A atividade tumoricida do ATF, pode estar especialmente presente na fração contendo (1-4)- α -D-glucana e (1-6)- β -D-glucana numa proporção de aproximadamente 1:2 (massa molecular 170 kDa) da fração final purificada (Fujimiya et al., 1998).

Posteriormente, demonstrou-se que o efeito antitumoral da administração intratumoral do extrato ATF, aumentou com a administração oral *ad libitum* desta fração em animais com duplo enxerto tumoral. A atividade de fatores quimiotáticos para macrófagos foi significativa na cultura de células tumorais do tumor não-tratado. Os autores sugerem que a regressão tumoral nos animais com duplo enxerto, foi devido a uma reação imunológica, envolvendo indução de células citolíticas no baço e liberação de fatores quimiotáticos para macrófagos no tumor distante (Ebina & Fujimiya, 1998).

Através de purificação cromatográfica e caracterização fisicoquímica, a ATF foi fracionada em alto (H-M) e baixo (L-M) peso molecular e observou-se maior atividade tumoricida da fração HM3-G (380 kDa), que consiste de mais de 90% de glicose, sendo seu principal componente (1-4)- α -D-glucana com ramificações (1-6)- β -D-glucana, numa proporção de 4:1. Esta fração não só foi capaz de exercer regressão do tumor tratado (100%) como também do tumor não tratado (80%) no sistema de duplo enxerto tumoral e os autores sugerem que a inibição do tumor não tratado, não é devida a uma ação direta e sim a uma ação sistêmica da fração (Fujimiya et al., 1998). Posteriormente foi demonstrado que uma fração de baixo peso molecular a LM-3(20 kDa), também contendo complexos α -1,4-glucana- β -1,6-glucana, exerceu atividade tumoricida mais intensa quando comparada ao controle, às frações LM-1(24 kDa), LM-2 (24kDa) e ao ATF (170 kDa) (Fujimiya et al., 1999). Neste mesmo estudo observou-se também o efeito da administração intratumoral dos extratos oxalato-solúvel (OSE) ou oxalato-solúvel ácido-tratado (ATF) e ambos demonstraram atividade similar, indicando que o tratamento ácido não afeta a atividade tumoricida das frações extraídas (Fujimiya et al., 1999). Oshiman et al., (2002)

demonstraram que a administração oral da ATF também foi eficiente em inibir o crescimento do tumor Meth A.

Assim, o presente estudo foi desenvolvido para testar a hipótese de que a ação antitumoral da ATF administrada no sítio tumoral deve-se a um estado de imunoestimulação que se reflete na alteração da atividade linfoproliferativa de esplenócitos e no perfil de citocinas produzidas por estas células.

II-Referências Bibliográficas

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 4nd ed. W B Saunders Company: Philadelphia, 2000.
- Aledo JC, Segura JA, Barbero LG, Márquez J. Early diferencial expression of two glutaminase 2000 mRNAs in mouse spleen after tumor implantation. *Cancer Lett* 1998; 133: 95-9.
- Beissert S, Bergholz M, Waase I, Lepsien G, Schauer A, Pfizenmaier K et al. Regulation of tumor necrosis factor gene expression in colorectal adenocarcinoma: in vivo analysis by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5064-68.
- Balch CM, Riley LB, Bae YJ. Patterns of human tumor-infiltrating lymphocytes in 120 human cancer. *Arch Surg* 1990; 125: 200-205.
- Bergami PC, Mariano M, Barbuto J A. Inflammation and resistance to Ehrlich ascites tumor. *Anais. XI Reunião Annual da FESBE, Caxambú, MG, 1996.*
- Cai G, Kastelein RA, Hunter CA. IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN-gamma when combined with IL-18. *Euro J Immunol* 1999; 29: 2658-65.
- Carry PJ, Prescott DM, Ogilvie GK. Resistance to Ehrlich ascites tumor in a strain of dystrophic mice. *Cancer Res* 1979; 39: 2130-40.
- Cheung NV, Modak S, Vickers A, Knuckles B. Orally administred β -glucans enhanced anti-tumor effects of monoclonal antibodies. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 51: 557-64.

- Coley WB. Treatment of inoperable malignant tumors with the toxin of erysipelas and the *Bacillus prodigiosus*. Trans Am Surg Assoc 1894; 12: 183-212.
- Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins Pathologic basis of diseases. 6nd ed. WB Saunders Company: Philadelphia, 2000.
- Ebina T, Fujimiya Y. Antitumor effect of a peptide-glucan preparation extracted from *Agaricus blazei* in a double-grafted tumor system in mice. Biotherapy 1998; 11(4): 259-65.
- Elxepuru A, Martin-Nieto J, Jimenez A, Gómez C, Villalobo A. Ehrlich ascites tumor cells produce a transforming growth factor-beta (TGF beta)-like activity but lack receptors with TGF beta-binding capacity. Moll Cell Biochem 1997; 170: 871-74.
- Ernest E, Cassileth BR. How useful are unconventional cancer treatments? Eur J Cancer 1999; 35:1608-13.
- Ehrlich P, Apolant H. Beobachtungen uber maligne mausetumoren. Berl Klin Wsch 1905; 28: 871-74.
- Fecchio D. Inflamação e tumor de Ehrlich: Efeitos da modulação da resposta inflamatória sobre o crescimento tumoral. [tese]. Botucatu: Instituto de Ciências biológicas da Universidade de São Paulo; 1989.
- Fecchio D, Sirois P, Russo M, Jancar S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. Inflammation 1990; 14: 125-32.
- Fujimiya Y, Suzuki Y, Oshiman K, Kozori H, Moriguchi K, Nakashima H et al. Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis. Cancer Immunol Immunother 1998; 46: 147-59.

- Fujimiya Y, Suzuki Y, Katakura R & Ebina T. Tumor-specific cytotoxic and immunopotentiating effects of relatively low molecular weight products derived from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill. *Anticancer Res* 1999; 19: 113-8.
- Gentile LB. Modulação por PGE2 no perfil de subpopulações celulares e de citocinas na evolução do tumor ascítico de Ehrlich (TAE). [Dissertação]. Botucatu. Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista; 2001.
- Ghoneum M. Royal *Agaricus* mushroom enhances murine natural killer cell activity *in vivo*. 9th International Congress of Immunology, 1995; San Francisco, California, USA. Abstract book, resumo nº 2890.
- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. *Kuby Immunology*. 4th ed, W H Freeman and Company: New York-USA, 2000.
- Goedegebuure PS, Douville CC, Doherty JM, Linehan DC, Lee KY, Ganguly EK, Eberlein TJ. Simultaneous production of T helper-1-like cytokines and cytotoxic activity by tumor-specific T cells in ovarian and breast cancer. *Cell Immunol* 1997; 175: 150-6.
- Gollob JA, Mier JW, Veenstra K, McDermott DF, Clancy D, Clancy M et al.. Phase I trial of twice-weekly intravenous interleukin 12 in patients with metastatic renal cell cancer or malignant melanoma: ability to maintain IFN-gamma induction is associated with clinical response. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1678-92.
- Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8⁺ T cells. *J Immunol* 1998; 178: 3188-93.
- Han SB, Lee CW., Jeon YJ, Hong ND, Yoo ID, Yang K et al. The inhibitory effect of polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* on tumor factor growth and metastasis. *Immunopharmacol* 1999; 41: 157-64.

- Harris CC. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res* 1991; 51: 5023-44.
- Heaton K, Grimm EA. Cytokine combinations in immunotherapy for solid tumors: a review. *Cancer Immunol Immunother* 1993; 37: 213-19.
- Hom SS, Schwartzenuber DJ, Rosenberg SA, Topalian SL. Specific release of cytokines by lymphocytes infiltrating human melanomas in response to shared melanoma antigens. *J Immunother* 1993; 13: 18-30.
- Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. São Paulo, 2003. Disponível: <http://www.inca.org.br>.
- Ito N, Nakamura H, Tanaka Y, Ohgi S. Lung carcinoma: analysis of T helper type 1 and 2 cells and T cytotoxic type 1 and 2 cells by intracellular cytokine detection flow cytometry. *Cancer* 1999; 85: 2359-67.
- Ito H, Shimura K, Itoh H, Kawade M. Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (IWADE Strain 101) "Himematsutake" and its mechanism in tumor-bearing mice. *Anticancer Res* 1997; 17: 277-84.
- Itoh H, Ito H, Amano H, Noda H. Inhibitory action of a (1→6)-beta-D-glucan-protein complex (FIII-2b) isolated from *Agaricus blazei* Murill ("Himematsutake") on Meth A fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor mechanism. *Jpn J Pharmacol* 1994; 66: 265-71.
- Kawagishi H, Inagaki R, Kanao T, Mizuno T, Shimura K, Ito H et al.. Fractionation and antitumor activity of water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydr Res* 1989; 186: 267-73.

- Kawagishi H, Kanao T, Inagaki R, Mizuno T, Shimura K, Ito H et al. Formolysis of a potent antitumor $(1\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-glucan-protein}$ complex from *Agaricus blazei* Murill fruiting bodies and antitumor activity of resulting products. *Carbohydr Polymers* 1990; 12: 393-403.
- Kanayama H, Izumi A, Osaki Y, Hamazoe R, Karino T, Shimizu N et al. Effect regional or distant lymph node removal and splenectomy on immunologic responses in Ehrlich tumor-bearing mice. *Jpn J Surg* 1982; 12: 381-6.
- Kidd PM. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. *Altern Med Rev* 2000; 5: 4-27.
- Kim HM, Han SB, Oh GT, Kim YH, Hong DH, Hong ND et al. Stimulating of humoral and cell mediated immunity by polisaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Int J Immunopharmacol* 1996; 18: 295-303.
- Kobayashi M, Fitz L, Ryan M. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF) a cytokine with multiple biological effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 1989; 170: 827- 45.
- Kruges-Krasagakes S, Krasagakis K, Garbe C, Schmitt E, Huls C, Blankenstein T et al. Expression of interleukin 10 in human melanoma. *Br J Cancer* 1994; 70: 1182-5.
- Kumagai H, Masuda T, Sakashita M, Ishizuda M, Takcuchi T. Modulation of macrophage activity in tumor bearing mice by cytogenin *J Antibiot* 1995; 48: 321-35.
- Lelievre E, Sarrouilhe D, Morel F, Preud_Homme JL, Wijdenes J, Lecron JC. Preincubation of human resting T cell clones with interleukin 10 strongly enhances their ability to produce cytokines after stimulation. *Cytokine* 1998; 10: 831-40.

- Leung MYK, Fung KP, Choy YM. The isolation and characterization of an immunomodulatory and anti-tumor polysaccharide preparation from *Flammulina velutipes*. Immunopharmacol 1997; 35: 255-63.
- Liles WC, Van Voorhis WC. Review: Nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response. J Infect Dis 1995; 172: 1061-75.
- Liu M, Kong F, Gao Y. Induction of immunomodulating cytokine by a new polysaccharide-peptide complex from culture mycelia of *Lentinus edodes*. Immunopharmacol 1998; 40:187-98.
- Liu F, Ooi VCE, Fung MC. Analysis of immuno modulating cytokine mRNAs in the mouse induced by mushroom polysaccharides. Life Sciences 1999; 64: 1005-11.
- Loeb KR, Loeb LA. Significance of multiple mutations in cancer. Carcinogenesis 2000; 21: 379-85.
- Lowes MA, Bishop GA, Grotty K, Barnetson RS, Halliday GM. T helper 1 cytokine mRNA is increased in spontaneously regressing primary melanomas. J Invest Dermatol 1997; 108: 914-9.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265.
- Masihi KN, Madja K, Hintelmann H, Gast G, Kaneko Y. Down-regulation of tumor necrosis factor- α , moderate reduction of interleukin-1 β , but not interleukin-6 or interleukin-10, by glucan immunomodulators curdlan sulfate and lentinan. Int J Immunopharmacol 1997; 19: 463-68.

- Mizuno T, Hagiwara T, Nakamura T, Ito H, Shimura K, Sumiya T et al. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from Himematisutake, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agricult Biol Chem* 1990a; 54: 2889-9286.
- Mizuno T, Tinagaki R, Kanao T. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from Himematisutake, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agric Biol Chem* 1990b; 54: 2897-2905.
- Mizuno M, Morimoto M, Minato K, Ito H, Tsuchida H. Polysaccharide from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte Tcell subsets in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998; 62(3): 434-37.
- Mizuno M, Minato K, Ito H, Kawade M, Terai H & Tsuchida H. Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* Murill. *Biochem and Mol Biol Internat* 1999; 47: 707-14.
- Mocelin S, Wang E, Marincola FM. Review: Cytokines and immune response in the tumor microenvironment. *J. Immunotherapy* 2001; 24(5): 392-407.
- Mossman TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17: 138-46.
- Nasha MA, Lenzi R, Edwards CL, Kayanagh JJ, Kudelka AP, Verschraegen CF et al. Differential expression of cytokine transcripts in human epithelial ovarian carcinoma by solid tumor specimens, peritoneal exudate cells containing tumor, tumor-infiltrating lymphocyte (TIL)-derived T cell lines and established tumor cell lines. *Clin Exp Immunol* 1998; 112:172-80.
- Nakagomi H, Pisa P, Pisa EK, Yamamoto Y, Halapi E, Balcklin K et al.. Lack of interleukin-2 (IL-2) expression and selective expression of IL-10 mRNA in human renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 1995; 63: 366-71.

- Nakajima A, Ishida T, Koga M, Takeuchi T, Mazda O, Takeuchi M. Effect of hot water extracted from *Agaricus blazei* murril on antibody-producing cells in mice. *Inter Immunopharmacol* 2002; 2:1205-11.
- Ohno N, Furukawa M, Miura NN, Adachi Y, Motoi M, Yadomae T. Antitumor β -glucan the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. *Biol Pharm Bull* 2001; 24 (7): 820-28.
- Oshiman K, Fujimiya Y, Ebina T, Suzuki I, Noji M. Orally administered β -1,6-D-polyglucose extracted from *Agaricus blazei* results in tumor regression in tumor-bearing mice. *Planta Med* 2002; 68: 610-14.
- Ossendorp F, Toes REM, Offringa R, Van der Burg SH, Melief CJM. Importance of CD4⁺ T cell responses in tumor immunity. *Immunol Lett* 2000; 74: 75-9.
- Parhar RS, Lala PK. Changes in the host natural killer cell population in mice during tumor development. 2. The mechanism of suppression of NK activity. *Cell Immunol* 1985; 93: 265-79.
- Parhar RS, Lala PK. Prostaglandin E2-mediated inactivation of various killer lineage cells by tumor-bearing host macrophages. *Leukocyte Biol* 1988; 44: 474-84.
- Parmiani G, Colombo M P, Melani C. Immunotherapy, gene therapy, cytokines and cancer. In: Theze J. *The cytokine Network and Immune Functions*. New York: Oxford University Press, 1999. p.346-61.
- Pisa P, Halapi E, Pisa EK, Gerdin E, Hising C, Bucht A et al. Selective expression of interleukin 10, interferon gamma, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in ovarian cancer biopsies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7708-12.
- Poehlein C, Yamada J, Hu HM., Vetto JT, Urba WJ, Fox BA. Effectors T cells from perforin/IFN- γ double Knockout mice mediate tumor regression in vivo by adoptive

- immunotherapy. Society of Surgical Oncology. 54th Annual Cancer Symposium. Washington, DC, 2001. p. 65
- Romagnoni S. Role of TH1 and TH2 cells against tumours. In: The TH1/TH2 paradigm in disease. Berlin: Springer; 1996. p. 159-60.
- Santos S A. Efeito de extratos de *Agaricus blazei* sobre a atividade de células natural killer (NK) e o estado funcional de macrófagos peritoniais de camundongos portadores do tumor de Ehrlich na forma subcutânea. [Monografia]. Botucatu: Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista; 1998.
- Sato T. Active specific immunotherapy with hapten-modified autologous melanoma cell vaccine. *Cancer Immunol Immunother* 1996; 43: 174-9.
- Schreider H. Tumor immunology. 4nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997.
- Schreider H, Rowley DA. Inflammation and Cancer. In: Gallin JI, Syndeman R, editors. Inflammation: basics principles and clinical correlates. Philadelphia; 1999. p.1117-29.
- She QB, Ng TB, Liu WK. A novel lectin with potent immunomodulatory activity isolated from both fruiting bodies and cultured mycelia of the edible mushroom *Volvariella volvacea*. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247: 106-11.
- Segura JA, Barbero LG, Márquez J. Early tumor effect on splenic Th lymphocytes in mice. *FEBS Lett* 1997; 414: 1-6.
- Segura JA, Barbero LG, Márquez J. Ehrlich ascites tumor unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. *Immuno Lett* 2000; 74: 111-15.
- Seung, LP, Rowley DA & Schreider H. Cytokines in cancer. In: Theze J, The cytokine Network and Immune Functions. New York: Oxford University Press; 1999. p. 335-45.

- Sigiura K. Tumor transplantation. In: Gray W I. Methods of animal experimentation. Acad Press NY: London; 1965. p.171-222.
- Solomon PW, Weis AL. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: A modern perspective. *Critical Reviews Immunology* 1999; 19: 65-96.
- Stites DP, Terr AI, Parslow TG. *Imunologia Médica*. 9nd ed. Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro, 2000.
- Subiza JL, Vinuela JE, Rodriguez R, Gil J, Figueredo MA, De La Concha EG. Development of splenic natural suppressor (NS) cells in Ehrlich tumor-bearing mice. *Int J Cancer* 1989; 44: 307-14.
- Thomas GR, Chen Z, Enamorado I, Bancroft C, Van Waes C. IL-12 e IL-2-induced tumor regression in a new murine model of oral squamous-cell carcinoma is promoted by expression of the CD80 co-stimulatory molecule and interferon-gamma *Int J Cancer* 2000; 86: 368-74.
- Tracey KJ. Tumor necrosis factor-alpha. In: Thomson A, editors. *The cytokine handbook*. San Diego: Academic Press; 1994. p.289-304.
- Tetsuhiro T, Atsuhito Y, Koichi H, Torigoe T, Araya J, Watanabe N et al. Interleukin-10 natural killer (NK) sensitivity of tumor cells by downregulating NK target structure expression. *Cellular Immunol* 1999; 198: 103-10.
- Vicent EC, Ooi VEC, Liu F. A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides. *Int J Med Mushr* 1999; 1:195-206.
- Venetsanakos E, Beckman I, Bradley J, Skinner JM. High incidence of interleukin 10 mRNA but not interleukin 2 mRNA detected in human breast tumours. *Br J Cancer* 1995; 63: 366-71.

- Zhang Q-H, Lin ZB. The antitumor activity of *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. (Ling Zhi) (Aphyllophoromycetidae) polysaccharides is related to tumor necrosis factor- α and interferon- γ . *Int J Med Mushr* 1999; 1: 207-15.
- Wang HX, Ng TB, Ooi VE, Liu WK, Chang ST. A polysaccharide-peptide complex from cultured mycelia of the mushroom *Tricoloma mongolium* with immunoenhancing and antitumor activities. *Biochem Cell Biol* 1996a; 74: 95-100.
- Wang HX, Ng TB, Ooi VE, Liu WK, Chang ST. A polysaccharide-peptide complex from the cultured mycelia of the mushroom *Coriolus versicolor* and their culture medium activate mouse lymphocytes and macrophages. *Int Biochem Cell Biol* 1996b; 28: 601-7.
- Wang Y, Chen H, Wu M, Bao J, Cong W, Wang H. Postoperative immunotherapy for patients with hepatocarcinoma using tumor-infiltrating lymphocytes. *Chin Med J* 1997; 110: 114-7.
- Walos S, Szary J, Szala S. Inhibition of tumor growth by interleukin 10 gene transfer in B16 (F10) melanoma cells. *Acta Biochim Pol* 1999; 46: 967-70.
- Weinberg, RA. How cancer arise. *Scientific American* 1996; 32-40.
- Whintrout RH, Varesio L. Activation of macrophages for cytotoxic and suppressor-effector functions. In: Oppenheim J. *J Immunophysiology: The role of cells and cytokines in Immunity and inflammation*. Oxford University Press. 1991. p. 365-85.
- Wong DA, Bishop GA, Lowes MA, Cooke b, Barnetson RS, Halliday GM. Cytokine profiles in spontaneously regressing basal cell carcinomas. *Br J Dermatol* 1997; 143: 91-8.
- Wojtowicz-Praga S. Reversal of tumor-induced immunosuppression: a new approach to cancer therapy. *J immunother* 1997; 20: 165-77.

Yue FY, Dummer R, Geertsen R, Hofbauer G, Laine E, Manolio S et al. Interleukin 10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. *Int J Cancer* 1997; 71: 630-7.

III-Manuscrito

Ação da fração polissacáridica de *Agaricus blazei* sobre o desenvolvimento tumoral, a atividade linfoproliferativa e a produção de citocinas por esplenócitos de camundongos com tumor subcutâneo de Ehrlich.

Andréa Vanessa Ferreira Belik^a, Augusto Ferreira da Eira^b, Edson Rodrigues Filho^c, Ana Paula Terezan^c, Ramon Kaneno^{a*}

^aDepartamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil

^bDepartamento de Produção Vegetal (Módulo de Cogumelos), Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil

^c Departamento de Química- Laboratório de Produtos Naturais, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), São Carlos, SP, Brasil

* A quem a correspondência deve ser enviada

Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências

UNESP Cx Postal 510, CEP 18618-000, Botucatu, SP, Brasil

Fone: *55-14-3811-6058/ FAX: *55 –14-3815-3744

e-mail: kaneno@ibb.unesp.br

Resumo

A ATF é uma fração polissacarídica extraída do cogumelo *Agaricus blazei*, rica em (1→6)-β-D-glucana, à qual se atribui ação imunoestimulante. No presente trabalho avaliamos os efeitos antitumoral e imunomodulador da ATF em camundongos BALB/c com tumor subcutâneo de Ehrlich. O tratamento consistiu de 3 aplicações de ATF (0,5ug/0,1ml) no sítio de implantação tumoral (Ehr/ATF), enquanto os animais do grupo Ehr foram tratados do mesmo modo com solução salina estéril. No período de 7 ou 14 dias após a implantação do tumor, os animais foram sacrificados para a avaliação do peso tumoral, análise histopatológica, avaliação da atividade proliferativa de esplenócitos e produção de citocinas *in vitro*. O tratamento foi capaz de inibir o crescimento do tumor em relação ao grupo Ehr e a análise histopatológica indica diferenças entre os 2 grupos em relação à presença de células gigantes, frequência de figuras mitóticas e de células apoptóticas. Em relação aos parâmetros imunológicos, observamos que os animais tratados com ATF (grupos Ehr/ATF e ATF) apresentaram menor atividade linfoproliferativa que o grupo controle e essa supressão foi observada também nos animais com tumor tratados com solução salina (Ehr). A capacidade de produção de IL-10 mostrou-se aumentada no grupo Ehr, fenômeno parcialmente revertido pela administração de ATF. Não se observou, entretanto, efeito sobre a produção de IFN-γ ou de TNF-α. Avaliações *in vitro* indicam que a ATF não apresenta atividade citotóxica direta sobre esplenócitos de animais normais e nem sobre as células tumorais, embora apresente atividade anti-proliferativa quando em concentração elevada (25 ug). Assim, nossos resultados sugerem que a ação antitumoral da fração ATF não se reflete em imunoestimulação das células do baço, entretanto podemos

supor que o tratamento promova migração de células imunocompetentes deste órgão para o sítio de implantação tumoral.

Palavras-chave: *Agaricus blazei*; β -glucana; cogumelos medicinais; tumor de Ehrlich; IL-10; imunidade antitumoral

1. Introdução

O crescente aumento na incidência e mortalidade por câncer, tem estimulado a busca de métodos terapêuticos em várias direções e alguns grupos têm procurado, nos produtos naturais, substâncias capazes de atuar no tratamento da enfermidade. Entre os produtos mais explorados estão os cogumelos comestíveis [1,2], cujos complexos polissacarídicos têm como suas mais promissoras atividades, os efeitos antitumoral e imunomodulatório [3-10]. Complexos polissacarídicos extraídos do cogumelo *Agaricus blazei*, também têm sido avaliados quanto à sua atividade antitumoral, mas ainda são controversos os dados sobre seu papel imunomodulatório. Alguns autores têm demonstrado que componentes extraídos do cogumelo *A. blazei*, como os complexos polissacarídicos, possuem capacidade de estimular mecanismos de defesa como a atividade fagocítica de macrófagos [5], atividade “natural killer” [5,10] e células T citotóxicas [11]. Nas investigações iniciais sobre as propriedades do cogumelo *A. blazei*, Kawagishi et al. [3-4] demonstraram que uma fração constituída de cadeias simples de (1→6)- β -glucana apresentou atividade antitumoral no modelo de sarcoma 180.

Proteoglicanas oxalato solúveis submetidas a tratamento ácido (ATF), isoladas de basidiocarpos de *A. blazei*, exercem proteção contra o desenvolvimento do fibrossarcoma

Meth-A, quando inoculados *in situ* [9-11]. Fujimiya et al. [9] observaram que este tratamento impede também o desenvolvimento de células tumorais inoculadas subsequentemente em local distante do sítio primário. A análise por ressonância magnética nuclear (NMR) demonstrou que a fração ATF consiste principalmente de (1,6)- β -D-glucana [12]. A hidrólise da fração oxalato solúvel com ácido clorídrico não afeta a eficiência do produto, sugerindo a possibilidade de seu uso por via oral, uma vez que resistiria à ação do suco gástrico [12]. Embora tenha sido observado que diferentes preparações derivadas de *A. blazei* sejam capazes de estimular a resposta imune celular, não existem relatos a respeito de seu efeito sobre a atividade linfoproliferativa e pouco se sabe sobre os efeitos deste cogumelo sobre a produção de citocinas.

Alterações nos níveis de citocinas têm sido relatadas em estudos experimentais e clínicos de câncer, tanto *in vivo* como *in vitro* [13,14]. Em relação à resposta antitumoral, observa-se que dependendo do tipo de célula, tanto as citocinas produzidas por Th1 quanto por Th2 podem ser importantes no estabelecimento da resistência [15,16]. O interferon-gama (IFN- γ) é produzido predominantemente por linfócitos Th1, células NKT, células NK e tem papel importante em prevenir o desenvolvimento de tumores primários transplantáveis [17]. Das várias propriedades biológicas do IFN- γ , a atividade antiproliferativa direta, a capacidade de ativação de macrófagos e sua propriedade anti-angiogênica, são as atividades antitumorais mais relevantes [18]. O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) produzido por macrófagos, é o principal mediador da inflamação, participa da ativação celular, do aumento da função de células NK e em casos de neoplasias, pode apresentar citotoxicidade para células tumorais [19]. Por outro lado, o TNF- α pode atuar como promotor tumoral endógeno, contribuindo para o desenvolvimento do

estroma necessário para o crescimento tumoral e metástases [15,20,21]. Citocinas anti-inflamatórias como a interleucina-10 (IL-10), embora possam diminuir o crescimento de alguns tumores, podem atuar como fatores supressores da resposta imunológica e favorecer o crescimento tumoral em determinadas situações [14,15] e em geral constituem mecanismos de escape das células tumorais.

Assim o propósito deste estudo foi verificar se a fração ATF quando administrada no sítio de implantação do tumor de Ehrlich (subcutâneo), atua sobre células mononucleares do baço, interferindo em sua capacidade linfoproliferativa e na sua capacidade de produção das citocinas IL-10, TNF- α e IFN- γ , como forma de melhor compreender a participação dessas células e citocinas na resposta antitumoral.

2. Material e métodos

2.1. Animais

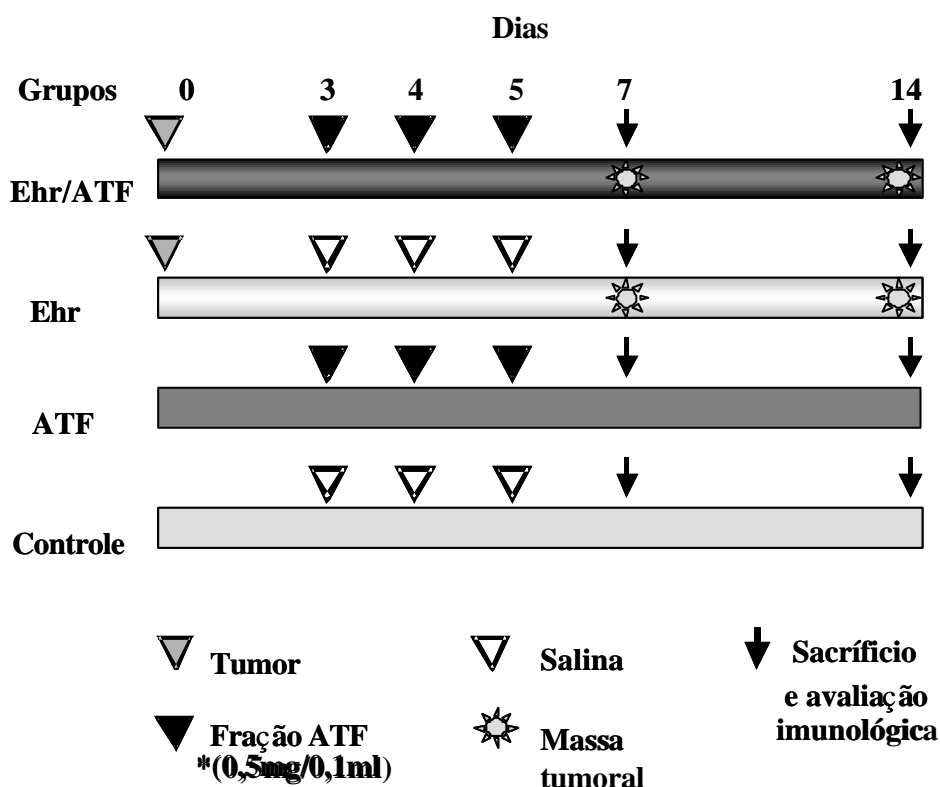
O experimento foi desenvolvido utilizando-se camundongos machos da linhagem isogênica BALB/c com 45 dias de idade. Os animais foram provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP/SP e foram mantidos no Biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia-IBB, sob temperatura constante de 22^o C, ciclo claro/escuro 12/12h e exaustão de ar durante todo o experimento. Água e ração convencional foram fornecidos *ad libitum*. Todos os procedimentos envolvendo os animais seguiram os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal-IBB (prot. 46/00).

2.2. Tumor de Ehrlich

Células do tumor de Ehrlich, gentilmente cedidas pela Dra. Denise Fecchio do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, foram colhidas após sucessivas e periódicas passagens intraperitoneais em camundongos suíços. A viabilidade das células tumorais foi determinada através do teste de exclusão do azul trypan, e a concentração foi ajustada para 2×10^7 células/ml, seguindo-se inoculação subcutânea de 0,1ml (2×10^6 células/animal) da suspensão.

2.3. Delineamento experimental

Animais de mesma idade e peso similares foram divididos em 4 grupos com 10 animais cada e tratados como descrito abaixo.



*A quantidade de ATF utilizada foi previamente determinada através da inoculação de 0,5, 1 ou 2,5 mg da fração no sítio tumoral. O efeito do tratamento foi acompanhado através da medida do diâmetro da área ocupada pelo tumor, estabelecendo-se 0,5 mg como a quantidade mais adequada.

2.4. Preparação da fração ácido-tratada solúvel de *A. blazei* (ATF)

A mistura das linhagens ABL 99/25, 99/28, 99/29 e 00/30 do cogumelo *Agaricus blazei* seco e pulverizado, foi fornecido pelo Prof. Dr. Augusto Ferreira da Eira, responsável pelo Módulo de Cogumelos do Depto. de Produção Vegetal da FCA - UNESP - Botucatu.

Cerca de 800 g do cogumelo *Agaricus blazei*, foram submetidos à extração por três vezes com 6,4 litros de etanol 80% em ponto de fervura por 15 horas. O resíduo insolúvel foi separado por centrifugação a 5000xg por 10 minutos e extraído por três vezes com 5 litros de água destilada em ponto de fervura por 15 horas. O resíduo insolúvel foi novamente separado por centrifugação a 5000xg por 10 minutos e submetido à extração em 5 litros de oxalato de amônio 5% em ponto de fervura por 10 horas (extração repetida 2 vezes). O extrato solúvel em oxalato de amônio foi filtrado, dializado e liofilizado. O produto foi dializado por cerca de 72 horas e a redução dos níveis de amônia foi acompanhado pelo teste com reativo de Nesler.

O material foi então tratado com HCl 1 M, por 24 horas à temperatura ambiente. O pH foi ajustado para 7,0 por adição de NaOH 1 M e o material particulado foi então removido por centrifugação. O sobrenadante foi esterilizado por filtração (membrana Millipore 0.22µm) e liofilizado [9]. Após o tratamento ácido, observou-se que cada ml do

produto continha 27,64 mg de matéria seca da fração ATF. Para o tratamento dos animais a fração foi reconstituído com solução salina à concentração de 5mg/ml.

2.5. Caracterização química/bioquímica da ATF

A ressonância magnética nuclear (NMR) uni e bidirecional para a caracterização de ^1H e ^{13}C , foi utilizada para análise de compostos existentes na fração ATF [22]. A concentração de proteínas do ATF foi determinada pelo método de Lowry usando albumina bovina purificada como solução padrão [23]. A presença residual de oxalato de amônio foi avaliada através do método de descoloramento do permanganato de potássio. Brevemente, a amostra da ATF de 0,5 mg/ml foi aquecida em banho-maria por cerca de 1 minuto e em seguida foram adicionados 500 μl de permanganato de potássio 0,1N. A amostra foi comparada a soluções-padrão de oxalato (4, 2, 1, 0,5, 0,25 e 0,125%) preparadas em um volume total de 2ml com mais 300 μl de HCl 1N (pH 3-4) [24].

2.6. Análise histopatológica

Para a análise histopatológica, foi utilizado um grupo controle (C-Ehr) constituído de animais com o tumor subcutâneo sem qualquer tratamento, com o objetivo de verificar se a introdução da agulha no local do tumor interfere na resposta inflamatória.

Após o sacrifício a massa tumoral foi removida, pesada em balança analítica e armazenada em frascos devidamente identificados, contendo formol 10% (pH = 7,0). Posteriormente, foram processadas e coradas com hematoxilina e eosina (HE) na rotina laboratorial do Núcleo de Avaliação Toxicogenética e Cancerígena-Toxican, Departamento de Patologia - FMB-UNESP para análise histológica das lesões. As massas tumorais foram

avaliadas quanto à presença de áreas de necrose, figuras mitóticas, células em apoptose, células gigantes neoplásicas e infiltrado celular (mononuclear e polimorfonuclear) por análise semi-quantitativa, sendo os critérios graduados em 3 grupos: (+) pouco, (++) moderado e (+++) intenso, levando-se em consideração a comparação entre os grupos.

2.7. Cultura de esplenócitos

Para avaliação da atividade linfoproliferativa, esplenócitos dos animais estudados foram obtidos por maceração do baço sobre peneira de náilon, em placa de Petri. A suspensão de células foi submetida a duas centrifugações e, em seguida, ressuspendida em meio de cultura RPMI 1640 completo (suplementado com 10% de soro bovino fetal e 2mM de L-glutamina), ajustadas para 4×10^6 células/ml e distribuídas em volumes de 100µl/poço, em microplaca de cultivo celular (96 alvéolos) de fundo chato. As células de cada animal foram cultivadas em triplicata, com Concanavalina A (Con A) à concentração final de 3,5µg/ml ou sem estímulo (controle). As culturas foram incubadas a 37°C em estufa sob tensão constante a 5% de CO₂, por 72 horas. Vinte horas antes do término da incubação foi adicionado 1µCi de ³H-metil timidina (6,7µCi/mol), em cada alvéolo. Após coleta, as culturas foram analisadas, com o auxílio de um contador de cintilação beta (Beckman, 1900TR - Liquid Scintillation Analyzer) e os resultados foram expressos em índice de estimulação, calculados através da fórmula:

$$\text{Índice de estimulação} = \text{cpm}_{\text{Con A}} : \text{cpm}_{\text{controle}}$$

Onde cpm = contagens por minuto

2.8. Atividade *in vitro* da fração ATF

Foram adicionadas aos alvéolos de cultura de esplenócitos normais (8×10^6 cel/50 μ l), 3,5 μ g/100 μ l de Con A e 50 μ l da fração ATF (concentrações finais por alvéolos: 25; 12,5; 6,25; 3,12 μ g/ml) para se verificar seu efeito direto sobre a atividade linfoproliferativa, realizada como descrito no ítem 2.7.

2.9. Atividade citotóxica direta da ATF sobre células do tumor de Ehrlich

Células do tumor de Ehrlich obtidas de um camundongo suíço com tumor ascítico ou células esplênicas de camundongos BALB/c normais, foram distribuídas em microplacas de cultivo celular de 96 alvéolos (2×10^5 células/100 μ l) e adicionado 20 μ l fração ATF (concentrações finais por alvéolos: 100; 20; 10; 5 μ g/ml). A viabilidade das células foi avaliada através do teste de exclusão do azul trypan no decorrer do período de 24 horas após incubação à 37°C sob tensão constante de 5% de CO₂.

2.10. Geração de sobrenadantes para dosagem de citocinas

Para a geração de sobrenadantes, esplenócitos dos animais estudados foram ajustadas para 4×10^6 células/ml, em meio RPMI completo, distribuídas em macroplaca de cultivo celular de 24 alvéolos. As culturas celulares foram estimuladas com Con A (3,5 μ g/alvéolos) para geração de IL-10 e IFN- γ , ou com suspensão de *S. aureus* formolizada (1:5000) para geração de TNF- α , por períodos de 24 ou 48 horas, respectivamente. Os sobrenadantes das culturas foram aliquoteados e armazenados em ultrafreezer à -80° C para posterior dosagem das citocinas.

2.11. Determinação de IL-10, TNF- α e INF- γ por ELISA

A determinação de citocinas no sobrenadante de células esplênicas foi efetuada por técnica de ELISA para todos os grupos descritos acima. Brevemente, 100 μ l de anticorpo monoclonais anti-IL-10, anti-TNF- α ou anti-INF- γ murino foram incubados em microplaca de 96 alvéolos de fundo chato (NUNC MAXISORP), por cerca de 18 horas em câmara úmida à temperatura ambiente. Após o período de sensibilização, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-tween 0,05% e recobertas com cerca de 300 μ l de tampão de bloqueio (BSA 1% e sacarose 5% em PBS com 0,05% de NaN₃), por um período de 1 hora à temperatura ambiente. Após nova lavagem (3 vezes), foram adicionadas as amostras do sobrenadante ou de citocinas recombinantes (em concentrações variadas para a obtenção de curva-padrão). Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente, a placa foi novamente lavada, adicionando-se 100 μ l de anticorpo biotilado anti-citocina, seguindo-se 2 horas de incubação à temperatura ambiente. Após nova lavagem, foi adicionada solução de streptoavidina-peroxidase, incubada por 50 minutos. Após lavagem, foram adicionados 100 μ l do tampão revelador, contendo 5 mg de OPD e 5 μ l de H₂O₂ em 12,5 ml de tampão citrato-fosfato. A reação foi bloqueada com H₂SO₄ após 30-40 minutos de incubação à temperatura ambiente em local escuro, seguindo-se leitura da reação em espectrofotômetro com filtro de 492 nm. Os dados da curva-padrão foram submetidos à análise de regressão linear e os resultados das amostras convertidos em pg/ml.

2.12. Análise estatística

Os dados da atividade linfoproliferativa, da atividade citotóxica direta e das citocinas foram analisados pelo teste de Análise de Variância (ANOVA), cujas estatísticas

foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. A massa tumoral foi analisada pelo teste “t” de Student, cujas estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Caracterização química/bioquímica da ATF

Através da análise de NMR ^1H e ^{13}C uni e bidimensional constatou-se a presença da (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana. No espectro de NMR ^1H da ATF observou-se sinais dos hidrogênios carbinólicos na região de δ 3,29-4,20 e sinal do hidrogênio β anomérico e δ 4,49. No espectro de NMR ^{13}C (Fig.1a) observou-se sinais para os carbonos carbinólicos na região de δ 69,16, 69,80, 73,39, 75,24, 75,91 e 103,36. As correlações ^1H - ^{13}C e ^1H - ^1H e as multiplicidades foram definidas por experimentos de HMQC (Fig.1b) e COSY ^1H - ^1H (Fig.1c).

A determinação de proteínas totais indicou a ocorrência de 3,7192 mg/ml o que corresponde à aproximadamente 13,4%, sendo o restante representado por açúcares. A análise semi-quantitativa de oxalato presente na amostra indica que a ATF apresentava uma concentração residual de apenas 0,025% do sal.

3.2. Desenvolvimento do tumor de Ehrlich e análise histopatológica

Como ilustrado nas figuras 2a e 2b, o peso dos tumores removidos dos animais dos grupos Ehr/ATF foi significativamente menor ($p < 0,05$) que o grupo controle (Ehr) tanto no 7^o quanto no 14^o dia.

A comparação dos achados histopatológicos nas amostras dos grupos controle C/Ehr e Ehr, indica que a agressão feita pela introdução da agulha no sítio tumoral não modificou os parâmetros avaliados. Ambos os grupos, no 7º dia, apresentaram infiltrado celular intenso (+++) com predomínio de células mononucleares, intensas áreas de necrose (+++), poucas figuras mitóticas (+), poucas células em apoptose (+) e poucas células gigantes neoplásicas (+) (Tabela 1). No 14º dia, embora as características das lesões tenham sido semelhantes às observadas no 7º dia, tanto o infiltrado celular, observou-se maior frequência de presença de figuras mitóticas (++ a +++). Chama a atenção a ausência de apoptose e presença de poucas a moderadas células gigantes neoplásicas (+ a ++) (Fig.3 a,b,c,d).

Em relação ao grupo Ehr/ATF observou-se que no 7º dia, há infiltrado celular moderado (++) com predomínio de células mononucleares, moderadas áreas de necrose (++) com poucas figuras mitóticas (+), presença moderada de apoptose (++) e ausência de células gigantes neoplásicas. No 14º dia, embora as características das lesões tenham sido semelhantes às observadas no 7º dia, tanto o infiltrado celular como as áreas de necrose foram intensas (+++), com ausência de apoptose (Fig.3 a,b, e).

3.3. Cultura de esplenócitos

Os resultados apresentados nas figuras 4a e 4b, indicam que no 7º dia de experimento, os grupos Ehr, Ehr/ATF e ATF apresentaram atividade linfoproliferativa significativamente menor ($p < 0,01$) que o grupo controle (Fig.4a). No 14º dia de experimento, os grupos Ehr/ATF e ATF apresentaram atividade linfoproliferativa significativamente menor que o grupo controle ($p < 0,01$) e o grupo Ehr ($p < 0,05$) (Fig.4b).

3.4. Atividade *in vitro* da fração ATF

Para avaliar se esta fração interfere diretamente sobre a atividade linfoproliferativa, a ATF nas concentrações finais de 25; 12,5; 6,25; 3,12 $\mu\text{g/ml}$ foi adicionada aos poços de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c normais. Apesar de não haver diferença significativa entre os grupos, a cultura de linfócitos com a ATF apresentou atividade linfoproliferativa um pouco maior se comparado ao crescimento basal (Fig.5a). A adição de ATF às culturas estimuladas com Con A, mostra que na concentração de 25 $\mu\text{g/ml}$ os esplenócitos apresentaram atividade linfoproliferativa significativamente menor que o grupo controle ($p < 0,05$), as concentrações mais baixas não apresentaram diferenças significantes quando comparadas entre si ou ao grupo controle (Fig. 5b).

3.6. Atividade citotóxica direta da ATF

A avaliação da viabilidade das células do tumor de Ehrlich e de esplenócitos de animais normais cultivadas em presença de concentrações crescentes da ATF indica que não houve diferenças significantes entre as concentrações em nenhum dos períodos, indicando que a fração ATF não tem atividade citotóxica direta sobre células do tumor de Ehrlich e sobre os linfócitos, que apresentaram viabilidade similar aos controles de lise espontânea ao longo de 24 horas (dados não mostrados).

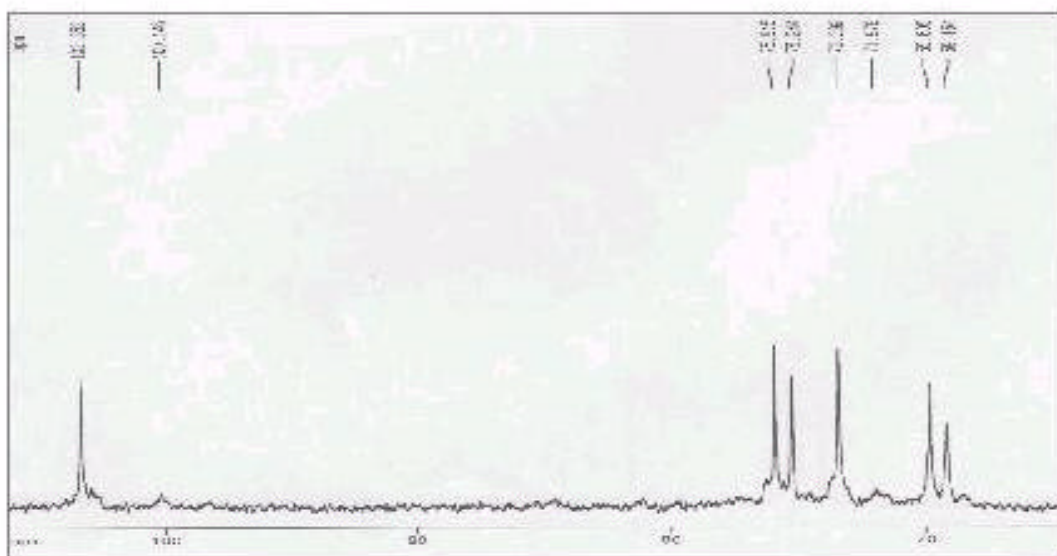
3.7. Níveis de produção de citocinas

No 7º dia de experimento os níveis de produção de IL-10 pelos grupos Ehr ($p < 0,05$) e ATF ($p < 0,01$) foram significativamente maiores quando comparado ao grupo controle, e a produção pelo grupo Ehr/ATF foi significativamente ($p < 0,05$) menor quando comparado ao

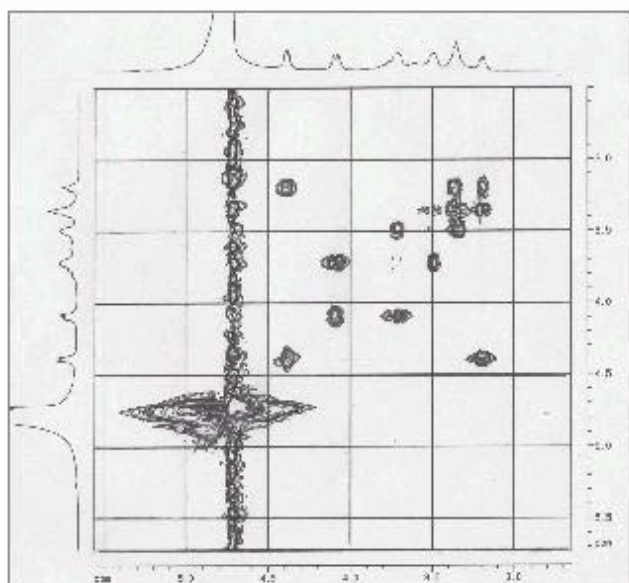
grupo ATF. Nos resultados do 14º dia pode-se observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Fig.6).

Os níveis de produção de TNF- α e IFN- γ dos grupos sacrificados aos 7º e 14º dia de experimento, não apresentaram diferenças estatisticamente significantes na produção dessas citocinas (Fig.6).

a)



b)



c)

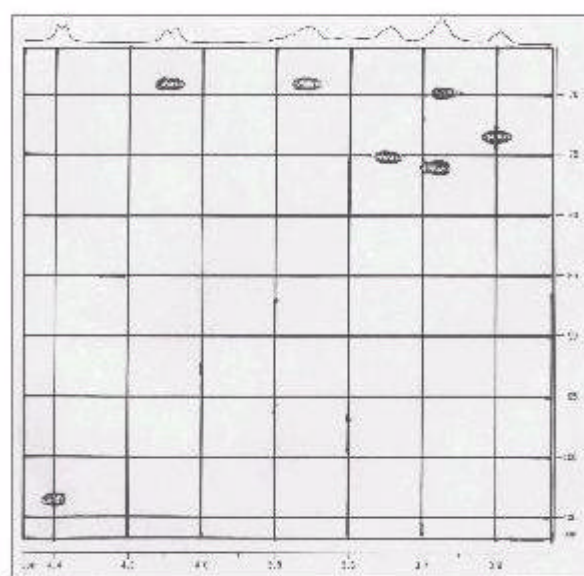


Fig1. Análise por Ressonância Magnética Nuclear da fração ATF. a) Espectro de NMR ^{13}C da fração ATF (400 MHz, D_2O), b) Espectro de COSY ^1H - ^1H da fração ATF(400 MHz, D_2O) c)Espectro de HMQC da fração ATF(400 MHz, D_2O).

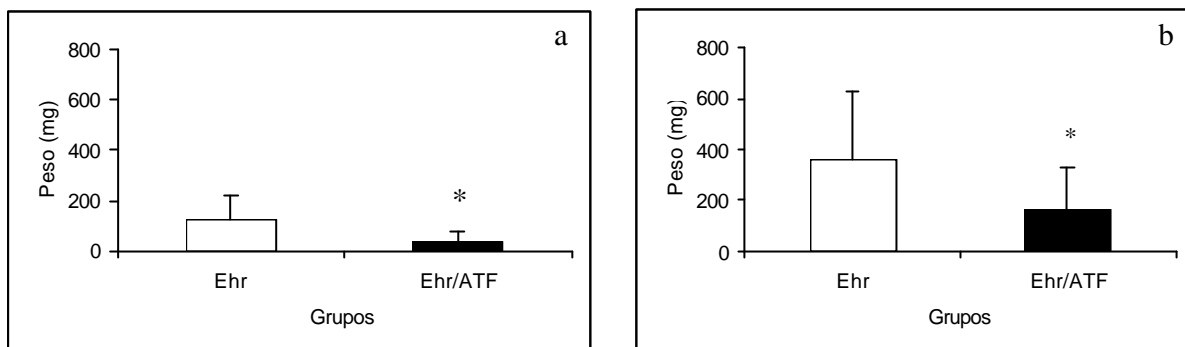


Fig.2.Massas do tumor de Ehrlich removidas de camundongos BALB/c (n=10) dos grupos tratados com 0,5mg/aplicação de ATF (Ehr/ATF) ou solução salina (Ehr) nos dias 3, 4, 5 no sítio tumoral e avaliadas com 7 (a) ou 14 (b) dias de evolução após a implantação tumoral subcutânea.

* ($p < 0,05$ teste “t” de Student).

Grupos Dias	C/Ehr e Ehr		Ehr/ATF	
	7	14	7	14
Infiltrado celular	+++	++ a +++	++	+++
Áreas de necrose	+++	++ a +++	++	+++
Figuras mitóticas	+	++ a +++	+	+
Células Gigantes	+	+ a ++	ausente	ausente
Células apoptóticas	+	ausente	+	ausente

Tabela 1: Achados histopatológicos no tecido tumoral de animais tratados com solução salina ou ATF no sitio de implantação tumoral com 7 ou 14 dias de evolução. Foram avaliadas a presença de áreas de necrose, de figura mitóticas, células em apoptose, células gigantes neoplásicas e infiltrado celular (mononuclear e polimorfonuclear) por análise semi-quantitativa, sendo os critérios graduados em 3 grupos: (+) pouco, (++) moderado e (+++) intenso.

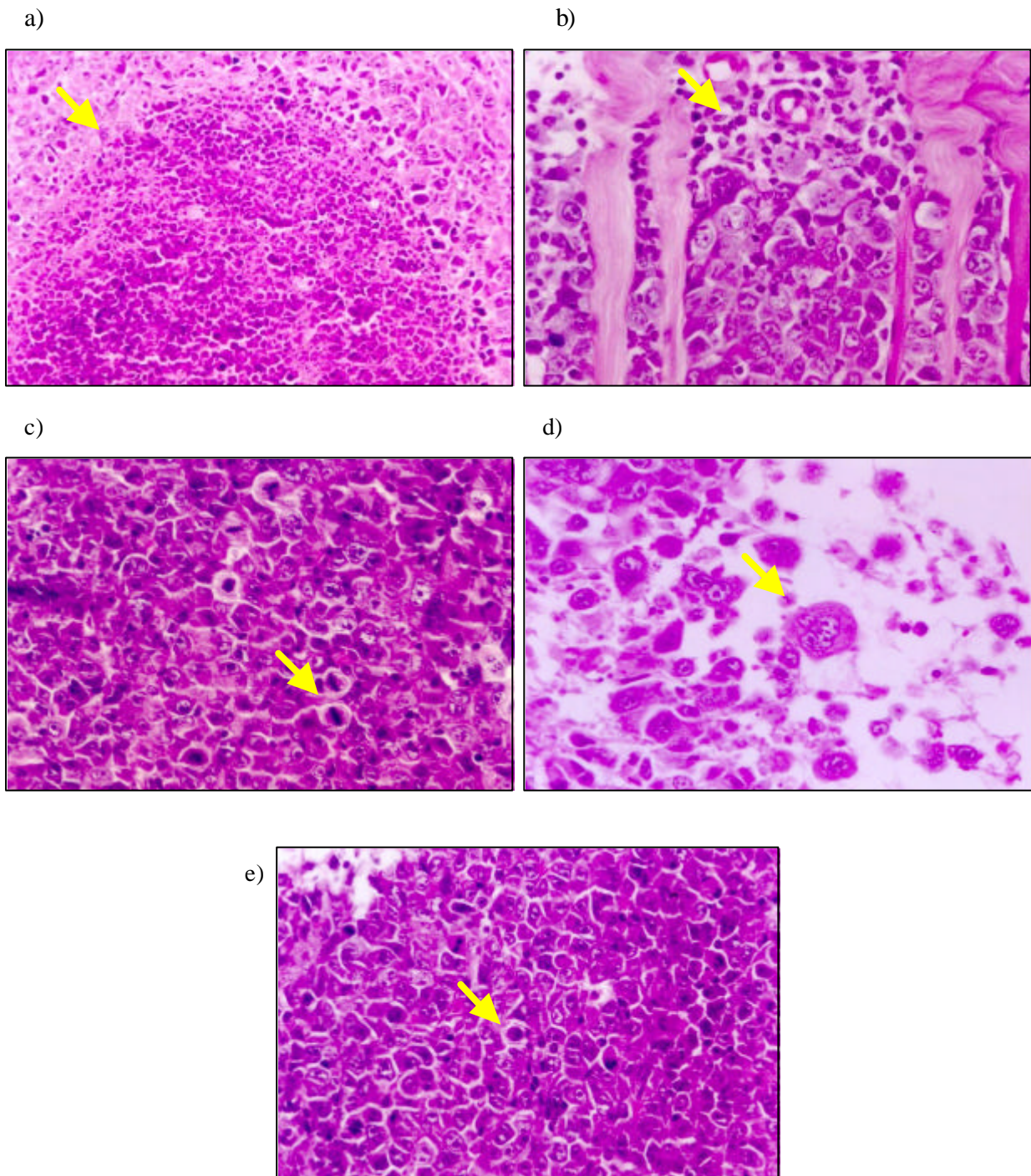


Fig.3. Análise histopatológica de tumor de Ehrlich subcutâneo de animais tratados com solução salina ou ATF no sitio de implantação tumoral com 7 e 14 dias de evolução: a) área de necrose (Ehr e Ehr/ATF), aumento 20X b) infiltrado celular com predomínio de

células mononucleares (Ehr e Ehr/ATF), c) presença de figuras mitóticas nos grupos controle (Ehr), d) presença de células gigantes nos grupos controle (Ehr) e e) presença de figuras apoptóticas nos grupos com tumor de Ehrlich tratado com a ATF (Ehr/ATF). Coloração HE (aumento 400X).

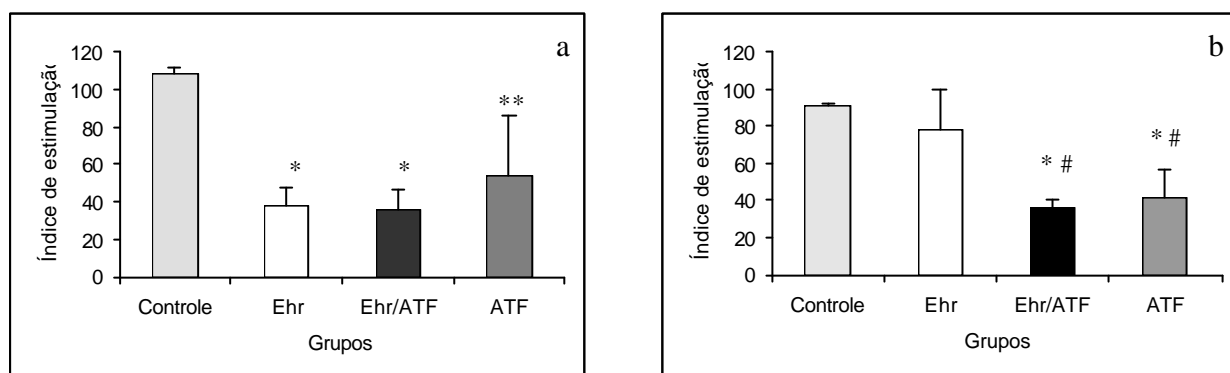


Fig.4. Atividade linfoproliferativa de esplenócitos de camundongos BALB/c (n=10) dos grupos tratados com 0,5mg/0,1ml de ATF (Ehr/ATF e ATF) ou 0,1ml de solução salina (controle e Ehr). Os inóculos foram feitos nos dias 3, 4, 5, no sítio tumoral e a avaliação realizada aos 7 (a) e 14 (b) dias após implantação subcutânea do tumor de Ehrlich.

* vs controle (p<0,01, ANOVA),

** vs controle (p<0,05, ANOVA)

vs Ehr (p<0,05, ANOVA)

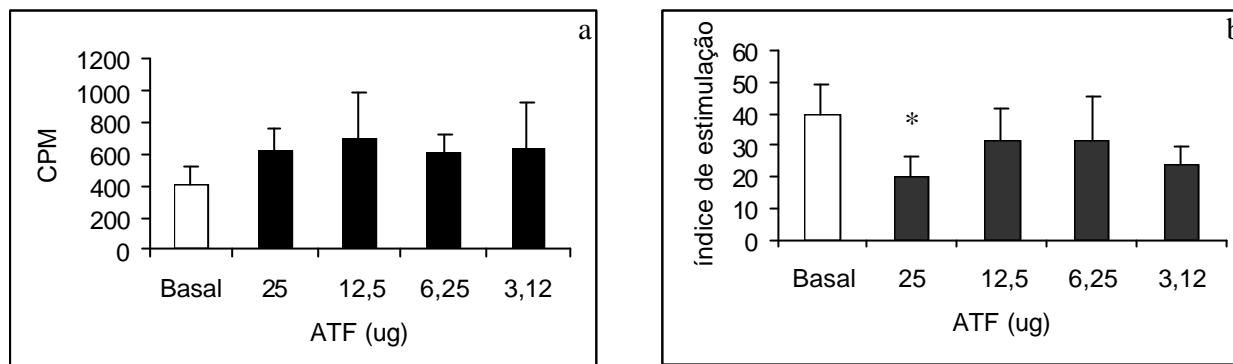


Fig.5. Efeito da adição da ATF (25, 12,5 e 6,25, 3,12 ug/alvéolo) sobre a atividade proliferativa de esplenócitos de camundongos BALB/c normais (n=5). Esplenócitos á concentração de 4×10^6 cel/ml foram distribuídos em microplacas de cultivo celular e incubadas por 72h a 37^0 C em estufa de CO_2 5% em presença da ATF.

a) avaliação do efeito mitogênico da ATF.

b) avaliação do efeito da ATF, adicionada a culturas estimuladas com Con A.

*($p < 0,05$ ANOVA).

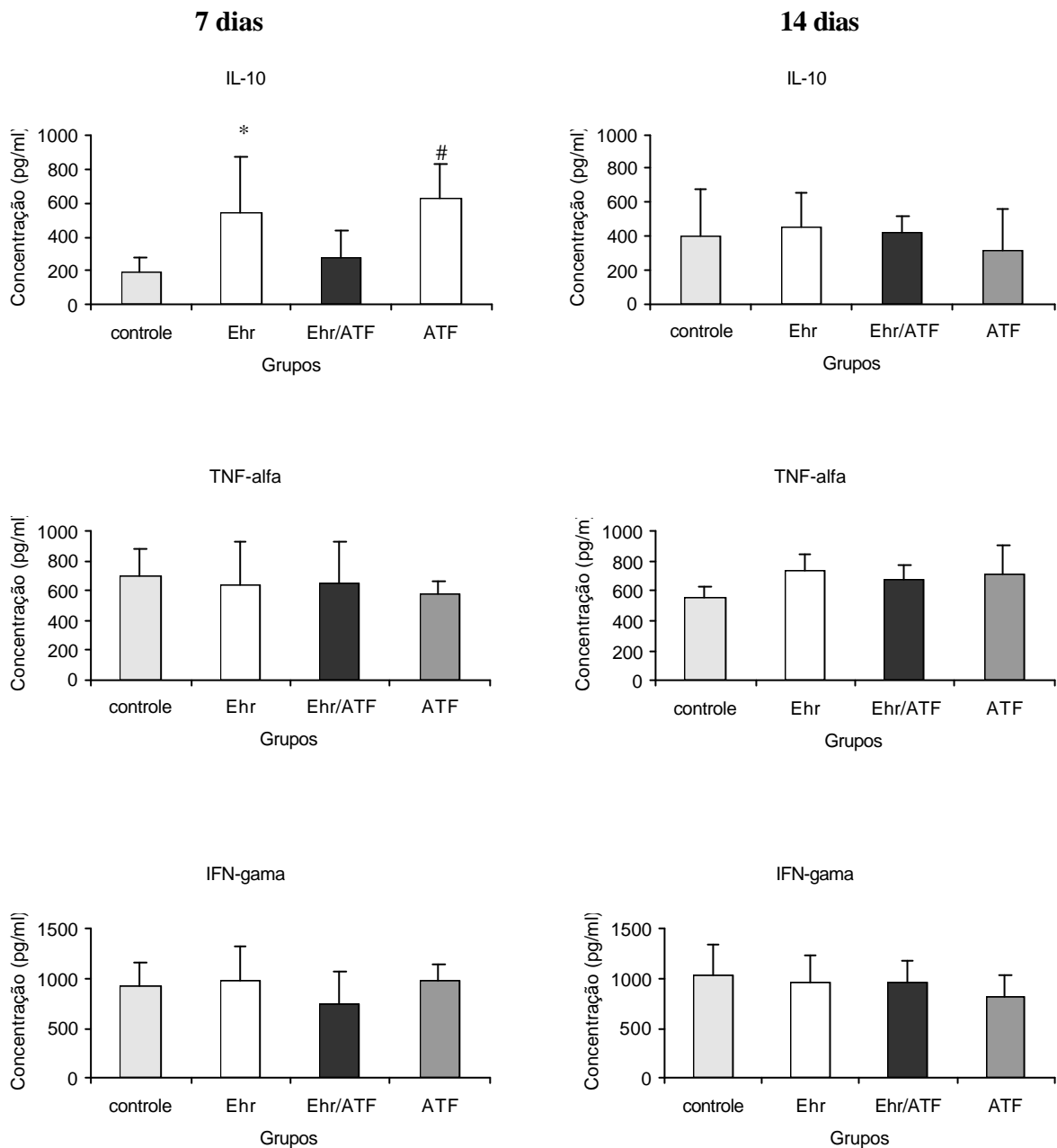


Fig.6. Níveis *in vitro* de IL-10, TNF- α e INF- γ produzidos por esplenócitos de camundongos BALB/c (n=10) dos grupos tratados com 0,5mg/0,1ml (Ehr/ATF e ATF) ou 0,1ml de solução salina (controle e Ehr) nos dias 3, 4, 5 no sítio tumoral e avaliados aos 7 e 14 dias após a implantação tumoral. Para geração de sobrenadante a concentração das células foi ajustada para 4×10^6 cel/ml, distribuídas em macroplacas e estimuladas com Con

A (3,5ug/alvéolo) para determinação de IL-10 e INF- γ ou estimuladas com SAC (1:5000) para determinação de TNF- α incubadas por 24h e 48h, respectivamente.

* Ehr vs controle ($p < 0,05$ ANOVA) e Ehr vs Ehr/ATF ($0,05 < p < 0,1$ ANOVA).

ATF vs controle ($p < 0,01$ ANOVA) e ATF vs Ehr/ATF ($p < 0,05$ ANOVA).

4. Discussão

No presente trabalho demonstramos que o uso de apenas 3 aplicações da ATF no sítio de implantação subcutânea do tumor de Ehrlich, foi capaz de inibir significativamente o crescimento tumoral e modificar o perfil histopatológico do tecido tumoral. Fujimiya et al. [9-12] demonstraram claramente que a fração ATF inibe o desenvolvimento do fibrossarcoma Meth A em sistema de simples e duplo enxerto tumoral, observando-se que a dose de 0,5 mg da fração ATF foi eficiente em inibir o desenvolvimento tumoral [11], dose também utilizada em nosso estudo por ter apresentado o melhor resultado contra o desenvolvimento tumoral na etapa de padronização. A diferença de efetividade antitumoral entre nossos resultados e aqueles relatados por Fujimiya et al. [9] pode ser devida ao maior número de células implantadas em nosso estudo, ou ao fato de termos utilizado um adenocarcinoma, geralmente mais resistente à imunoestimulação que os sarcomas (fibrossarcoma Meth A ou 180) utilizados em outros estudos [5,8-12,25].

A análise por NMR da fração utilizada no presente trabalho, demonstra que a ATF apresenta um perfil espectrofotométrico similar ao apresentado por Kawagishi et al. [3,4] com a concentração protéica (13,4%) próxima da descrita por Ebina et al. [11], que trabalharam com a ATF composta de 16,6% de proteína e 76,7% de carboidratos. Além

disso, a análise de HMQC confirma a estrutura de β -glucanas do principal composto presente nesta fração.

A análise histopatológica do tecido tumoral revela que tanto os grupos controle (C/Ehr e Ehr) como o grupo tratado com a ATF (Ehr/ATF) apresentaram um infiltrado celular intenso e com predominância de células mononucleares. As extensas áreas de necrose presentes em todos os grupos parecem ser devidas ao crescimento rápido e agressivo do tumor de Ehrlich, tornando necessária a adoção de alguns parâmetros para tentar avaliar o efeito do tratamento sobre a resposta local desenvolvida pelo hospedeiro. O que difere os grupos C/Ehr e Ehr do grupo Ehr/ATF no 7º e no 14º dia é a presença de numerosas figuras mitóticas e células gigantes neoplásicas nos grupos controle, indicando a malignidade do tumor de Ehrlich. Entretanto, na massa tumoral obtida dos animais do grupo Ehr/ATF, encontramos menor frequência de figuras mitóticas e praticamente ausência de células gigantes. Este fato, associado à maior quantidade de células em apoptose encontrada no grupo Ehr/ATF estão de acordo com o potencial antitumoral atribuído à ATF. No 14º dia de experimento observamos no grupo Ehr/ATF, poucas figuras mitóticas e células gigantes neoplásicas, não tendo sido encontradas células em apoptose nas amostras avaliadas.

Os achados histopatológicos são compatíveis com o menor crescimento tumoral no grupo Ehr/ATF em relação ao controle, apesar do tempo decorrido entre o inóculo da ATF e o sacrifício dos animais, isto é, considerando-se que os animais foram tratados nos dias 3, 4, 5, os animais sacrificados no 7º dia foram avaliados 1 dia após o último tratamento, enquanto na avaliação aos 14 dias, houve um lapso de 8 dias entre o último tratamento e a análise. Na análise de sobrevivência realizada com esta forma de tratamento a ATF não foi

capaz de prolongar a sobrevivência dos animais (dados não mostrados) apesar de ter retardado o crescimento tumoral (Fig.2), apontando para a possibilidade de que o efeito protetor da ATF seja gradualmente minimizado sugerindo a necessidade de novos inóculos para permitir a manutenção do efeito. Embora Oshiman et al. [12] não tenham dado maior importância a este detalhe, observaram que a repetição do tratamento com ATF por via oral, após 14 dias promove inibição mais eficiente do crescimento tumoral, corroborando nossa hipótese de necessidade de manutenção do tratamento.

Através da análise de linfócitos esplênicos por citometria de fluxo, Mizuno et al. [25] demonstraram que as percentagens das populações de células CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ foram significativamente aumentadas em camundongos normais tratados oralmente com uma fração de *A. blazei* solúvel em água quente, entretanto pouco se sabe de sua ação sobre a função destas células. A atividade linfoproliferativa é um parâmetro clássico de avaliação do potencial de resposta imune celular e estudos prévios mostram que polissacarídeos do cogumelo *Coriolus versicolor* são capazes de aumentar a resposta de esplenócitos a mitógenos tanto após o tratamento *in vivo* quanto por sua adição à cultura [26]. Polissacarídeos do cogumelo *Flammulina velutipes* administrados i.p. em camundongos, também foram capazes de induzir a proliferação de linfócitos esplênicos [27]. Contrariamente, nossos resultados indicam que a administração da ATF no sítio tumoral não aumentou a atividade proliferativa dos linfócitos esplênicos. No 7^o dia de experimento o grupo Ehr apresentou menor atividade linfoproliferativa que o controle e esse achado está de acordo com a sugestão de outros autores de que os mecanismos de escape do tumor de Ehrlich estão associadas a capacidade de promover supressão da resposta imune, tanto através da redução da capacidade de resposta dos linfócitos aos mitógenos [28,29] quanto pela progressiva diminuição da atividade das células NK esplênicas [30,31]. Segura et al.

[32] demonstraram que nos primeiros dias de implantação do tumor de Ehrlich, linfócitos Th esplênicos do hospedeiro, apresentam-se drasticamente diminuídos, acompanhados por uma redução no número de células CD4⁺ secretoras de IFN- γ . Aledo et al. [33] demonstraram que a presença do tumor de Ehrlich induz uma resposta aguda e rápida, caracterizada por uma diminuição tanto de células CD4⁺ como de CD8⁺.

O tratamento com ATF, embora tenha sido capaz de retardar o crescimento tumoral, não foi capaz de reverter esse quadro. Ao contrário, manteve baixa a atividade linfoproliferativa, mesmo aos 14 dias. Tal observação nos faz pensar, que a fração ATF potencializa a migração seletiva das células imunocompetentes do baço para o sítio tumoral, de modo a inibir o desenvolvimento do tumor de Ehrlich, como demonstrado também por Fujimiyia et al. [9] no modelo de fibrossarcoma Meth A. Esta sugestão é corroborada pela observação feita por Ebina et al. [11] de que células esplênicas de animais tratados com ATF no sítio tumoral, são capazes de promover imunidade adotiva e da transferida a outros animais. A idéia é reforçada ainda pelo fato de que os animais normais que receberam ATF (ATF), também apresentaram menor índice de proliferação. No 14^o dia, observa-se que a atividade proliferativa dos esplenócitos do grupo Ehr retorna aos níveis equivalentes ao controle, enquanto nos grupos que receberam ATF, a resposta ao mitógeno continua baixa, possivelmente porque o tratamento promoveu a permanência das células imunocompetentes no local, impedindo o estabelecimento de um estado de imunossupressão *in situ* tão intenso.

Uma observação inédita do presente trabalho é o fato de que esplenócitos de animais com tumor subcutâneo de Ehrlich produzem maiores níveis de IL-10 que os animais normais aos 7 dias de implantação tumoral, diferindo dos dados de Gentile [34]

que não observou aumento na produção desta citocina em camundongos com o tumor na forma ascítica. Este fenômeno pode representar um dos mecanismos de escape do tumor de Ehrlich subcutâneo, como sugerido também para outros tipos de tumor (ovário, cólon, pulmão carcinomas de pele, melanoma, linfomas) [14] e responsável pela diminuição de células CD4⁺ secretoras de IFN- γ observado por Segura et al [32]. A produção de maior concentração dessa citocina pelos esplenócitos, no 7^o dia, poderia ser responsável pela diminuição da atividade linfoproliferativa neste período, enquanto níveis normais de IL-10 no 14^o dia, são compatíveis com a atividade linfoproliferativa normal neste período. Embora os dados não tenham sido estatisticamente significantes, os portadores de tumor tratados com ATF (Ehr/ATF), apresentaram produção de IL-10 em níveis mais similares aos controles normais que ao grupo Ehr ($0,05 < p < 0,1$). Assim, a baixa atividade linfoproliferativa encontrada nesse grupo, não parece ser devida a um efeito imuno supressor da ATF, reforçada a idéia de migração dos esplenócitos para o sítio tumoral. Intrigante é o fato de que os animais do grupo ATF também tenham produzido maior concentração de IL-10 que os controles, sugerindo que células de animais com tumor e de animais normais, interagem de modo diferente com a ATF, visto que no 1^o caso há presença de um componente agressor. Embora a produção de níveis mais elevados de IL-10 no grupo Ehr seja sugestivo de um desvio do equilíbrio Th1/Th2 em favor do perfil Th2, não observou-se alteração na capacidade de produção de TNF- α e IFN- γ em nenhum dos grupos estudados. É possível, entretanto que no sítio tumoral haja diferença no perfil das citocinas produzidas.

Em vista da baixa atividade linfoproliferativa observada nos animais inoculados com ATF (Ehr/ATF e ATF), sentimos a necessidade de verificar se o efeito da fração era

devido a uma atividade lítica sobre os esplenócitos ou a um efeito antiproliferativo direto. A avaliação da viabilidade de esplenócitos através do método da exclusão do azul trypan indicou que a incubação destas células com a ATF, não provocou alteração de sua viabilidade em comparação com o controle de lise espontânea. Por outro lado, a análise do efeito direto da ATF sobre esplenócitos estimulados com Con A, revelou que adição de 25ug/ml promoveu inibição da proliferação de esplenócitos de animais normais comparado ao controle, sugerindo que a fração ATF, nesta concentração, inibe diretamente a atividade linfoproliferativa sem alterar sua viabilidade. Esta concentração, entretanto é muito superior que se detectaria *in vivo*, naqueles animais inoculados com o produto. Assim, pensamos na possibilidade de que a diminuição da atividade linfoproliferativa dos esplenócitos em presença da ATF, deva-se a uma interação desta fração com a Con A, provocando a adsorção do mitógeno, diminuindo sua disponibilidade para estimular os linfócitos. Para testar essa hipótese, incubamos resíduos insolúveis da ATF com Con A marcada com fluoresceína (Con A-FITC) o que revelou que há adsorção do mitógeno pelo produto (dados não mostrados).

Embora tenham trabalhado com outro tipo de extração, Kuo et al. [35] também observaram que a adição de uma fração metanólica do cogumelo *A. blazei* à cultura de células mononucleares humanas estimuladas com fitohemaglutinina, é capaz de suprimir a proliferação dessas células e que esta atividade inibitória não foi devida a citotoxicidade celular direta da fração.

Existem relatos de que a ATF e uma fração de baixo peso molecular extraída desta, não exerceram atividade citotóxica direta sobre células mononucleares do baço, mas exercem atividade citotóxica direta *in vitro* sobre células tumorais Meth A por indução de apoptose [9,10]. Em nosso estudo, a fração ATF não demonstrou ter atividade tóxica sobre

as células do tumor de Ehrlich. O mesmo foi observado por Ito et al. [6] ao demonstrarem que um polissacarídeo (ATOM) extraído do cogumelo *A. blazei* não exerceu efeito citotóxico direto *in vitro* sobre diferentes células tumorais, entre elas o tumor de Ehrlich. Assim, nossos resultados sugerem que a ação antitumoral da ATF não se deve a um efeito direto sobre células do tumor de Ehrlich quando injetados no sítio de implantação do tumor. Deste modo em vista dos dados obtidos, podemos concluir que a ATF inoculada no sítio de implantação tumoral é capaz de retardar o crescimento tumoral mas não provoca imunoestimulação de esplenócitos. Visto que o produto não tem ação citotóxica direta sobre as células tumorais, sugerimos que a ação antitumoral deve-se a promoção da migração de células imuno competentes para o sítio tumoral, hipótese a ser testada em experimentos posteriores.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Luís Cláudio Di Stasi do Departamento de Farmacologia-IBB-UNESP pelo suporte técnico dado à extração da fração ATF, ao Prof. Dr. Luís Cuadrado do Depto. de Clínica Médica-FMB-UNESP pelo auxílio no procedimento de diálise, a Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha do Departamento de Patologia Veterinária-FMVZ-UNESP pelo auxílio prestado na análise histopatológica, ao CNPq pela bolsa de mestrado que me foi concedida e ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP 98/07726-5R).

5. Referências Bibliográficas

- [1] P.W Solomon, A.L Weis. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: A modern perspective. *Crit. Rev. Immunol.* 19 (1999) 65-96.
- [2] P.M Kidd. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. *Med. Rev.* 5 (2000) 4-27.
- [3] H. Kawagishi, R. Inagaki, T. Kanao, T. Mizuno. Fractionation and antitumor activity of water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydr. Res.* 186 (1989) 267-273.
- [4] H. Kawagishi, T. Kanao, R. Inagaki, T. Mizuno, Shimura K, H. Ito, T. Nagiwara, T. Nakamura. Formolysis of a potent antitumor a (1→6)-β-D-glucan-protein complex from *Agaricus blazei* Murill fruiting bodies and antitumor activity of resulting products. *Carbohydr. Polymers.* 12 (1990) 393-403.
- [5] H. Ito, K. Shimura, H. Itoh, M. Kawade. Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (IWADE Strain 101) "Himematsutake" and its mechanism in tumor-bearing mice. *Anticancer. Res.* 17 (1997) 277-284.
- [6] H. Itoh, H. Ito, H. Amano, H. Noda. Inhibitory action of a (1→ 6)-beta-D-glucan-protein complex (FIII-2b) isolated from *Agaricus blazei* Murill ("Himematsutake") on Meth A fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor mechanism. *Jpn. J. Pharmacol.* 66 (1994) 265-271.

- [7] E.C.Vicent, V.E.C. Ooi, F. Liu. A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides. *Int. J. Med. Mushr.* 1 (1999) 195-206.
- [8] N. Ohno, M. Furukawa, N.N. Miura, Y. Adachi, M. Motoi, T. Yadomae. Antitumor β -glucan the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. *Biol. Pharm. Bull.* 24 (2001) 820-828.
- [9] Y. Fujimiya, Y. Suzuki, K. Oshiman, H. Kozori, K. Moriguchi, Nakashima H, Y. Matumoto, S. Takahara, T. Ebina, R. Katakura. Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis. *Cancer Immunol. Immunother.* 46 (1998) 147-159.
- [10] Y. Fujimiya, Y. Suzuki, R. Katakura, T. Ebina. Tumor-specific cytotoxic and immunopotentiating effects of relatively low molecular weight products derived from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill. *Anticancer. Res.* 19 (1999) 113-118.
- [11] T. Ebina, Y. Fujimiya. Antitumor effect of a peptide-glucan preparation extracted from *Agaricus blazei* in a double-grafted tumor system in mice. *Biotherapy* 11 (1998) 259-265.
- [12] K. Oshiman, Y. Fujimiya, T. Ebina, I. Suzuki, M. Noji. Orally administered β -1,6-D-polyglucose extracted from *Agaricus blazei* results in tumor regression in tumor-bearing mice. *Planta Med.* 68 (2002) 610-14.
- [13] S. Romagnoni. Role of TH1 and TH2 cells against tumours. In: *The TH1/TH2 paradigm in disease*. Berlin: Springer; 1996, pp. 159-160.
- [14] S. Mocelin, E. Wang, F.M. Marincola. Review: Cytokines and immune response in the tumor microenvironment. *J. Immunotherapy* 24 (2001) 392-407.

- [15] L.P. Seung, D.A. Rowley, H. Schreider. Cytokines in cancer. In: Theze J, The cytokine Network and Immune Functions. New York: Oxford University Press; 1999, pp. 335-345.
- [16] J. Oppenheim, H. Fujiwara. The role of cytokines in cancer. Cytokine Growth Factor Rev. 7 (1996) 279-288.
- [17] H. Ikeda, L.J. Old, R.D. Schreiber. The roles of IFN- γ in protection against tumor development and cancer immunoeediting. Cytokines Growth Factors 13 (2002) 95-109.
- [18] G. Parmiani, M.P. Colombo, C. Melani. Immunotherapy, gene therapy, cytokines and cancer. In: Theze J. The cytokine Network and Immune Functions. New York: Oxford University Press, 1999, pp.346-361.
- [19] K.J. Tracey. Tumor necrosis factor-alpha. In: A. Thomson, (Eds). The cytokine handbook. San Diego: Academic Press, 1994, pp. 289-304.
- [20] H. Schreiber, D.A. Rowley. Inflammation and Cancer, In: J.I. Gallin, R. Syndeman, (Eds), Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1999, pp. 1117-1129.
- [21] F. Balkwill, S.A. Kelly, S.T. Malik. Cytokines. In: P. Michael, H.M. Pinedo, U. Veronesi, (Eds.), Oxford Textbook of Oncology. Oxford Medical Publications/Oxford University Press, pp. 2169-2174.
- [22] D.L. Paiva, G.M. Lampman, G.S. Kriz, (1996). Introduction to Spectroscopy, 2nd ed. Saunders College Publishing.
- [23] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. (1951) 193: 265.
- [24] Farmacopéia Brasileira. 3rd ed. Andrei. São Paulo, 1977

- [25] M. Mizuno, M. Morimoto, K. Minato, H. Tisuchida. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets. *Biosc. Biothechnol. Biochem.* 62 (1998) 434-437.
- [26] H.X. Wang, T.B. Ng, V.E. Ooi, W.K. Liu, S.T. Chang. A polysaccharide-peptide 6complex from the cultured mycelia of the mushroom *Coriolus versicolor* and their culture medium activate mouse lymphocytes and macrophages. *Int Biochem. Cell Biol.* 28 (1996) 601-607.
- [27] M.Y.K. Leung, K.P. Fung, Y.M. Choy. The isolation and characterization of an immunomodulatory and anti-tumor polysaccharide preparation from *Flammulina velutipes*. *Immunopharmacol.* 35 (1997) 255-263.
- [28] J.L. Subiza, Vinuela J.E, R. Rodriguez, J. Gil, M.A. Figueredo, E.G. Conchas. Development of splenic natural suppressor (NS) cells in Ehrlich tumor-bearing mice. *Int. J. Cancer* 44 (1989) 307-314.
- [29] H. Kumagai, T. Masuda, M. Sakashita, M. Ishizuda, T. Takcuchi. Modulation of macrophage activity in tumor bearing mice by cytogenin. *J. Antibiot.* 48 (1995) 321-335.
- [30] R.S. Parhar, P. K. Lala. Changes in the host natural killer cell population in mice during tumor development. 2. The mechanism of suppression of NK activity. *Cell Immunol.* 93 (1985) 265-279.
- [31] R.S. Parhar, P. K. Lala. Prostaglandin E2-mediated inactivation of various killer lineage cells by tumor-bearing host macrophages. *Leukocyte Biol.* 44 (1988) 474-484.
- [32] J.A. Segura, L.G. Barbero, J. Márquez. Early tumor effect on splenic Th lymphocytes in mice. *FEBS Lett.* 414 (1997) 1-6.

- [33] J.C. Aledo, J.A. Segura, L.G. Barbero, J. Márquez. Early differential expression of two glutaminase mRNAs in mouse spleen after tumor implantation. *Cancer Lett.* 133 (1998) 95-99.
- [34] Gentile L.B. Modulação por PGE2 no perfil de subpopulações celulares e de citocinas na evolução do tumor ascítico de Ehrlich (TAE). [Dissertação]. Botucatu. Departamento de Patologia –Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista, 2001.
- [35] Y. Kuo, Y. Huang, C. Chen, Y. Lin, K. Chuang, W. Tsai. Cell cycle progression and cytokine gene expression of human peripheral blood mononuclear cells modulated by *Agaricus blazei*. *J. Lab. Clin. Med.* 140 (2002) 176-187.

IV-Apêndice

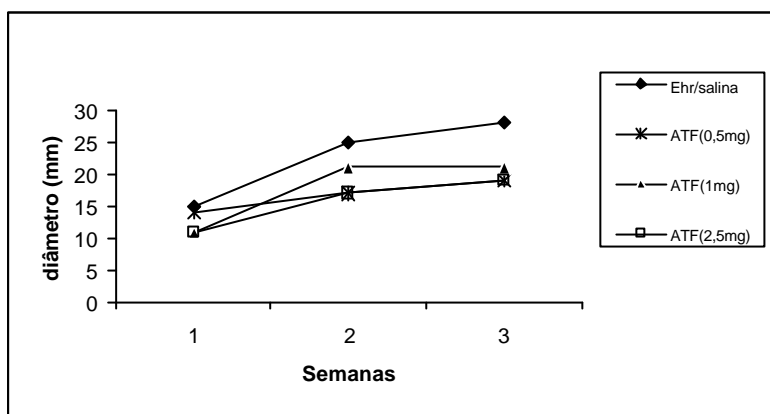


Fig.1. Efeito da fração ATF nas concentrações de 0,5, 1 e 2,5 mg/animal acompanhado através da medida do diâmetro da área ocupada pelo tumor para se estabelecer a dose mais eficiente em conter o crescimento tumoral.

Tabela 1

Atividade citotóxica direta da ATF sobre células do tumor de Ehrlich

ATF (ug/ml)	Viabilidade (%)			
	2 h	4 h	10 h	24h
100	100	98	100	100
20	97	98	95	97
10	97	100	98	91
5	97	97	98	97

Tabela 2

Atividade citotóxica direta da ATF sobre linfócitos esplênicos de animais normais

ATF (ug/ml)	Viabilidade (%)		
	2 h	4 h	24h
0	100	100	77
100	100	100	67
20	100	100	84
10	100	100	76
5	100	100	82