

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA  
CAMPUS DE BOTUCATU

EFEITO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA DO COGUMELO  
*Agaricus brasiliensis* SOBRE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS E  
DE FATORES ANGIOGÊNICOS NO MICROAMBIENTE  
TUMORAL

DOUTORANDA: ANDRÉA VANESSA FERREIRA DA SILVA PINTO  
ORIENTADOR: RAMON KANENO

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Patologia da Faculdade de  
Medicina de Botucatu - Universidade  
Estadual Paulista UNESP para a obtenção  
do título de Doutor em Patologia.

BOTUCATU-SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Pinto, Andréa Vanessa Ferreira da Silva.  
feito da fração polissacarídica do cogumelo *Agaricus brasilienses* sobre  
a produção de citocinas e de fatores angiogênicos no microambiente  
tumoral / Andréa Vanessa Ferreira da Silva Pinto. – 2007.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade  
Estadual Paulista, 2007.

Orientador: Prof. Dr. Ramon Kaneno

Assunto CAPES: 21300003

1. Cogumelos. 2. Glucanas. 3. Tumor.

CDD 615.9

Palavras-chave: *Agaricus brasiliensis*;  $\beta$ -glucana; IL-10; IFN- $\gamma$ ; Tumor de  
Ehrlich.

***Dedico este trabalho***

*Aos meus pais **Clési e Leonardo***

*Ofereço a vocês mais essa conquista, pois vocês abriram mão de muitas coisas para dar a mim a chance de concretizar alguns dos nossos sonhos.*

*Ao meu irmão **André Luís***

*meu amigo e confidente com quem posso contar sempre...*

*Ao meu namorado **Luciano***

*Por todo o carinho e amor que você dedica a mim tornando a vida mais fácil, ofereço a você hoje o meu sorriso repleto de alegria e todo o meu amor...*

***Ao Prof. Dr. Ramon Kaneno***

*Meu orientador, responsável pelo meu crescimento e amadurecimento profissional, que me ensinou a ser persistente e determinada. Agradeço pelo exemplo de dedicação e por me ensinar com dignidade a compreender a ciência.*

*“Existem pessoas que quando deveriam ser simplesmente professores, foram mestres. Que quando deveriam ser mestres, foram amigos e em sua amizade nos compreenderam e nos incentivaram a seguir nosso caminho”.*

*Serei eternamente grata...*

### ***Agradecimentos***

*A Deus que se faz presentes em todos os momentos da minha vida iluminando e me guiando sempre no caminho do bem.*

*A Prof<sup>ª</sup>. Dra. Ana Paula Campanelli (USP) por todo apoio científico e pela realização da técnica de imunofluorescência e análise por microscopia confocal.*

*Ao Prof. Dr. Edson (UFSCAR) pela realização das análises bioquímicas da fração ATF.*

*Ao Prof. Dr. João Pessoa por todo apoio científico e auxílio na realização da técnica de PCR em tempo real.*

*Aos colegas Tatiana Schneider e Eduardo Dantas (USP-RP) e a Luciana do Instituto Butantan, por todo apoio científico e auxílio com a técnica de ELIsport.*

*Aos Professores e funcionários do Departamento de Patologia em especial a Dra. Denise, por sempre compartilhar sua experiência e conhecimento.*

*Aos Professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia, por sempre compartilharem suas experiências e conhecimento e pela amizade, em especial a Dra. Angela, Dra. Terezinha, Dra. Alexandrina, Dr. Sílvio e Dr. Mauricio.*

*Aos colegas e amigos do Departamento de Microbiologia e Imunologia, que acompanharam esta caminhada, obrigada pela convivência e apoio.*

*Aos **Funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia**, que participaram direta ou indiretamente deste trabalho, minha eterna gratidão e **em especial a Luis Alquati, Lula, Sônia e Nice** que além de excelentes profissionais são grandes amigos.*

*Aos **funcionários e amigos “Carlinhos”, PC e Glória** pela amizade e apoio na obtenção e cuidado dos animais.*

*Aos **funcionários da secção de Pós-Graduação, Andréa, Janete, Nathanael e Regina** pela atenção e disponibilidade.*

*Ao **funcionário Claudinei** do laboratório de imunopatologia do departamento de patologia, pela confecção das lâminas para análise confocal.*

*Às amigas **Pri, Carol, Lindsey e Grá (ramonet’s)** que me ajudaram a realizar este trabalho, sempre companheiras e compreensíveis, desejo que todos os momentos vividos entre nós seja o ponto inicial de uma eterna amizade.*

*A **minha amiga querida e “segunda mãe” Maria Antônia (Tó)** que me acolheu e disponibilizou seu tempo pra me ajudar sempre que precisei e cuidar de mim.*

*Às **amigas fiéis Patrícia, Marcinha, Marina e, Cris** pela amizade e por estarem ao meu lado em todos os momentos.*

*À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP** pelo suporte financeiro que permitiu a realização deste trabalho (Proc. 04/07737-0).*

*Ao **CNPq** pela concessão da bolsa de doutorado.*

**Lista de abreviaturas:**

**ATF:** Proteoglicanas ácido-solúveis

**CD:** closter

**CD4<sup>+</sup>:** células T restritas do MHC de classe II

**CD8<sup>+</sup>:** células T restritas do MHC de classe I

**CD19<sup>+</sup>:** linfócitos B

**CD25<sup>+</sup>:** linfócitos T ativados

**CTL:** células T citolíticas

**FGF-2:** fator de crescimento de fibroblasto

**TGF-β:** fator de crescimento e transformação beta

**IL:** interleucina

**IFN-γ:** interferon gama

**MAC-1<sup>+</sup>:** granulócitos, monócitos e células NK

**NK:** células *natural killer*

**Th1:** células T helper 1

**Th2:** células T helper 2

**LAK:** linfócitos com atividade *killer*

**VEGF:** fator de crescimento do endotelial vascular

**PDGF:** fator de crescimento derivado de plaquetas

**TAM:** macrófagos associados ao tumor

**TNF-α:** fator de necrose tumoral alfa

**GM-CFU:** fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos

## SUMÁRIO

|                                             |           |
|---------------------------------------------|-----------|
| <b>I. Revisão Bibliográfica .....</b>       | <b>08</b> |
| <b>II. Referências Bibliográficas .....</b> | <b>21</b> |
| <b>III. Manuscrito .....</b>                | <b>34</b> |
| Resumo .....                                | 35        |
| 1. Introdução .....                         | 37        |
| 2. Material e Métodos .....                 | 39        |
| 3. Resultados .....                         | 49        |
| 4. Discussão .....                          | 57        |
| 5. Referências Bibliográficas .....         | 63        |
| <b>IV. Anexo .....</b>                      | <b>69</b> |

## **I-Revisão Bibliográfica**

O câncer se constitui na segunda causa mais freqüente de morte por doença no Brasil e o Instituto Nacional do Câncer, órgão do Ministério da Saúde, estimou em 472.050 novos casos no ano de 2006. O câncer de pele não melanoma (113 mil novos casos) tem a maior incidência na população brasileira, seguido pelos tumores de mama feminina (49 mil), próstata (46 mil), cólon e reto (26 mil), pulmão (26 mil), estômago (23 mil) e colo do útero (21 mil) (INCA, 2006). Além dos fatores genéticos envolvidos na gênese dos tumores, o estilo de vida da sociedade moderna contribui para aumentar a exposição a alguns fatores ambientais (nutricionais, químicos e hormonais) potencialmente carcinogênicos (INCA, 2006). Em alguns casos, o desenvolvimento do câncer está fortemente associado a um processo inflamatório crônico, que pode favorecer o crescimento de células tumorais devido à ação de citocinas diversas (Lin & Pollard, 2004; Lu et al., 2006). Além disso, fatores angiogênicos produzidos durante a inflamação ou pelas próprias células tumorais são responsáveis pela neovascularização, fenômeno fundamental para o desenvolvimento dos tumores sólidos (Balkwill & Mantovani, 2001).

Para combater as várias formas de câncer muitos medicamentos têm sido desenvolvidos e a manipulação do sistema imune para a prevenção/terapia antitumoral continua a ser uma área aberta para novos estudos. O aumento na incidência e na mortalidade por câncer tem estimulado a busca de métodos terapêuticos em várias direções mas apesar do avanço tecnológico e desenvolvimento de novas drogas, muitos pacientes continuam a buscar a solução para suas enfermidades nas terapias alternativas e no uso de “produtos naturais”, fenômeno observado também em países desenvolvidos como os Estados Unidos e Alemanha (Ernst & Cassileth, 1999; Cassileth & Vickers, 2005). Entre os chamados “produtos naturais”, várias espécies de cogumelos comestíveis e medicinais

têm sido exploradas quanto ao seu potencial antitumoral (Kidd, 2000; Wasser et al., 2002; Sullivan et al., 2006), especialmente devido a sua comprovada capacidade de modulação da resposta imune. De fato, a maioria dos basidiomicetos, contêm polissacarídeos biologicamente ativos que apresentam diferentes composições químicas, sendo a  $\beta$ -glucana o grupo de polissacarídeos mais estudado (Wasser et al., 2002; Lull et al., 2005). Assim, há relatos de que complexos polissacarídicos provenientes dos cogumelos *Tricholoma mongolium* e *Flammulina velutipes*, são capazes de induzir proliferação de linfócitos esplênicos *in vitro* e exibem potente atividade antitumoral contra sarcoma 180 *in vivo* (Wang et al., 1996a; Leung et al., 1997). A atividade antitumoral e imunoestimulante também têm sido atribuída a polissacarídeos obtidos de outros cogumelos como o *Ganoderma lucidum* (Zhang & Lin, 1999), *Phellinus linteus* (Kim et al., 1996; Han et al., 1999) e especialmente *Lentinus edodes* (Masihi et al., 1997; Liu et al., 1998).

Pesquisas extensivas sobre complexos polissacarídicos de cogumelos têm contribuído para a aplicação de algumas espécies na medicina (Vicent et al., 1999; Sullivan et al., 2006), entre elas o *Agaricus blazei* ss. Heinem. Esse basidiomiceto comestível é popularmente conhecido como cogumelo do sol® e 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 possíveis propriedades medicinais. Com base nas diferenças morfológicas do corpo de frutificação encontradas entre o espécime cultivado no Brasil e a amostra originalmente descrita como *A. blazei*, Wasser et al. (2002), propuseram sua classificação como espécie distinta, denominada *A. brasiliensis*, nomenclatura já adotada por alguns pesquisadores.

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)- $\beta$ -glicopiranosil (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).

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 não tem sido relatada ação citotóxica direta desses produtos. Neste sentido, Ito et al. (1997) observaram que o complexo protéico-polissacarídico isolado, denominado ATOM (antitumor organic substance Mie) não apresenta atividade citotóxica direta contra diferentes linhagens de células tumorais testadas. O que se observa é que produtos do cogumelo *A. blazei* têm a capacidade de estimular mecanismos imunológicos como a atividade fagocítica de macrófagos (Ito et al., 1997), atividade NK (Ito et al., 1997; Fujimiya et al., 1998; Kaneno et al., 2004a) e CTL de camundongos (Ebina & Fujimiya., 1998). Em modelo de tumor murino, Itoh et al. (1994) analisaram linfócitos esplênicos por citometria de fluxo observando aumento relativo de células T (CD3<sup>+</sup>) e T-auxiliares (CD4<sup>+</sup>) nos animais com tumor que foram tratados com complexo protéico (1→6)  $\beta$ -D-glucana

(FIII-2b) extraído do cogumelo *A. blazei*. Fenômeno semelhante foi observado em animais tratados com extrato hidrossolúvel desse cogumelo (Mizuno et al., 1998). Deste modo, polissacarídeos do *A. blazei* poderiam ser agentes profiláticos efetivos, protegendo o hospedeiro contra o câncer, pela estimulação de linfócitos. Ao contrário, Nakajima et al. (2002), não encontraram diferenças significativas nas percentagens de células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD19<sup>+</sup>, mas demonstraram que o extrato hidrossolúvel obtido em água quente induz aumento da produção de anticorpos, de população de células MAC-1<sup>+</sup> e CD25<sup>+</sup>, sugerindo que este extrato pode ser um estimulador efetivo para células T e macrófagos induzindo a produção de IL-1 $\beta$  e IL-6 que estão associados a diferenciação de células B em células produtoras de anticorpos.

Proteoglicanas ácido-solúveis (ATF) isoladas de basidiocarpos protegem animais contra o desenvolvimento do fibrossarcoma Meth A, quando inoculados *in situ*. Esse tratamento confere ainda proteção contra o desenvolvimento de células tumorais inoculadas subsequente em local distante do sítio primário (Fujimiya et al., 1998; Ebina & Fujimiya, 1998; Fujimiya et al., 1999), sugerindo que o tratamento *in situ* confere proteção sistêmica. Os autores sugerem que a inibição do desenvolvimento tumoral deve-se à estimulação da atividade NK, evidenciada pelo aumento de células NK1.1<sup>+</sup> no infiltrado intratumoral e à geração de células citotóxicas específicas, uma vez que esplenócitos apresentam atividade lítica contra células tumorais singênicas (Meth A). Além disso, observaram que a fração ATF induz apoptose nas células tumorais *in vitro*, caracterizada pela fragmentação de DNA e expressão do marcador Apo 2.

Embora numerosos estudos experimentais sobre a atividade antitumoral de polissacarídeos, (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucanas, complexos protéico-glucana,  $\alpha$ -glucana e heteroglucanas do cogumelo *A. blazei* tenham sido realizados (Kawagishi et al., 1989; Itoh

et al., 1994; Ito et al., 1997; Fujimiya et al., 1998; Mizuno et al., 1998; Fujimiya et al., 1999; Wasser & Weis, 1999; Ohno et al., 2001), apenas recentemente foram avaliados em situações clínicas controladas. Observou-se que o consumo de *A. blazei* por pacientes com câncer ginecológico resultou em aumento da atividade de células NK e na melhora dos efeitos colaterais causados pela quimioterapia (Ahn et al., 2004). Além disso, o extrato aquoso de *A. blazei* também modula a produção de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  por células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis (Kuo et al., 2002; Kasai et al., 2004; Bernardshaw et al., 2006).

Pouco se sabe dos efeitos de *A. blazei* sobre a produção de citocinas e, neste aspecto, Nakajima et al. (2002), observaram que o extrato aquoso deste cogumelo aumenta a expressão de mRNA de IL-6 e IL-1 $\beta$ , tanto em macrófagos peritoniais como em células esplênicas. Ellertsen et al. (2006) demonstraram que este mesmo extrato aquoso, rico em  $\beta$ -glucana, foi capaz de aumentar *in vitro* a expressão de mRNA de IL-1 $\beta$ , IL-8 e TNF- $\alpha$  por monócitos humanos. Frações etanólicas de *A. blazei*, preparadas em diferentes concentrações, foram capazes de induzir *in vitro* a produção de TNF- $\alpha$  e IL-8 por macrófagos da medula óssea de ratos (Sorimachi et al., 2001). Zhong et al. (2005) demonstraram que frações etanólicas de *A. blazei*, extraídas em água gelada ou em água quente, podem induzir *in vitro* o aumento da atividade de células NK e a produção de TNF- $\alpha$  por células esplênicas de camundongos C57BL/6. Os autores observaram que extratos obtidos em temperaturas mais baixas, apresentam maior intensidade de efeito sobre os parâmetros avaliados, fato também observado por nosso grupo em relação a extratos aquosos de *L. edodes* em camundongos BALB/c (Kaneno et al., 2004b). Outros autores observaram que uma fração hidrossolúvel de *A. blazei*, administrada por via oral, é capaz

de inibir o crescimento do fibrossarcoma Meth A em camundongos BALB/c, atribuída ao aumento da atividade das células NK e da produção de IFN- $\gamma$  (Takimoto et al., 2004).

Citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 e IL-12 apresentam grande potencial antitumoral, como demonstrado por experimentos *in vivo* e *in vitro*, tanto em modelos experimentais quanto clínicos (Mocelin et al., 2001). Neste sentido, há relatos de que o TNF- $\alpha$  produzido localmente em altas concentrações ativa macrófagos e pode apresentar citotoxicidade direta sobre o endotélio vascular tumoral, induzindo também apoptose e necrose das células tumorais (Watanabe et al., 1988; Tracey, 1994; Wilson & Balkwill, 2002). Por outro lado, observa-se que embora o TNF- $\alpha$  em altas concentrações iniba a angiogênese, quando a produção de TNF- $\alpha$  passa a ser crônica e em baixos níveis, esta citocina pode inibir enzimas de reparo e agir como fator de crescimento para as células tumorais (Balkwill, 2006, Salazar-Onfray et al., 2007). O TNF- $\alpha$  pode ter sua ação potencializada pelo IFN- $\gamma$ , e quando atua em sinergismo com esta citocina, regula negativamente a angiogênese, através da diminuição da expressão de  $\alpha V\beta 3$  integrina nas células endoteliais, resultando no desprendimento e apoptose destas células (Ruegg et al., 1988).

Monócitos e macrófagos podem ser as primeiras células produtoras de IL-6 na inflamação. A ação da IL-1 e do TNF sobre fibroblastos e células endoteliais também induzem a produção de IL-6 por estas células. Entre os efeitos imunoestimulantes mais importantes da IL-6 na resposta antitumoral, observa-se o aumento no número de células T citolíticas (Okada et al., 1988), muitas vezes em sinergismo com IL-1 (Houssiau & Van Snick, 1992) e a inibição da produção de fatores de angiogênese durante a resposta inflamatória como o bFGF e VEGF (Seung et al., 1999). A expressão da IL-6 em estágios mais avançados da tumorigênese, está associada a progressão tumoral e diminuição da

sobrevida de pacientes com melanomas malignos cutâneo (Moretti et al., 2001). Essa citocina pode ativar a proliferação de diferentes tipos celulares, participando na indução do crescimento tumoral, metástases e resistência de uma variedade de células tumorais à quimioterapia (Salazar-Onfray et al., 2007). Assim, a inibição ou estimulação da proliferação de células tumorais pela IL-6 dependem do tipo celular e da presença ou ausência de IL-6R (Tripathi et al., 2003).

Outra citocina produzida em resposta aos tumores é o IFN- $\gamma$ , produzido principalmente pelas células NK e linfócitos Th1 (Ikeda et al., 2002). O IFN- $\gamma$  ativa os linfócitos T promovendo sua diferenciação para Th1, aumenta a citotoxicidade das células NK, ativa as células endoteliais para adesão de linfócitos T, potencializa o efeito do TNF- $\alpha$  sobre as células endoteliais e ainda apresenta atividade antiproliferativa direta sobre células tumorais e propriedades anti-angiogênicas (Kaplan & Schreiber, 1999). Entre os tumores humanos, tem sido demonstrada a expressão de altos níveis de IFN- $\gamma$  nos casos de regressões espontâneas de carcinomas primários de célula basal (Wong et al., 2000) e melanoma (Lowe et al., 1997). *In vitro*, a citotoxicidade dos linfócitos T infiltrantes isolados de melanoma (Hom et al., 1993) ou dos cânceres de ovário e bexiga (Goedegebuure et al., 1997) está associada a citocinas do perfil Th1 e altos níveis de expressão de IFN- $\gamma$ . 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 a níveis elevados de IFN- $\gamma$  (Gollob et al., 2000). No modelo murino de carcinoma oral de células escamosas, a regressão tumoral induzida por IL-2 é dependente de IFN- $\gamma$ , pois o mesmo não ocorre em animais “knock out” de genes que codificam IFN- $\gamma$  (Thomas et al., 2000).

Por outro lado, estudos têm demonstrado que a inibição de funções protetoras do sistema imune pode também facilitar o escape tumoral. Neste aspecto, observou-se que uma variedade de células tumorais pode induzir a produção de níveis consideráveis de citocinas imunossupressoras incluindo TGF- $\beta$  e IL-10 (Khong & Restifo, 2002).

A IL-10, é uma potente citocina imunossupressora, produzida por linfócitos T, macrófagos, queratinócitos e linfócitos B e, apresenta como principais ações biológicas a supressão da atividade de macrófagos (por exemplo, apresentação de antígenos e atividade microbicida), inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, inibição da proliferação de linfócitos B e da secreção de imunoglobulinas (Moore et al., 2001). Alguns autores têm demonstrado que a 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). Em modelo de melanoma murino, observou-se o aumento de células NKDX5<sup>+</sup> e TCD4<sup>+</sup> produtoras de IL-10 associado a uma drástica diminuição de células produtoras de IFN- $\gamma$  durante a progressão tumoral (Wei et al., 2005). Por outro lado, na presença de IL-2, a IL-10 pode promover a proliferação de células T CD8<sup>+</sup> ativadas (Groux et al., 1998) e a atividade de células NK pode ser aumentada por sua combinação com IL-18 (Cai et al., 1999), indicando que o efeito da citocina depende tanto das características do próprio tumor, como do perfil global da resposta instituída pelo hospedeiro.

O TGF- $\beta$  foi definido originalmente pela habilidade de induzir transformação em células não neoplásicas em cultura (De Larco & Todaro, 1978) e pode tanto suprimir quanto aumentar a carcinogênese (Wakefield & Roberts, 2002). Essa citocina possui potente ação

quimiotática para monócitos do sangue periférico (Wahl et al., 1987), bem como para linfócitos e neutrófilos (Roberts, 1998). Plaquetas e linfócitos são fontes desta citocina multifuncional, que regula os processos de proliferação e diferenciação celulares (Pasche, 2001) e inibe o crescimento da maioria das células normais e malignas de origem epitelial, endotelial e linfóide (Roberts et al., 1985). Entretanto, em estágios avançados da tumorigênese as células tumorais tornam-se resistentes ao controle devido à inativação de genes de um ou mais componentes envolvidos na sinalização do TGF- $\beta$  (Pasche, 2001). Wojtowicz-Pagra (2003) relatou que a maioria dos tumores malignos expressa TGF- $\beta$ , que exerce ação imunossupressora e reduz a imunovigilância, favorecendo o crescimento tumoral e a ocorrência de metástases. Nesse sentido, estudos têm demonstrado a habilidade deste fator de crescimento em inativar células NK e células LAK, provavelmente pela inibição da secreção de TNF- $\alpha$  e  $\beta$  (Naganuma et al., 1994; Chao et al., 1995). Um papel importante dessa citocina está em sua capacidade de induzir a angiogênese tumoral, através da potencialização da ação angiogênica do FGF-2 (Moretti et al., 1997) e indução de matriz extracelular no estroma tumoral, regulando positivamente a expressão de moléculas de adesão como as  $\beta$ -integrinas (Rizzino, 1988). O TGF- $\beta$  pode ainda favorecer a angiogênese pela indução da expressão de VEGF por células tumorais (Loureiro & D'Amore., 2005).

O VEGF é um dos fatores angiogênicos mais importante, pois pode induzir tanto a angiogênese fisiológica, como a patológica, atuando como potente mitógeno de células endoteliais (Ferrara & Davis-Smyth, 1997). Esse fator é essencial para a mobilização de células endoteliais precursoras derivadas da medula óssea (Asahara et al., 1999) e pode modular a migração das células endoteliais (Rousseau et al., 2000) para a geração de novos vasos. Além disso, aumenta a permeabilidade vascular (Senger et al., 1983), estimula a expressão endotelial do ativador do plasminogênio (Pepper et al., 1991) e

metaloproteinases da matriz (Unemori et al., 1992), as quais estão envolvidas na degradação da matriz extracelular e conseqüente migração das células endoteliais. Leek et al. (1999) observaram que células de carcinoma de mama expressam VEGF em resposta a citocinas como TNF, IL-1 e IL-6 produzidas por macrófagos associados ao tumor (TAM). Além disso, esses macrófagos podem produzir TGF- $\beta$ 1 que, por si só, pode induzir a angiogênese, bem como induzir a produção de VEGF. Células do tumor de Ehrlich liberam substâncias com atividade semelhante ao TGF- $\beta$ , mas não possuem receptores específicos para tal substância, sugerindo que sua função pode estar relacionada ao controle negativo das células de defesa (Elexpuru et al., 1997).

Diferentemente do VEGF, o FGF-2 tem ação pleiotrópica, estimulando o crescimento tanto de células endoteliais, como de células da musculatura lisa, fibroblastos e células tumorais (Folkman & Shing., 1992). Além de estimular o crescimento, este fator pode degradar a membrana basal pela ativação de collagenases, gelatinases e proteases (Vlodavsky et al., 1990), uma ação extremamente importante para que as células tumorais consigam invadir o tecido do hospedeiro.

Em relação aos efeitos antiangiogênicos dos cogumelos medicinais, foi observado que polissacarídeos extraídos de diferentes tipos de cogumelos exercem efeito supressor sobre a expressão de VEGF, resultando em redução da formação de novos vasos no ambiente tumoral (Chen et al., 2005). Neste sentido, alguns autores demonstraram que o ergosterol isolado de uma fração lípidica do cogumelo *A. brasiliensis* inibe a angiogênese induzida por tumores sólidos (Zaidman et al., 2005).

Dentre os modelos de tumores transplantáveis o tumor de Ehrlich tem sido extensamente aplicado na pesquisa oncológica experimental, devido ao fácil manuseio e ao elevado índice mitótico e de invasividade que caracterizam essa neoplasia,

constituindo assim, excelente instrumento para o entendimento do comportamento dos tumores malignos (Dawe, 1982).

O tumor de Ehrlich é originário de tumor mamário espontâneo de camundongo, não-metastático, descrito pela primeira vez por Ehrlich & Apolant (1905). Esse tumor foi mantido em animais de experimentação pelo transplante sucessivo no tecido subcutâneo. E estudos posteriores demonstraram que as células do tumor de Ehrlich eram capazes de crescer em suspensão no fluido ascítico (Loewenthal & Jahn, 1932). Essas células são capazes de se desenvolver em qualquer linhagem de camundongo, não sendo afetadas pela incompatibilidade entre antígenos do MHC e não regredem espontaneamente (Sigiura et al., 1965; Carry et al., 1979; Fecchio et al., 1990a), mostrando-se bastante resistente aos mecanismos de defesa do hospedeiro.

Uma das características principais do tumor de Ehrlich é que não induz resposta inflamatória em camundongos quando presente na forma ascítica (Fecchio et al., 1990b). Contrariamente, Da Silva et al. (2002) observaram que a implantação do tumor de Ehrlich na forma ascítica induz um perfil pró-inflamatório de resposta imune, aumentando a produção de IL-6, e TNF- $\alpha$  por macrófagos, mas também de IL-10. Alguns autores demonstraram que esse tumor induz angiogênese associada à produção de VEGF resultando em aumento do número de células tumorais (Sheela et al., 2006; Teixeira et al., 2006).

O tumor de Ehrlich, além de induzir a produção de fatores angiogênicos, tem efeito supressivo sobre células esplênicas tanto *in vivo* como *in vitro*. Assim, Segura et al., (2000) observaram uma resposta aguda e rápida das populações de células esplênicas de camundongos com tumor ascítico, caracterizada por diminuição de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, e aumento de outras populações esplênicas como macrófagos e células derivadas da medula óssea (CD18). Segura et

al. (1997) demonstraram que nos primeiros dias de implantação do tumor que os linfócitos Th esplênicos do hospedeiro apresentam-se drasticamente diminuídos. Essa redução é acompanhada por uma queda no número de células  $CD4^+$  secretoras de IFN- $\gamma$ . Outros autores observaram que na fase inicial de desenvolvimento do tumor na forma ascítica ocorre um aumento na produção de IFN- $\gamma$ , mas não de IL-2, observando-se uma severa diminuição nos níveis dessas citocinas durante o crescimento tumoral, com aumento concomitante dos níveis de IL-10 (Valadares et al., 2004).

Observa-se ainda que o crescimento ascítico do tumor induz efeito supressivo sobre as células progenitoras da medula óssea (GM-CFU), fenômeno que está associado ao aumento do número dessas colônias no baço com conseqüente esplenomegalia (Queiroz et al., 2001; Valadarez et al., 2004).

Em estudo prévio, observamos que uma fração polissacarídica do cogumelo *A. brasiliensis* inoculada no sítio de implantação tumoral, é capaz de inibir o crescimento do tumor de Ehrlich. Na análise histopatológica do tecido tumoral desses animais observamos, no grupo controle, presença de células neoplásicas gigantes e numerosas figuras mitóticas, enquanto nos animais tratados com a fração ATF (Ehr/ATF), observou-se ausência dessas células, menor frequência de figuras mitóticas, e maior quantidade de figuras apoptóticas (dados não publicados). Esse estudo permitiu a observação de que animais com tumor subcutâneo de Ehrlich possuem células esplênicas com maior potencial de produção de IL-10, à semelhança do que se observou no tumor ascítico (Da Silva et al., 2002; Valadares et al., 2004). Visto que essa citocina é capaz de inibir a ação de IFN- $\gamma$  e IL-12, a função da IL-10 poderia ser o controle negativo das células de defesa do hospedeiro, indicando a possível ativação de células T regulatórias (Asseman et al., 1999; Khong & Restifo, 2002).

Considerando nossos achados prévios de que: a) o tratamento *in situ* do tumor subcutâneo de Ehrlich com a fração ATF retarda significativamente o crescimento tumoral, b) o tratamento reverte parcialmente a produção de IL-10 induzida pelo tumor e c) a ação antitumoral não está associada a um efeito linfoproliferativo sobre as células do baço e nem a um efeito citotóxico direto, o presente estudo foi formulado para testar **a hipótese de que o tratamento com ATF promove migração seletiva de células imunocompetentes para o sítio tumoral, estabelecendo, através da produção de citocinas pró-inflamatórias e/ou de fatores antiangiogênicos, um microambiente menos favorável ao desenvolvimento do tumor.**

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar as alterações induzidas pela fração ATF sobre o perfil de citocinas produzidas pelas células infiltradas no tumor, a produção *in situ* de fatores angiogênicos e a caracterização do infiltrado tumoral.

## I-Referências Bibliográficas\*

Ahn WS, Kim DJ, Chae GT, Lee JM, Bae SM, Sin JI et al. Natural killer cell activity and quality of life were improved by consumption of a mushroom extract, *Agaricus blazei murill* Kyowa, in gynecological cancer patients undergoing chemotherapy. Int J Gynecol Cancer. 2004; 14:589-94.

Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. EMBO J. 1999;18:3964-72.

Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation..J Exp Med 1999; 190: 995-1004.

Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? Lancet. 2001;357:539-45.

Balkwill F. TNF- $\alpha$  in promotion and progression of cancer. Cancer Metastasis Rev; 2006;25:409-16.

Bernardshaw S, Hetland G, Ellertsen LK, Tryggestad AMA, Johnson E. An extract of the medicinal mushroom *Agaricus blazei murill* differentially stimulates production of pro-inflammatory cytokines in human monocytes and human vein endothelial cells *in vitro*. Inflammation. 2006; 29 (4-6):147-53.

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.

\* Referências bibliográficas segundo estilo dos Requisitos Uniformes para Originais submetidos a Revistas Biomédicas (estilo Vancouver), elaborado pelo Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (ICMJE). Annu Inter Med 1997; 126: 36-47.

- Chao CC, Hu S, Sheng WS, Tsang M, Peterson PK. Tumor necrosis factor-alpha mediates the release of bioactive transforming growth factor-beta in murine microglial cell cultures. Clin Immunol Immunopathol. 1995; 77:358-65.
- Carry PJ, Prescott DM, Ogilvie GK. Resistance to Ehrlich ascites tumor in a strain of dystrophic mice. Cancer Res 1979; 39: 2130-40.
- Cassileth Br & Vickers AJ. High prevalence of complementary and alternative medicine use among cancer patients: implications for research and clinical care. J Clin Oncol. 2005; 23:2590-92.
- Chen CS, Lu MK J-J Cheng, Wang DL. Antiangiogenic activities of polyssacharides isolated from medicinal fungi. FEMS Microbiol Lett. 2005; 249: 247-54.
- Da Silva RJ, Da Silva MG, Vilela LC, Fecchio D. Cytokine profile of Ehrlich ascites tumor treated with Bothrops jararaca venom. Mediators Inflamm. 2002; 11(4):197-201.
- Dawe CJ. Comparative neoplasia. In: HOLLAND, J. F. & FREI III, E. Cancer medicine. 2. ed. Philadelphia : Lea & Febiger, 1982. p. 209.
- De Larco JE, Todaro GJ. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1978; 75: 4001-5.
- 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: 259-65.
- Elexpuru 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.

- Ellertsen LK, Hetland G, Johnson E, Grinde B. Effect of a medicinal extract from *Agaricus blazei* Murill on gene expression in a human monocyte cell line as examined by microarrays and immuno assays. *Int Immunopharmacol*. 2006; 6(2): 133-43.
- Ehrlich P, Apolant H. Beobachtungen uber maligne mausetumoren. *Berl Klin Wsch* 1905; 28: 871-74.
- Fecchio D, Sirois P, Russo M, Jancar S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. *Inflammation* 1990a;14(1):125-32.
- Fecchio D, Russo M, Sirois P, Braquet P, Jancar S. Inhibition of Ehrlich ascites tumor *in vivo* by PAF-antagonists. *Int J Immunopharmacol* 1990b; 12:57-65.
- Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endoc Rev*. 1997;18:4-25.
- Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem*. 1992;267:10931-4.
- 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.
- Goedegebuure PS, Douville CC, Doherty JM, Linehan DC, Lee KY, Ganguly EK et al. 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<sup>+</sup> T cells. J Immunol. 1998; 178: 3188-93.
- Han SB, Lee CW, Jeon YJ, Hong ND, Yoo ID, Yang K-H et al. The inhibitory of polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* on tumor factor growth and metastasis. Immunopharmacol. 1999; 41:157-6.
- Hom SS, Schwartzentruber 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.
- Houssiau F, Van Snick J. IL6 and the T-cell response. Res Immunol. 1992; 143: 740-43.
- Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN- $\gamma$  in protection against tumor development and cancer immunoeediting. Cytokine Growth Factor Rev. 2002; 13: 95-109.
- Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. São Paulo, 2006. Disponível: <http://www.inca.org.br>.
- 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 $\rightarrow$ 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.

- Kaneno R, Fontanari LM, Santos SA, Di stasi LC, Rodrigues Filho E, Eira AF. Effects of extracts from Brazilian sun-mushroom (*Agaricus blazei*) on the NK activity and lymphoproliferative responsiveness of Ehrlich tumor-bearing mice. Food Chem Toxicol. 2004a; 42:909-16.
- Kaneno R, AVFS Belik, Frantz FG, Lorenzo JSF, Fontanari LM , Castoldi L et al. Antitumor and Immunomodulatory Effects of Culinary-Medicinal Shiitake Mushroom *Lentinus edodes* (Berk.) Singer: Analysis of NK Activity, Lymphoproliferative Response, and Antibody Production. Int J Med Mushr 2004b; 6:315-325.
- Kaplan DH & Schreiber RD. In: Theze J, The cytokine Network and Immune Functions. New York: Oxford University Press; 1999. p.111-24.
- Kasai H, He LM, Kawamura M. IL-12 Production induced by *Agaricus Blazei* fraction H(ABH) involves Toll-Like Receptor (TLR). Evid Based Complement Alternat Med. 2004; 1: 259-67.
- Kawagishi H, Inagaki R, Kanao T, Mizuno T, Shimura K, Ito H. 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 a (1→6)-β-D-glucan-protein complex from *Agaricus blazei* Murill fruiting bodies and antitumor activity of resulting products. Carbohydr Polymers. 1990; 12: 393-403.
- Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of tumor escape phenotypes. Nat Immunol. 2002; 3:999-1005.
- 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.
- Kruger-Krasagakes S, Krasagakis K, Garbe C, Schmitt E, Huls C, Blankenstein T, Diamantstein T. Expression of interleukin 10 in human melanoma. Br J Cancer. 1994; 70: 1182-85.
- Kuo YC, Huang YL, Chen CC, Lin YS, Chuang KA, Tsai WJ. Cell cycle progression and cytokine gene expression of human peripheral blood mononuclear cells modulate by *Agaricus blazei*. J Lac Clin Med. 2002; 140:176-87.
- Leek RD, Landers RJ, Harris AL, Lewis CE. Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. Br J Cancer. 1999; 79: 991-5.
- 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.
- Lin EY, Pollard JW. Role of infiltrated leucocytes in tumour growth spread. Br J Cancer. 2004 ;90:2053-8.
- Liu M, Kong F, Gao Y. Induction of immunomodulating cytokine by a new polyssacharide-peptide complex from culture mycelia of *Lentinus edodes*. Immunopharmacol. 1998; 40:187-98.
- Loureiro RMB, D'Amore PA. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor in cancer. Cytokine Growth Factor Rev. 2005;16:77-89.

Loewenthal H, Jahn G. Übertragungsversuche mit carcinomatöser Mause-Ascitesflüssigkeit und ihr Verhalten gegen physikalische und Chemische Einwirkungen. Ztschr F Krebsforsch, 37:439, 1932.

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.

Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development. Mol Cancer Res. 2006;4:221-33.

Lull C, Wichers HJ, Savelkoul HFJ. Antiinflammatory and Immunomodulating properties of fungal metabolites. Mediators of Inflammation. 2005; 2: 63-80.

Masihi KN, Madja K, Hintelmman H, Gast G, Kaneko Y. Down-regulation of tumor necrosis factor- $\alpha$ , moderate reduction of interleukin-1 $\beta$ , 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 T-cell subsets in mice. Biosci Biotechnol Biochem. 1998; 62: 434-37.

- Mocelin S, Wang E, Marincola FM. Review: Cytokines and immune response in the tumor microenvironment. J. Immunotherapy. 2001; 24: 392-407.
- Moore KW, Malefyt RW, Coffman RL, Garra AO. Intrleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu Rev Immunol 2001; 19:683-765.
- Moretti S, Pinzi C, Berti E, Sapllanzani A, Chiarugi A, Boddt V et al. In situ expression of transforming growth factor  $\beta$  is associated with melanoma progression and correlates with Ki67, HLA-DR and  $\beta 3$  integrin expression. Melanoma Res. 1997; 7:313-21.
- Moretti S, Chiarugi A, Semplici F, Salvi A, De Giorgi V, Fabbri P, et al. Serum imbalance of cytokines in melanoma patients. Melanoma Res. 2001;11:395-9.
- Naganuma H, Sasaki A, Satoh E, Nagasaka M, Nakano S, Isoe S et al. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha and -beta secretion by lymphokine activated killer cells by transforming growth factor-beta. Jpn J Cancer Res. 1994; 85:952-7.
- 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  $\beta$ -glucan the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. Biol Pharm Bull. 2001; 24: 820-28.
- Okada M, Kitahara M, Kishimoto S, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T. IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells. J Immunol. 1988; 141(5): 1543-49.

- Pasche B. Role of transforming growth factor beta in cancer. *J Cell Physiol.* 2001; 186:153-68.
- Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;181:902-6.
- 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.
- Queiroz MLS, Justo GZ, Valadares MC, Pereira-da-Silva FRR, Muller AH. Evaluation of Caesalpinia férrea extract on bone marrow hematopoiesis in the murine models of listeriosis and Ehrlich ascites tumor *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2001; 23:215-28.
- Rizzino A. Transforming growth factor- $\beta$ : multiple effects on cell differentiation and extracellular matrices. *Dev Biol.* 1988;130: 411-22.
- Roberts AB, Anzano MA, Wakefield LM, Roche NS, Stern DF, Sporn MB. Type  $\beta$  transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985;89:119-23.
- Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF- $\beta$ . *Mincr Electrolyte Metab.* 1998;24:111-9.
- Rousseau S, Houle F, Huot J. Integrating the VEGF signals leading to actin-based motility in vascular endothelial cells. *Trends Cardiovasc Med.* 2000; 10:321-27.
- Ruegg C, Yilmaz A, Bieler G, Bamat J, Chaubert P Evidende for the involvement of endothelial cell integrins  $\alpha$ V $\beta$ 3 in the disruption of the tumor vasculature induced by TNF and IFN-gamma. *Nat Med.* 1988;4:408-14.

- Salazar-Onfray F, López NM, Mendonza-Naranjo A. Paradoxical effects of cytokines in tumor immune surveillance and tumor immune escape. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007; 18:171-182.
- Sato T. Active specific immunotherapy with hapten-modified autologous melanoma cell vaccine. *Cancer Immunol Immunother.* 1996; 43: 174-9.
- 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.
- Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 1983; 219: 983-5.
- 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.
- Sheela ML, Ramakrishna MK, Salimath BP. Angiogenic and proliferative effects of the cytokines VEGF in Ehrlich ascites tumor cells inhibited by *Glycyrrhiza glabra*. *Inter Immunopharmacol.* 2006; 6:494-98.
- Sigiura K. Tumor transplantation. In: Gray W I. Methods of animal experimentation. Acad Press NY: London; 1965. p.171-222.
- Sorimachi K, Akimoto K, Ikehara Y, Inafuku K, Okubo A, Yamazaki S. Secretion of TNF- $\alpha$ , IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei* murril fractions *in vitro*. *Cell structure and function.* 2001; 26:103-08.

- Sullivan R, Smith JE, Rowan NJ. Medicinal mushrooms and cancer therapy. *Perspect Biol Med.* 2006; 49:159-70.
- Takimoto H, Wakita D, Kawaguchi K, Kumazawa Y. Potentiation of cytotoxic activity in naïve and tumor-bearing mice by oral administration of hot-water extracts from *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Biol Pharm Bull.* 2004; 27(3):404-06.
- Teixeira AS, Araújo FA, Ferreira MAND, Barcelos L S, Teixeira MM, Andrade SP. Angiogenesis and inflammation in skeletal muscle in response to ascites tumor mice. *Life Sciences.* 2006; 78:1637-45.
- 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.
- 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.
- Trikha M, Corringham R, Klein B, Rossi JF. Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: a review of the rationale and clinical evidence. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4653-65.
- Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA, Amento EP. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol.* 1992;153:557-62.

- Valadares MC, Klein SI, Guaraldo AM, Queiroz LMS. Enhancement of natural killer cell function by titanocenes in mice bearing Ehrlich ascites tumor. *Eur J pharmacol.* 2004; 25:191-96.
- 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.
- Vicent EC, Ooi VEC, Liu F. A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides. *Int J Med Mushr.* 1999; 1:195-206.
- Vlodavsky I, Korner G, Ishai-Michaeli R, Bashkin P, Bar-Shavit R, Fuks Z. Extracellular matrix-resident growth factors and enzymes: possible involvement in tumor metastasis and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 1990;9:203-26.
- Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, et al. Transforming growth factor type  $\beta$  induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;84:5788-92.
- Wakefield LM, Roberts AB. TGF- $\beta$  signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 2002;12:22-9.
- 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.* 1996; 74: 95-100.
- Wasser SP, Weis AL. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: A modern perspective. *Critical Reviews Immunology.* 1999; 19: 65-96.
- Wasser SP, Diduck MY, Amazonas MLLA, Nevo E, Stamets P, Eira AF. Is a widely cultivated culinary-medicinal royal sun Agaricus (the himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* muril? *Intern J Medicinal Mush.* 2002; 4: 267-90.

- Watanabe N, Niitsu Y, Umeno H, Sone H, Neda H, Yamauchi N, et al. Synergistic cytotoxic and antitumoral effects of recombinant human tumor necrosis factor and hyperthermia. *Cancer Res.* 1988;48:650-3.
- Wei H, Zheng X, Lou D, Zhang L, Zhang R, Sun R et al. Tumor-induced suppression of interferon- $\gamma$  production and enhancement of interleukin-10 production by natural killer (NK) cells: paralleled to CD4<sup>+</sup> T cells. *Mol Immunol.* 2005; 42:1023-31.
- Wilson J., Balkwill F. The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment. *Cancer Biol.* 2002;12:113-20.
- Wojtowicz-Praga S. Reversal of tumor-induced immunosuppression by TGF- $\beta$  inhibitors. *Invest New Drugs.* 2003;21:21-32.
- Wong DA, Bishop GA, Lowes MA, Cooke b, Barnetson RS, Halliday GM. Cytokine profiles in spontaneously regressing basal cell carcinomas. *Br J Dermatol.* 2000; 143: 91-8.
- Zaidman B-Z, Yassin M, Mahajna J, Wasser SP. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005; 67: 453-68.
- Zhang Q-H, Lin Z-B. The antitumor activity of *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. (Ling Zhi) (Aphyllophoromycetideae) polysaccharides is related to tumor necrosis factor- $\alpha$  and interferon- $\gamma$ . *Int J Med Mushr.* 1999; 1: 207-15.
- Zhong M, Tai A, Yamamoto I. In vitro augmentation of natural Killer activity and interferon-gamma production in murine spleen cells with *Agaricus blazei*. *Biotechnol Biochem* 2005; 69(12): 2466-69.

**Atividade antitumoral e antiangiogênica da fração polissacarídica isolada do cogumelo *Agaricus brasiliensis*.**

**Andréa Vanessa Ferreira da Silva Pinto<sup>ab</sup>, Graziela Goreti Romagnoli<sup>ab</sup>, Ana Paula Campanelli<sup>c</sup>, Priscila Raquel Martins<sup>ab</sup>, Edson Rodrigues Filho<sup>d</sup>, Ramon Kaneno<sup>ab\*</sup>**

<sup>a</sup> Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil

<sup>c</sup> Departamento de Ciências Biológicas Disciplina de Microbiologia, Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Odontologia, Bauru, SP, Brasil

<sup>d</sup> Departamento de Química - Laboratório de Produtos Naturais, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), São Carlos, SP, Brasil

\* Autor correspondente

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: rskaneno@yahoo.com.br

**Resumo**

## Resumo

A ATF (fração ácido-tratada) é uma fração polissacarídica extraída do cogumelo *Agaricus brasiliensis* rica em (1→6)- $\beta$ -D-glucana, à qual se atribui ação imunoestimulante. No presente trabalho, avaliamos o efeito da ATF sobre a produção de citocinas, a expressão de mRNA de fatores angiogênicos e a infiltração de leucócitos no microambiente do tumor de Ehrlich, subcutaneamente implantado em camundongos BALB/c. O tratamento consistiu de 3 aplicações de ATF (0,5 mg/0,1mL) no sítio de implantação tumoral, seguido de sacrifício dos animais aos 7 ou 14 dias após a implantação do tumor. A massa tumoral foi removida para a obtenção das células infiltradas no tumor de Ehrlich e para análise do número de células secretoras de citocinas (ELISPOT). Foi realizada a análise dos fatores pró-angiogênicos pela técnica de PCR em tempo real e a presença *in situ* de células imunocompetentes, foi analisada através de microscopia confocal. Aos 7 dias observou-se maior número de células secretoras de IL-4 e IFN- $\gamma$  no grupo Ehr/ATF e aos 14 dias a capacidade de produção de IL-10 mostrou-se aumentada no grupo Ehr, fenômeno revertido pelo tratamento com a ATF, que induziu aumento no número de células produtoras de IFN- $\gamma$ . Esses achados são compatíveis com a observação de que os animais tratados com a ATF apresentaram marcação mais intensa para as células CD8<sup>+</sup> e Mac-3<sup>+</sup>. Em relação aos fatores angiogênicos, observamos que aos 7 dias, o tratamento inibiu a produção de FGF-2 no microambiente tumoral. Assim, concluímos que a ATF, através da indução da produção de IFN- $\gamma$ , foi capaz de reverter parcialmente a produção de IL-10 induzida pelas células tumorais, estabelecendo um microambiente menos favorável ao desenvolvimento do tumor.

**Palavras-chave:** *Agaricus brasiliensis*;  $\beta$ -glucana; tumor de Ehrlich; IL-10; IFN- $\gamma$ ; cogumelos medicinais.

## Abstract

The acid treated fraction (ATF) is a polysaccharidic (1-6)- $\beta$ -D-glucan-rich fraction obtained from *A. brasiliensis*, with putative immunostimulatory activity. The present study was undertaken to examine the effect of ATF on cytokine production and expression of mRNA of angiogenic factors in the microenvironment of subcutaneous Ehrlich tumor mass. BALB/c mice were subcutaneously inoculated with Ehrlich tumor cells (day zero), followed by in situ administration of sterile salt solution (group Ehr) or with 0,5 mg/0,1mL of ATF (group Ehr/ATF) on day 3, 4 and 5. These animals were sacrificed on the 7th or 14th day for evaluations. Tumor tissue was removed to obtain infiltrated cells and for analyze the number of cytokine producing cells (ELISPOT). The pro-angiogenic factor were analyzed by real time PCR and phenotype of infiltrated immunocompetent cells was analyzed by confocal microscopy. On the 7th day, increased number of IL-4 and IFN- $\gamma$ -producing cells was observed in the Ehr/ATF group. On the 14th day Ehr group showed increased number of IL-10-producing cells, whereas this occurrence was avoided by treatment with ATF (Her/ATF). Treatment also increased the number of IFN- $\gamma$  producing cells in that time. These data are in accordance with the stronger labeling of tumor tissue for CD8 and Mac-3. Concerning to angiogenic factor, on the 7th day, the treatment decreased the FGF-2 mRNA expression by tumor tissue. In summary, our data allow us to conclude that ATF was able to partially reverse the production of IL-10 induced by tumor cells, through the induction of higher levels of IFN- $\gamma$ -producing cells, perhaps establishing a more efficient immunoresponsiveness against tumor.

## 1. Introdução

O consumo de cogumelos medicinais, como o *Agaricus brasiliensis* (*A. brasiliensis*), é uma prática popular freqüentemente empregada como terapia alternativa para prevenção ou tratamento de diferentes tipos de câncer. A maioria dos basidiomicetos contém polissacarídeos biologicamente ativos que apresentam diferentes compostos químicos, sendo a  $\beta$ -glucana o grupo de polissacarídeos mais estudado [1,2] quanto ao efeito antitumoral [3-9] em diferentes modelos de tumor murino.

A ação antitumoral dos cogumelos tem sido associada aos seus efeitos imunomodulatórios que incluem a ativação de células imunocompetentes como linfócitos [4,7], macrófagos [4] e células *natural killer* (NK) [6], resultando na produção de citocinas, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e as interleucinas 2, 8 e 12 (IL-2, IL-8 e IL-12) [2].

Alterações nos níveis de citocinas têm sido relatadas em estudos experimentais e clínicos de câncer, tanto *in vivo* como *in vitro* [10,11], observando-se que a infiltração de células imune/inflamatórias como macrófagos e mastócitos no microambiente tumoral, seguida da liberação de citocinas como TNF- $\alpha$ , VEGF, PDGF, TGF- $\beta$  e de enzimas proteolíticas que degradam a matriz extracelular podem agir como indutores da angiogênese [12] enquanto, por outro lado, citocinas como IL-4 [13], IFN- $\gamma$  [10] possuem atividade antiangiogênica. Em relação à resposta antitumoral, observa-se que na maioria dos casos as citocinas do perfil Th1, principalmente IFN- $\gamma$ , previnem a progressão tumoral, enquanto as citocinas produzidas por células Th2 podem favorecer o crescimento tumoral [14,15,16]. O IFN- $\gamma$  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- $\gamma$ , a atividade

antiproliferativa direta, a capacidade de ativação de macrófagos e sua propriedade antiangiogênica, são as atividades antitumorais mais relevantes [18].

Contrariamente, citocinas antiinflamatórias, como a IL-10 e o fator de crescimento e transformação beta (TGF- $\beta$ ), podem atuar como fatores supressores da resposta imunológica e favorecer o crescimento tumoral em determinadas situações [10,19] constituindo-se em mecanismos de escape das células tumorais [16]. De fato, alguns autores têm demonstrado que a IL-10 é produzida por uma variedade de tumores sólidos, favorecendo o seu desenvolvimento [20]. Em estudo prévio, observamos que o tratamento *in situ* do tumor subcutâneo de Ehrlich com a fração ATF reverte parcialmente a produção de IL-10 induzida pelo tumor, retardando significativamente o crescimento tumoral. Entretanto, observamos uma inibição na proliferação de esplenócitos desses animais, embora a ATF não apresentasse atividade citotóxica direta *in vitro* sobre células esplênicas, nem sobre células do tumor de Ehrlich. Considerando a ausência de atividade tóxica da ATF sobre as células tumorais, os resultados levaram-nos a hipotetizar que a ação antitumoral não se deve a um efeito direto, mas à estimulação de células imunocompetentes no microambiente tumoral, possivelmente através da produção de citocinas que modulam positivamente a resposta imune do hospedeiro.

Assim, o propósito deste estudo foi verificar se o tratamento com a fração ATF, administrada no sítio de implantação do tumor de Ehrlich subcutâneo, potencializa a migração seletiva de células imunocompetentes para o sítio tumoral, estabelecendo, através da produção de citocinas pró-inflamatórias e da redução da angiogênese, um microambiente menos favorável ao desenvolvimento do tumor.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Delineamento Experimental**

Camundongos BALB/c foram inoculados subcutaneamente com tumor de Ehrlich no dia zero (0) e receberam tratamento com 0,1 mL da fração ATF (grupo Ehr/ATF) ou solução salina (grupo controle Ehr) no sitio de implantação do tumor nos dias 3, 4, 5 após implante tumoral. Nos dias 7 ou 14 os animais foram sacrificados para remoção da massa tumoral e avaliação do infiltrado leucocitário. As células infiltradas foram obtidas por digestão enzimática do tecido tumoral e sua capacidade de produção de citocinas foi avaliada pela técnica de ELISPOT. As amostras foram também avaliadas por microscopia confocal quanto aos tipos celulares infiltrados e por PCR em tempo real, para detecção do mRNA de fatores angiogênicos.

## **2.2. Preparação da fração ácido-tratada solúvel de *A. brasiliensis* (ATF)**

A mistura das linhagens ABL 99/25, 99/28, 99/29 e 00/30 do cogumelo *A. brasiliensis* 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 800g do cogumelo, 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 Nessler.

O material foi então tratado com HCl 1 M, por 24 horas à temperatura ambiente. O pH foi então ajustado para 7,0 por adição de NaOH 1 M e o material particulado foi então removido por centrifugação. O sobrenadante foi filtrado em pré-filtros Millipore e liofilizado [6]. 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 reconstituída com solução salina à concentração de 5mg/mL. A presença de endotoxinas nessa amostra foi avaliada através do método de aglutinação de *Limulus polyphenus* E-toxate Kits (ET0200 Sigma-Aldrich CO), seguindo as recomendações do fabricante.

### 2.3. Caracterização química/bioquímica da ATF

A ressonância magnética nuclear (NMR) uni e bidirecional para a caracterização de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , foi utilizada para análise de compostos existentes na fração ATF [21]. A concentração de proteínas do ATF foi determinada pelo método de Lowry usando albumina bovina purificada como solução padrão [22]. A presença residual de oxalato de amônio foi avaliada através do método de descolorimento do permanganato de potássio. 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 $\mu\text{L}$  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 $\mu\text{L}$  de HCl 1N (pH 3-4) [23].

### 2.4. Animais

Os experimentos foram desenvolvidos utilizando-se camundongos machos da linhagem isogênica BALB/c com 45 dias de idade. Os animais foram provenientes do Centro de Bioterismo da USP e mantidos no Biotério do Departamento de Patologia-FMB, sob temperatura constante de 22 $^{\circ}\text{C}$ , ciclo claro/escuro 12/12horas 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 da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP (proc/nº 378).

## **2.5. 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 intraperitoniais em camundongos suíços. A viabilidade das células tumorais foi determinada através do teste de exclusão do azul de trypan, e a concentração foi ajustada para  $2 \times 10^8$ /mL, seguindo-se inoculação subcutânea de 0,1mL ( $2 \times 10^7$  células/animal) da suspensão.

## **2.6. Fragmentação do tecido tumoral pós-digestão enzimática**

Para cada grupo experimental foram preparadas 8 amostras, cada uma constituída da massa tumoral removida de 2 animais. O tecido tumoral foi fragmentado em placa de Petri contendo 3mL de meio RPMI 1640 e em seguida cada amostra foi incubada com 25µg de colagenase Tipo I (*Clostridium histolyticum* 240.0 unidades/mg – GIBCO) diluídos em 7mL de meio RPMI 1640 por 20 minutos à 37°C sob tensão constante de 5% de CO<sub>2</sub>. Após a digestão enzimática o material foi retirado da estufa e macerado levemente em peneira de *nylon* em condições estéreis, seguindo-se 2 lavagens com RPMI 1640 por 10 minutos a 150xg.

A viabilidade das células foi determinada através do teste de exclusão do azul de trypan e a suspensão foi ajustada para  $2 \times 10^6$  leucócitos/mL em meio de cultura RPMI 1640 completo (suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 2mM de L-glutamina). A produção de citocinas foi analisada pela reação de ELISA modificada para formação de pontos (ELISPOT), utilizando o conjunto de anticorpos específicos para cada citocina.

## **2.7. Determinação do número de células secretoras de citocinas pela técnica de ELISPOT**

O número de células secretoras de citocinas foi determinado por ELISPOT. Microplacas (Millipore Corp., Molsheim, France) de 96 cavidades com fundo de *Immulon* foram sensibilizadas com 100 µl do anticorpo de captura específico anti-IL-4, anti-IL-6, anti- IL-10, anti-TNF- $\alpha$  ou anti-IFN- $\gamma$  (BD Biosciences) diluídos em solução salina tamponada com sais de fosfato (PBS) estéril com pH 7,2 e incubadas “overnight” à 4°C. As placas foram mantidas em local escuro em todas as etapas de incubação.

Os sítios livres foram bloqueados com 200µL meio RPMI 1640 com 10% SBF por 2 horas à temperatura ambiente. As suspensões das células à concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL, mantidas em banho de gelo, foram adicionadas aos alvéolos em duplicatas (100µL/alvéolo). As células foram incubadas por 21 horas, à 37°C sob tensão constante de 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, as placas foram lavadas (2 vezes) com água deionizada e (3 vezes) com PBS contendo 10% SBF. Em seguida foram adicionados 100µL/alvéolo do anticorpo biotilado específico anti-citocina (BD Biosciences), diluídos em PBS com 10% SBF, seguindo-se 2 horas de incubação à temperatura ambiente. Após as lavagens subsequentes com PBS contendo 0,05% de tween 20 (PBS-T), foi adicionada estreptoavidina conjugada à peroxidase (estreptoavidina – HRP- BD Biosciences) na proporção de 1:100 em PBS com 10% SBF. Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, as placas foram lavadas (4 vezes) com PBS-T (2 vezes) e com PBS seguindo-se revelação com 100µL do substrato 3-amino-9-etilcarbazole (AEC Substrate Reagent Set for ELISPOT - BD Biosciences). Após 5 - 10 minutos, as placas foram lavadas com água corrente e deixadas à secar por 2 dias em ambiente escuro. A contagem das células produtoras de citocinas (“spots”) foi feita pelo Analisador de ImmunoSpot (BioSys

GmbH), no Laboratório de Imunologia do Centro de Pesquisas em Tuberculose, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

## **2.8. Avaliação da capacidade de produção de citocinas pelas células do tumor de Ehrlich**

Para avaliar a possível produção de citocinas pelas células do tumor de Ehrlich, utilizamos uma suspensão do tumor ascítico de Ehrlich, que foi submetida à depleção dos leucócitos com anticorpo monoclonal anti-CD45 de camundongos (BD Biosciences). Assim, as células tumorais foram colhidas da cavidade peritoneal de 2 camundongos suíços com tumor ascítico após 7 dias de implantação. A viabilidade das células tumorais foi determinada através do teste de exclusão do azul de trypan, e a concentração foi ajustada para  $2 \times 10^6$  células/mL. Cerca de 1,2 mL de cada amostra foram colocados em tubos eppendorf e centrifugado por 10 minutos a 340xg a 18°C. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 150µg do anticorpo anti-CD45 e mantidas em gelo por 30 minutos. A suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 340xg a 4°C, adicionando-se soro de coelho jovem diluído a 1:2 como fonte de complemento, seguindo-se incubação em banho-maria a 37°C durante 60 minutos. Em seguida a suspensão foi centrifugada 2 vezes por 10 minutos a 340xg e as células foram ressuspensas em 1,2 mL de meio RPMI completo. Após a verificação da viabilidade das células pelo teste de azul de trypan. As mesmas foram então, distribuídas em microplacas de *Immulon* (Millipore Corp. Molshein, France) depositando-se  $2 \times 10^5$  células/alvéolo (100µL), para avaliação do número de células secretoras de citocinas através do método de ELISPOT.

## 2.9. Imunofluorescência e análise por confocal

As reações de imunofluorescência para detecção de células T CD4 e CD8 e de macrófagos (MAC-3<sup>+</sup>) foram realizadas em tumor de Ehrlich após 7 e 14 dias de implantação em camundongos da linhagem BALB/c. Os cortes de 6µm de material criopreservado foram dispostos em lâminas de vidro previamente tratadas com poli-L-lisina e fixados em acetona gelada por 1 minuto. Em seguida, as lâminas foram deixadas secar à temperatura ambiente e os sítios inespecíficos bloqueadas com PBS contendo 1% de BSA por 20 minutos à temperatura ambiente. Os espécimes foram incubados com 50µL de anticorpos monoclonais primários específicos para os marcadores CD4, CD8 e MAC-3 (BD Pharmingen) diluídos 1:100 em PBS. A reação foi incubada *overnight* à 4°C, os cortes foram lavados três vezes com PBS e adicionado o anticorpo secundário marcado com FITC (Molecular Probes) diluído 1:100 em PBS (50 por corte). Após 30 minutos à temperatura ambiente, os cortes foram lavados por dez vezes com PBS e incubados com 50µL de 4',6-diamidino-2-fenilindole, dihidroclorídrico 100 µM (DAPI, Molecular Probes), substância que marca DNA, por 5 minutos. O DAPI foi aspirado e os cortes lavados uma vez com PBS. As lâminas foram montadas com kit anti-Fade (Molecular Probes), deixadas secar durante a noite e fotografadas no dia seguinte. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Leica) e as imagens processadas usando o software SlideBook (Intelligent Imaging Innovations, Inc., Denver, CO).

## **2.10. Quantificação relativa de mRNA de VEGF, FGF-2 e TGF- $\beta$ pela técnica de PCR em tempo real**

### **2.10.1. Extração de RNA**

O RNA total presente em 30mg do tumor de Ehrlich criopreservado, foi extraído com o kit de extração RNeasy (Qiagen). Com o objetivo de eliminar o DNA residual genômico extraído junto com o RNA, as amostras de RNA foram tratadas com enzima DNase (DNase I), que acompanha o kit. Ao final, o RNA foi eluído em 100 $\mu$ L de água livre de RNase. Para quantificação e análise da pureza do RNA extraído, 10  $\mu$ L foram diluídos em água deionizada autoclavada e a leitura foi feita em espectrofotômetro a 260nm e 280nm (Ultraspec 2000 - Pharmacia Biotech).

### **2.10.2. Obtenção do cDNA**

Para obtenção de cDNA foi utilizado o ImProm RT II (Promega®). A cada 1  $\mu$ g de amostra de RNA total foram adicionados 250ng de *random primer* e água deionizada tratada livre de RNase para um volume final de 5 $\mu$ L. Após incubação a 70°C por 15 minutos para a denaturação do RNA, a amostra foi rapidamente resfriada a 4°C para acréscimo de 1 $\mu$ L (10 unidades) de RNase Out (Invitrogen), 4 $\mu$ L do tampão da reação (ImProm II 5x reaction buffer), 2,4 $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0,5 $\mu$ L da mistura de nucleotídeos (dNTP's) à 20mM, 100 unidades da transcriptase reversa (ImProm II RT) e 6,6 $\mu$ L de água deionizada livre de RNase.

Para obtenção do cDNA, foi utilizado ciclo de 25°C por 5 minutos para ligação dos *primers*, 42°C por 60 min para transcrição reversa e 70°C por 15 minutos para desnaturação do ImProm II RT, em volume final da reação de 20 $\mu$ L.

### 2.10.3. *Primers* utilizados para a reação em tempo real da polimerase

A sequência dos *primers* empregados foi obtida na literatura. Para VEGF-A foram desenhados os *primers forward* 5'-AAG TGT GAC GTT GAC ATC CGT AA-3' e *reverse* 5'-TGC CTG GGT ACA TGG TGG TA-3' [23]; para FGF-2 foram desenhados os *primers forward* 5'-AAG AGC GAC CCA CAC GTC AAA CTA-3' e *reverse* 5'- AGC CGT CCA TCT TCC TTC ATA GCA-3'; para TGF- $\beta$ 1 os *primers forward* 5'- AAC AAT TCC TGG CGT TAC CTT-3' e *reverse* 5'- AAG AGC AGT GAG CGC TGA ATC G- 3' [24]. Para estabelecer os *primers* utilizou-se o programa MEGA 4, disponível no site <http://www.megasoftware.net/>, outro site também utilizado foi <http://www.idtdna.com> para análise dos *primers*. Como controle endógeno foram desenhados os *primers* para  $\beta$ -actina *forward* 5'-AAG TGT GAC GTT GAC ATC CGT AA- 3' e *reverse* 5'-TGC CTG GGT ACA TGG TGG TA-3' [25].

### 2.10.4. PCR em tempo real

A reação foi desenvolvida no aparelho de PCR em tempo real modelo 7300 (Applied Biosystems) com o uso do kit Power Sybr® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) conforme as instruções do fabricante, em um volume final de 20 $\mu$ L, com a adição de 4  $\mu$ L da amostra por reação e 300nM de cada primer. As condições da reação foram: 95° C/10 minutos, 40 ciclos de 95°C/15 seg, 60°C/1 minuto e o estágio de dissociação foi de 95°C/15 segundos, 60°C/15 segundos e 95°C/15 segundos. Em todos os ensaios as amostras foram processadas em duplicata.

#### **2.10.5. Determinação da curva padrão na PCR em tempo real para os fatores VEGF, FGF-2 e TGF- $\beta$ .**

O cDNA de referência para os fatores de crescimento estudados foi produzido a partir do RNA da amostra ATF5 referente ao tumor de Ehrlich subcutâneo com 14 dias de implantação. Esse cDNA foi diluído na razão de 1:2 a 1:32 em água ultrapura estéril e essas diluições foram testadas, em duplicata, na PCR em tempo real, para cada um dos fatores de interesse e para o gene da  $\beta$ -actina. A curva padrão foi estabelecida de acordo de cada diluição fornecidos pelo programa SDS versão 1.2.3 (*Sequence Detection Systems 1.2.3 – 7300 Real Time PCR System* – Applied Biosystems). A partir destes resultados foram escolhidas quatro diluições que apresentaram **Ct** (*threshold cycle*) entre os ciclos 20 e 35 para constituir a curva padrão utilizada em todas as reações. A menor diluição do cDNA de referência recebeu o valor relativo igual a 100 e seguindo a mesma razão da diluição, as outras três diluições do cDNA foram determinadas como 50, 25 e 12,5 para obtenção da curva de referência para quantificação relativa da expressão dos genes dos fatores angiogênicos. Para normalizar a expressão dos genes dos fatores de crescimento, foi adotada como referência a maior expressão de  $\beta$ -actina, em relação a cada citocina, a qual foi dividida pelo valor da  $\beta$ -actina da amostra e o valor obtido foi então multiplicado pelo valor da expressão do fator na referida amostra.

#### **2.11. Análise estatística**

Os dados do número de células produtoras de citocinas e dos fatores angiogênicos foram analisados pelo teste “t” de Student, cujas estatísticas foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

### 3. Resultados

#### 3.1. Caracterização química/bioquímica da ATF

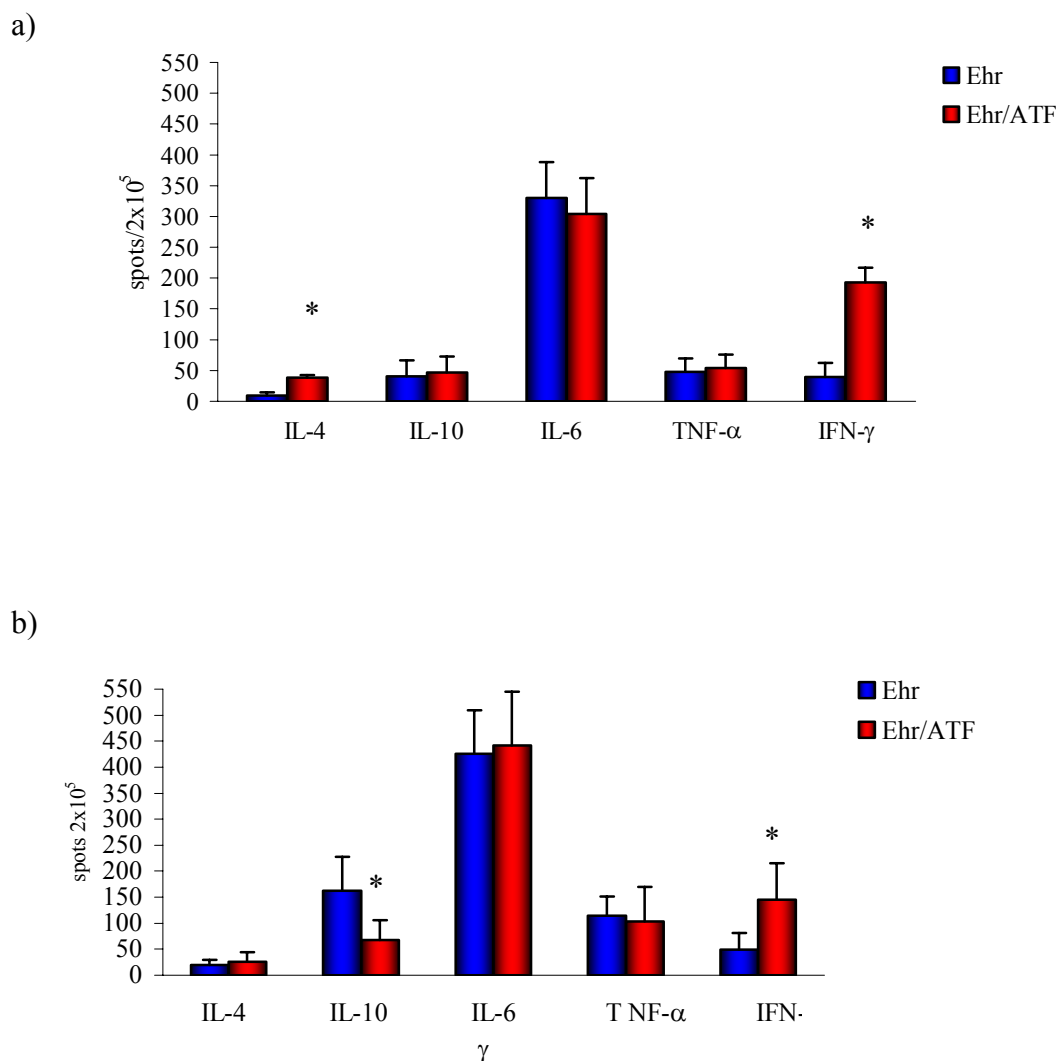
Através da análise de NMR  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensional constatou-se a presença da (1→6)- $\beta$ -D-glucana. No espectro de NMR  $^1\text{H}$  da ATF observou-se sinais dos hidrogênios carbinólicos na região de  $\delta$  3,29-4,20 e sinal do hidrogênio  $\beta$  anomérico e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

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 apresenta uma concentração residual de apenas 0,025% do sal. A determinação e semi-quantificação de endotoxinas (LPS) indicou a presença de apenas 0,03EU/mL, valor considerado negativo.

### 3.2. Produção de citocinas pelas células infiltradas na massa tumoral

Na figura 1a estão representados os dados relativos ao número de células secretoras de citocinas obtidas no 7º dia de experimento. Nesse período, o número de células secretoras de IL-4 do grupo Ehr/ATF ( $38,00 \pm 13,47$ ) foi significativamente maior que o grupo controle Ehr ( $9,50 \pm 4,59$ ). Entretanto, não observamos efeito do tratamento sobre a produção *in situ* de IL-10. O grupo tratado com ATF revelou também maior número de células secretoras de IFN- $\gamma$  ( $193,00 \pm 105,59$ ) comparado ao grupo Ehr ( $39,00 \pm 23,64$ ). O número de células secretoras de IL-6 foi elevado na presença do tumor, mas não apresentou diferenças estatisticamente significante entre os grupos. Não observamos efeito do tratamento sobre o número de células secretoras de TNF- $\alpha$  (Fig.1a).

Na figura 1b, estão representados os dados relativos ao 14º dia de experimento, observando-se que o tratamento com a ATF foi capaz de reduzir o número de células secretoras de IL-10 induzida pela presença do tumor ( $162,58 \pm 64,49$  para  $67,125 \pm 39,26$ ). Em oposição ao efeito regulador do tratamento sobre a produção de IL-10, observamos aumento no número de células secretoras de IFN- $\gamma$  pelas células do grupo Ehr/ATF ( $49,21 \pm 31,50$  para  $144,94 \pm 70,36$ ). Como já observado aos 7 dias, a presença do tumor induziu expressivo número de células secretoras de IL-6 que não sofreu influência do tratamento empregado. Também nesse período, não observamos efeito do tratamento sobre o número de células secretoras de TNF- $\alpha$  (Fig.1b).



**Fig.1.** Determinação do número de células secretoras de IL-4, IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (ELISPOT) presentes no microambiente tumoral obtidas de camundongos BALB/c (n=8) dos grupos tratados com 0,5mg de ATF (Ehr/ATF) ou de solução salina (Ehr) no sítio tumoral após 7 (a) e 14 (b) dias de crescimento subcutâneo do tumor. \* (p< 0,05 teste “t” de Student).

### 3.3. Células de tumor de Ehrlich não são produtoras das citocinas IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$

Com o objetivo de confirmar se as células produtoras de citocinas presentes na suspensão obtida após a digestão enzimática da massa tumoral são as células imunocompetentes do hospedeiro, sentimos a necessidade de descartar a possibilidade de que as células tumorais não produzem as citocinas avaliadas. Assim, optamos por usar uma suspensão rica em células de Ehrlich obtida do tumor ascítico, visto que o tratamento enzimático reduzia significativamente a viabilidade da suspensão obtida do tumor sólido.

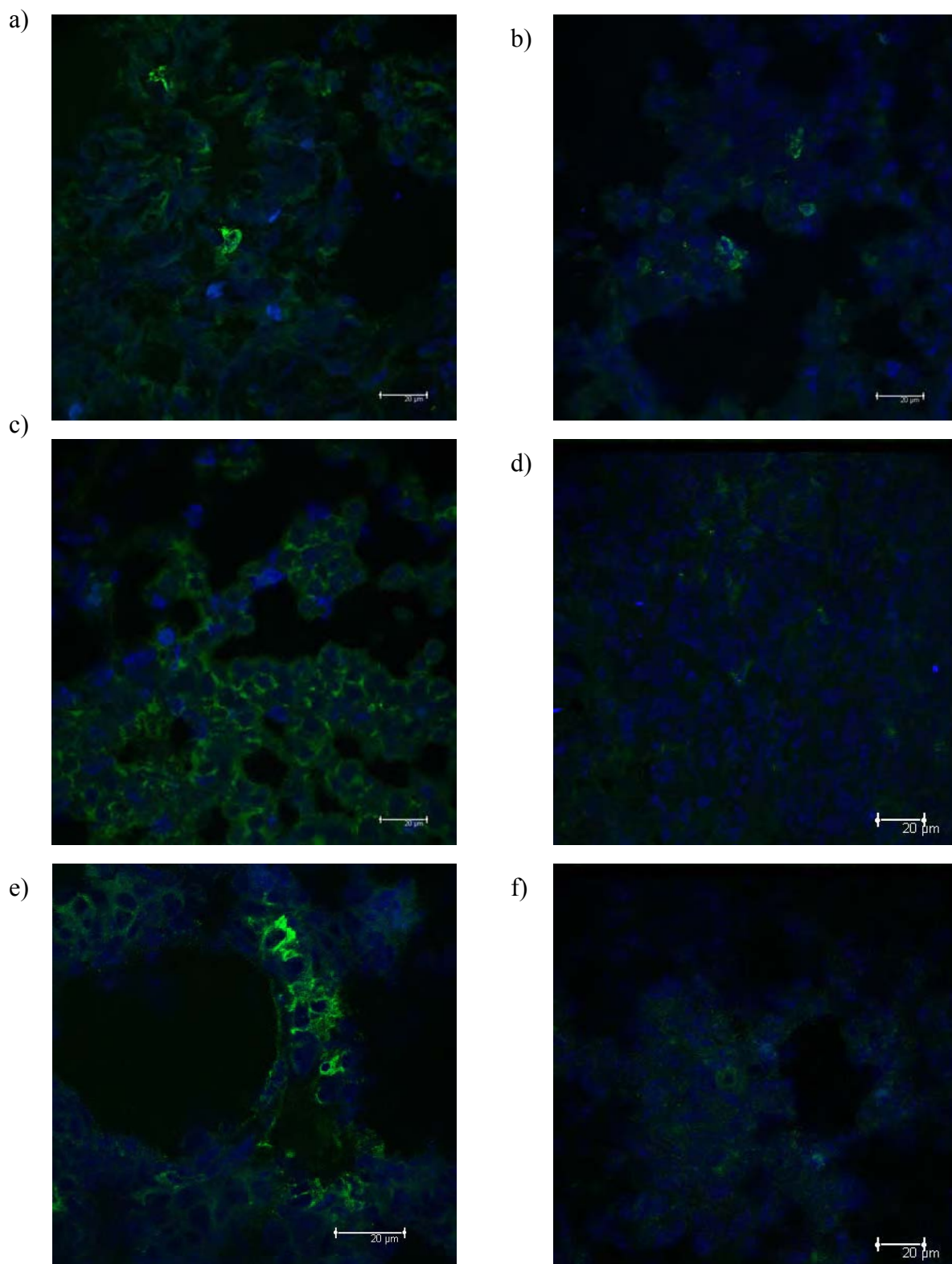
Como se observa na tabela 1, a suspensão de células ascíticas apresentou expressivo número de células produtoras de IL-6 e IFN- $\gamma$  com menor número de células produtoras de TNF- $\alpha$ , e escassas células produtoras de IL-4 e IL-10. A incubação da suspensão celular com anticorpo anti-CD45 e complemento, depletou quase completamente as células produtoras das citocinas supra-referidas. É importante ressaltar que o tratamento não prejudicou a viabilidade das células tumorais, como constatado pelo teste de exclusão do azul de trypan (contagem de células totais viáveis: 94%; após a depleção com anti-CD45: 89%).

**Tabela.1.** Número de células secretoras de IL-4, IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  após depleção dos leucócitos presentes na suspensão ascítica do tumor de Ehrlich com 7 dias de implantação, com anti-CD45 e complemento.

|                                      | IL-4       | IL-10      | IL-6         | TNF- $\alpha$ | IFN- $\gamma$ |
|--------------------------------------|------------|------------|--------------|---------------|---------------|
| <b>Animal 1 Ehr CD45<sup>-</sup></b> | <b>0</b>   | <b>0</b>   | <b>1,5</b>   | <b>0,5</b>    | <b>1,5</b>    |
| <b>Animal 1 Ehr</b>                  | <b>2,5</b> | <b>02</b>  | <b>283,5</b> | <b>10</b>     | <b>155,5</b>  |
| <b>Animal 2 Ehr CD45<sup>-</sup></b> | <b>0</b>   | <b>2,5</b> | <b>2</b>     | <b>1,5</b>    | <b>2,5</b>    |
| <b>Animal 2 Ehr</b>                  | <b>0,5</b> | <b>01</b>  | <b>275</b>   | <b>61,5</b>   | <b>129,5</b>  |

### **3.4. Caracterização do infiltrado celular presente no tumor de Ehrlich**

A análise dos resultados revelou a presença de células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e Mac-3<sup>+</sup> em todas as amostras analisadas nos dois períodos avaliados. No grupo Ehr/ATF detectamos maior intensidade de marcação para CD8 (Fig.2 c, d) aos 7 dias. Maior intensidade de marcação com anticorpo anti-Mac-3 e (Fig.2 e, f) foi também observada no grupo tratado, aos 14 dias de avaliação, enquanto a marcação para CD4 foi similar entre os grupos Ehr/ATF e Ehr em ambos os períodos (Fig.2 a, b). Não foi possível identificar marcação com o anticorpo anti-CD19.



**Fig. 2.** Análise de imunofluorescência por microscopia confocal de células TCD4 (a,b) TCD8 (c,d) e Mac-3 (e,f) em tumor de Ehrlich subcutâneo com 7 e 14 dias de implantação, obtido de animais tratados com ATF (a, c, e) ou solução salina ( b, d, f).

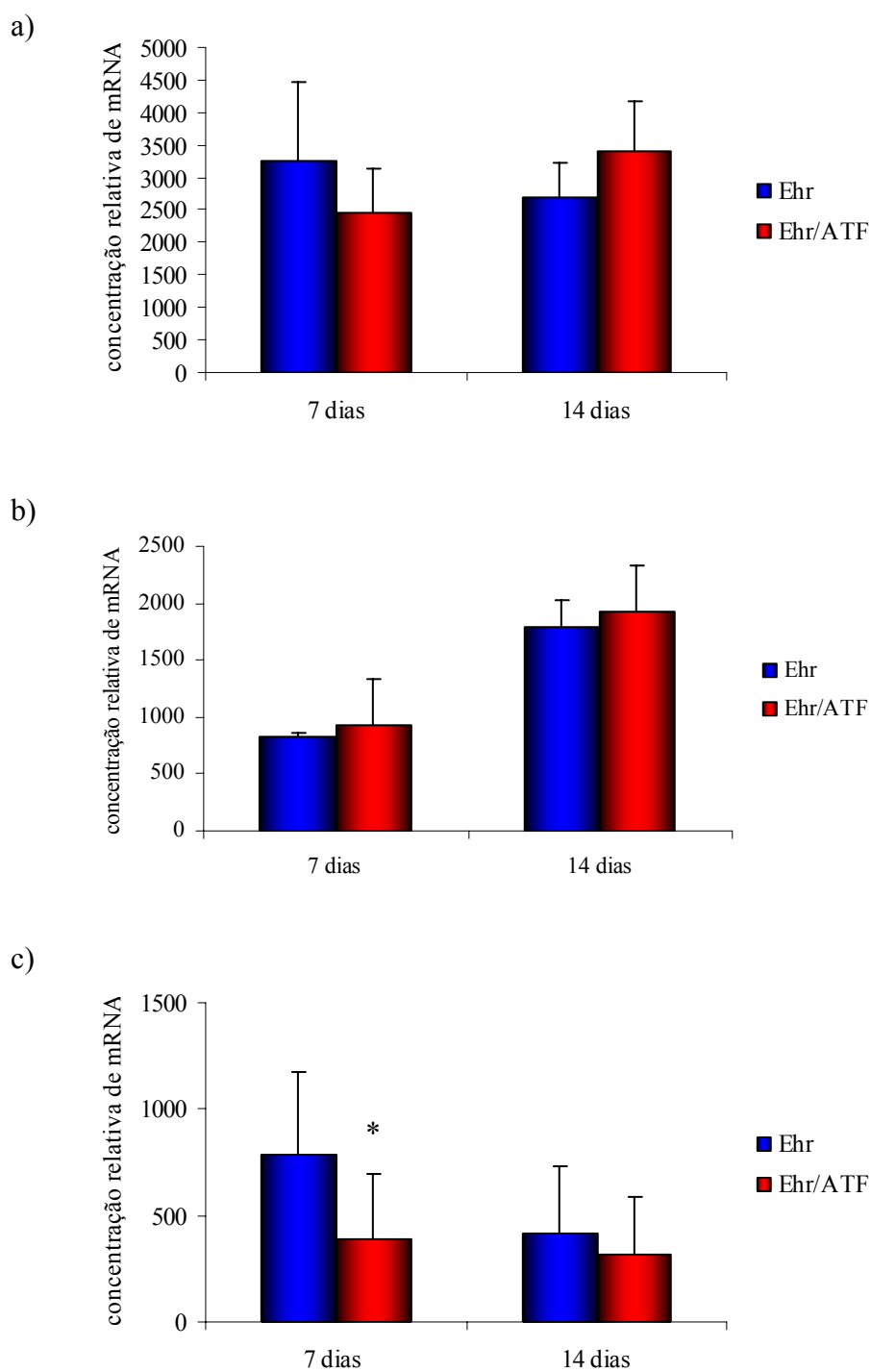
### **3.5. Determinação da curva padrão na PCR em tempo real para os fatores VEGF, FGF-2 e TGF- $\beta$ .**

De cada grupo experimental foram utilizados 4 animais para remoção do tumor e obtenção do RNA. A tabela detalha a codificação dos animais, os valores quantificados de RNA e a pureza do material (razão entre RNA extraído e proteínas totais), (Anexo 2).

As diluições do cDNA de referência para quantificação relativa da expressão de VEGF-A, FGF-2, TGF- $\beta$  e  $\beta$ -actina (Anexo 3 e 4). Para isso, foram testadas cinco diluições (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 1:32), com o *threshold* determinado na fase exponencial da curva de amplificação. Baseado nos valores de Ct obtidos, as diluições seriadas utilizadas para constituição das curvas padrões para, VEGF, TGF- $\beta$  e  $\beta$ -actina foram 1:32; até 1:256. Como os valores de Ct para FGF-2 foram mais elevados à diluição partiu de 1:2 até 1:16.

### **3.5. Detecção de mRNA de fatores angiogênicos no microambiente tumoral**

A análise de mRNA do VEGF-A, TGF- $\beta$  e FGF-2 através da técnica de PCR em tempo real revelou que todos os animais analisados expressaram mRNA para esses fatores de crescimento, independentemente do tratamento com a ATF. Dentre os fatores analisados, observamos que, aos 7 dias, o tratamento foi capaz de inibir o nível de expressão de mRNA para o FGF-2 no microambiente tumoral (Fig. 3c). Entretanto, não se observou diferença significativa nos níveis de expressão de mRNA para VEGF-A e para TGF- $\beta$  entre os grupos estudados nos períodos de 7 e 14 dias (Fig. 3 a,b).



**Fig. 3.** Concentração relativa de mRNA do VEGF-A (a), TGF- $\beta$  (b) e FGF-2 (c) expresso no tumor de Ehrlich obtido de camundongos ALB/c (n=4) dos grupos tratados com 0,5mg de ATF (Ehr/ATF) ou de solução salina (Ehr) no sítio tumoral. Análise realizada aos 7 e 14 dias de crescimento subcutâneo do tumor. \* ( $p < 0,05$  teste “t” de Student).

#### 4. Discussão

Observamos em estudo prévio que a ATF foi capaz de inibir o desenvolvimento de tumor de Ehrlich ao longo dos 14 dias de acompanhamento e que o tratamento reverte parcialmente a produção de IL-10 induzida pelo tumor, corroborando com os achados de outros autores que demonstraram a atividade antitumoral dessa fração [6, 8, 24,25]. Os resultados sugerem que a interferência na produção de IL-10 é a principal forma de ação da ATF uma vez que a fração não exerce efeito citotóxico direto sobre o tumor. Visto que nossos resultados prévios mostram que o tratamento de animais resulta em alterações esplênicas incompatíveis com a hipótese de imunoestimulação, o presente estudo foi formulado para testar a hipótese de que o tratamento com ATF promove migração seletiva de células imunocompetentes para o sítio tumoral, estabelecendo, através da produção de citocinas pró-inflamatórias, um microambiente menos favorável ao desenvolvimento do tumor.

Reproduzindo a análise previamente realizada por nosso grupo, a ressonância magnética nuclear (RMN) da ATF preparada para este estudo, demonstra que esta fração apresenta um perfil espectrofotométrico similar ao observado por Kawagishi et al. [3,29], com concentração protéica de 13,4% próxima daquela descrita por Ebina et al. [27] (16,6% de proteína e 76,7% de carboidratos). Além disso, a análise de HMQC confirma a estrutura de  $\beta$ -glucanas como o principal composto presente nessa fração, em concordância com os achados de Fujimiya et al. [6].

A avaliação do número de células secretoras de citocinas infiltradas na massa tumoral indica aos 7 dias de implantação do tumor (Ehr), um expressivo número de células secretoras de IL-6. Observou-se também a presença de células secretoras de IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Fig. 1a). Aos 14 dias de implantação do tumor, observamos maior número

de células secretoras de IL-10 e IL-6 que no 7º dia e um pequeno aumento no número de células secretoras de TNF- $\alpha$  (Fig.1b). O mesmo perfil de citocinas induzidos pela implantação tumoral foi previamente observado por Da Silva et al. [30] no modelo de tumor de Ehrlich ascítico. Os autores observaram que nesse modelo as células de Ehrlich induziram um perfil inflamatório, devido ao aumento na produção de IL-6 e TNF- $\alpha$  por macrófagos embora tenham encontrado também IL-10. O aumento na produção de IL-6 é encontrado em vários processos patológicos, incluindo inflamação, infarto do miocárdio, osteoporose, tumores sólidos, cânceres de próstata, bexiga e mieloma múltiplo [31]. Observa-se que os níveis séricos dessa citocina se elevam durante a fase inicial de crescimento tumoral e favorece o crescimento de diferentes tipos de cânceres, visto pode tanto exercer efeito parácrino inibitório, como efeito autócrino estimulatório de crescimento em alguns tipos celulares durante a proliferação de células tumorais malignas [32]. Assim, nossos achados indicam que a presença do tumor de Ehrlich induziu a produção de IL-6 e que essa produção não foi reduzida pelo tratamento com ATF, apesar do retardo no crescimento tumoral nos animais tratados.

No grupo tratado com a ATF (Ehr/ATF) observamos aos 7 dias maior número de células secretoras de IL-4 em comparação com o grupo Ehr (Fig.1a). Apesar de alguns autores terem demonstrado que a IL-4 exerce papel favorável ao crescimento de adenocarcinoma mamário murino [33], essa citocina apresenta atividade antiangiogênica por inibir a ação de fatores pró-angiogênicos como o FGF-2 (b-FGF) e VEGF, e por induzir necrose em tumores sólidos [33]. Aos 7 dias após implantação tumoral observamos que o grupo Ehr/ATF apresentou menor concentração relativa de mRNA de FGF-2 comparado ao grupo Ehr (Fig.2c), sendo possível que essa redução seja decorrente do maior número de células secretoras de IL-4 observado aos 7 dias após implantação tumoral

no grupo Ehr/ATF (Fig.1a), o que não ocorreu aos 14 dias (Fig.2c). Esta hipótese é sustentada pelos achados de Saleh et al. [34] e Volpert et al. [16] que observaram que a IL-4 foi capaz de reduzir a densidade vascular no microambiente tumoral, inibir neovascularização corneal e quimiotaxia induzidas pelo FGF-2. Resultados semelhantes foram observados *in vitro* por Lee et al. [35] que demonstraram que a IL-4 inibiu a proliferação, quimiotaxia e a formação de vasos a partir de células endoteliais obtidas de veia umbilical humana (HUVEC) estimuladas pelo FGF-2. Embora a angiogênese tumoral seja um fenômeno fundamental para o crescimento sustentado dos tumores sólidos, nossos achados indicam que a ATF tem efeito discreto sobre esse mecanismo e, portanto, não parece ser o principal mecanismo de inibição do tumor.

Aos 7 e 14 dias não observamos efeito estimulatório do tratamento sobre as células produtoras de TNF- $\alpha$  em nenhum dos períodos avaliados mas a falha do tratamento em aumentar o número de células secretoras de TNF- $\alpha$  é compatível com nosso achado prévio de que o tratamento não induz a produção *ex vivo* dessa citocina por esplenócitos (dados não publicados). Por outro lado, aos 7 e 14 dias observamos nos grupos Ehr/ATF maior número de células secretoras de IFN- $\gamma$ , sugerindo que há prevalência de linfócitos T no infiltrado (IFN- $\gamma^+$ ) em relação aos macrófagos (TNF- $\alpha^+$ ). O IFN- $\gamma$  associado ao TNF- $\alpha$  pode ter efeito citotóxico direto sobre algumas células tumorais e essa citocina também é capaz de induzir aumento da expressão de MHC favorecendo o aumento do reconhecimento e eliminação de células tumorais pelas células Tc [36]. Assim, é possível que a presença do IFN- $\gamma$  no ambiente tumoral promova a ativação de células T citotóxicas [17] que seriam responsáveis pelo retardo do crescimento tumoral. Essa possibilidade é reforçada pela observação de que aos 7 dias há uma maior intensidade de marcação de células TCD8 $^+$  infiltradas no tumor de animais tratados com ATF comparado ao grupo Ehr.

É possível, ainda, que as células produtoras de IFN- $\gamma$ , sejam representadas por células NK, corroborando a hipótese de Fujimiya et al. [6] de que essas são as principais células ativadas pela ATF. Dada a correlação observada entre a ocorrência intratumoral de IL-10 e a evolução do tumor, questionamo-nos se essa citocina encontrada na suspensão de células obtidas da massa tumoral não estaria sendo produzida pelo próprio tumor. Assim, células de Ehrlich obtida de tumor ascítico foram avaliadas quanto sua capacidade produtora de citocinas. Na suspensão ascítica encontramos células produtoras de IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , porém após a depleção dos leucócitos com anticorpo anti-CD45 e complemento, houve uma drástica redução das células produtoras de citocinas (Tabela 1). Esse achado nos leva a concluir que as células de Ehrlich não produzem as citocinas antiinflamatórias pesquisadas e que as células produtoras de citocinas no microambiente tumoral são do próprio hospedeiro (leucócitos infiltrantes). Vale ressaltar que não encontramos células produtoras de IL-10 na suspensão de células do tumor ascítico.

Aos 14 dias de experimento observamos que o tratamento com a ATF modulou a presença de células secretoras de IL-10 que foram induzidas pelo tumor (Fig.1b) e observamos maior número de células produtoras de IFN- $\gamma$ , o que pode ter sido responsável pela redução do número de células produtoras de IL-10. Consideramos esse achado importante, visto que a IL-10 é tida como um dos principais mecanismos de escape tumoral, através da inibição da ação de células Th1 [37], como sugerido para vários tipos de tumores (ovário, cólon, pulmão carcinomas de pele, melanoma, linfomas) [10] e também responsável pela diminuição de células CD4<sup>+</sup> secretoras de IFN- $\gamma$  [38]. Nesse sentido, Valadares et al. [39] observaram diminuição acentuada nos níveis de IFN- $\gamma$  e de IL-2 associada ao aumento paralelo dos níveis de IL-10 durante o crescimento tumoral no modelo de tumor de Ehrlich ascítico. Em concordância com esses achados, alguns autores

observaram no sangue periférico de pacientes com câncer de bexiga ou de cólon-retos que a proporção de células Th1 identificada através da produção intracelular de IFN- $\gamma$  e IL-2, estava drasticamente reduzida, enquanto a proporção de células Th2 produtoras de IL-4, IL-6 e IL-10 apresentavam aumento significativo, quando comparados aos indivíduos saudáveis [39, 41]. Sakamoto et al. [42] observaram que a expressão de IL-10 no tecido tumoral obtido de pacientes com câncer gástrico, está associada ao baixo número de células TCD8<sup>+</sup> e ao aumento da quantidade de vasos no microambiente tumoral. Nesse mesmo estudo, observaram que os pacientes com ausência de expressão de IL-10 no tecido tumoral, apresentavam aumento de células TCD8<sup>+</sup>, reduzida quantidade de vasos e maior sobrevida.

Ainda que as células Th2 possam produzir IL-10, considera-se atualmente que as células T regulatórias sejam as principais fontes dessa citocina. Assim, é possível que o aumento de IL-4, seja decorrente da ativação de Th2, enquanto a queda de IL-10, seja devido à redução do número de células T regulatórias. Desse modo o presente trabalho reforça a nossa observação prévia de que no modelo de tumor subcutâneo também há indução de IL-10. Além disso, acrescenta a observação de que esse fenômeno ocorre tanto sistemicamente quanto no sítio tumoral.

A avaliação da presença de células infiltradas no ambiente tumoral indica aos 7 dias uma maior intensidade de marcação de células TCD8<sup>+</sup> infiltradas no tumor do grupo tratado com a ATF em comparação ao grupo controle. Aos 14 dias observamos maior intensidade de marcação para macrófagos (Mac-3<sup>+</sup>) infiltrados no tumor também no grupo tratado com a fração ATF. Quanto à marcação das células TCD4<sup>+</sup> a intensidade de marcação foi similar entre os grupos avaliados. Neste aspecto, evidências experimentais indicam que a administração intratumoral da ATF, induz tanto aumento da atividade NK quanto a geração

de linfócitos Tc, que migram para o sítio tumoral, onde produzem fatores quimiotáticos, seguindo-se a migração de macrófagos ativados que inibem o crescimento de um segundo implante tumoral [6]. Ebina et al. [27] observaram que a transferência adotiva de células do baço de camundongos tratados com ATF para camundongos com tumor inibe seu crescimento e que a regressão do tumor não-tratado pode ser devido à indução de células citotóxicas específicas no baço e a fatores quimiotáticos no tumor distante. A administração por via oral da fração hidrossolúvel de *A. blazei* a camundongos com fibrosarcoma Meth A [43] e a administração *in vitro* de frações etanólicas de *A. blazei* [44] induziram aumento da atividade das células NK e da produção de IFN- $\gamma$  por células esplênicas. Assim, a redução da imunogenicidade do tumor parece ser dependente de IFN- $\gamma$  que aumenta o mecanismo de proteção contra o desenvolvimento tumoral e também inibe mecanismos de escape tumoral [17].

Em conclusão, os dados obtidos reforçam nossa hipótese inicial de que o tratamento com a ATF reverte parcialmente a produção de IL-10 induzida pelo tumor e que a ação antitumoral da ATF está associada à esse fenômeno e a indução da migração seletiva de células imunocompetentes para o sítio tumoral, estabelecendo através da produção de IFN- $\gamma$  pelas células Th1 e ativação de células TCD8 e macrófagos um microambiente menos favorável ao desenvolvimento do tumor.

## Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Luiz Cláudio Di Stasi do Departamento de Farmacologia-IBB-UNESP pelo suporte técnico dado à extração da fração ATF, ao Prof. Dr. Marcelo De Franco do laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan pelo auxílio na padronização da técnica de ELISPOT e ao Prof. Dr. Célio Lopes Silva do Centro de Pesquisas em Tuberculose, FMRP-USP pela cessão do Analisador de ImmunoSpot (BioSys GmbH). Ao CNPq pela bolsa de doutorado e à Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo pelo apoio financeiro (FAPESP 04/07737-0).

## 5. Referências Bibliográficas

- [1] Wasser SP, Diduck MY, Amazonas MLLA, Nevo E, Stamets P et al. Is a widely cultivated culinary-medicinal royal sun *Agaricus* (the himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* muril? Intern J Medicinal Mush. 2002; 4: 267-90.
- [2] Lull C, Wichers HJ, Savelkoul HFJ. Antiinflammatory and Immunomodulating properties of fungal metabolites. Mediators Inflamm. 2005; 2: 63-80.
- [3] Kawagishi H, Inagaki R, Kanao T, Mizuno T, Shimura K et al. Fractionation and antitumor activity of water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. Carbohydr Res. 1989; 186: 267-73.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Fujimiya Y, Suzuki Y, Oshiman K, Kozori H, Moriguchi K 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.
- [7] Mizuno M, Morimoto M, Minato K, Ito H, Tsuchida H. Polysaccharide from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1998; 62(3): 434-37.
- [8] 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.
- [9] Solomon PW, Weis AL. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: A modern perspective. *Crit Rev Immunol.* 1999; 19: 65-96.
- [14] Romagnoni S. Role of TH1 and TH2 cells against tumours. In: *The TH1/TH2 paradigm in disease.* Berlin: Springer; 1996, p. 159-160.
- [10] Mocelin S, Wang E, Marincola FM. Review: Cytokines and immune response in the tumor microenvironment. *J Immunother.* 2001; 24(5): 392-407.
- [11] Bernardshaw S, Hetland G, Ellertsen LK, Tryggestad AMA, Johnson E. An Extract of the Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murill Differentially Stimulates Production of Pro-inflammatory Cytokines in Human Monocytes and Human Vein Endothelial Cells in vitro. *Inflammation* 2006; 29 (4-6):147-53

- [12] Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001;357:539-45.
- [13] Volpert OV, Fong T, Koch AE, Peterson JD, Waltenbaugh C, et al. Inhibition of angiogenesis by interleukin 4. *J Exp Med*. 1998; 188: 1039-46.
- [15] Wei H, Zheng X, Lou D, Zhang L, Zhang R et al. Tumor-induced suppression of interferon- $\gamma$  production and enhancement of interleukin-10 production by natural killer (NK) cells: paralleled to CD4<sup>+</sup> T cells. *Mol Immunol*. 2005; 42:1023-31.
- [16] Onfray-Salazar F, López NM, Mendonza-Naranjo A. Paradoxical effects of cytokines in tumor immune surveillance and tumor immune escape. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007; 18:171-182.
- [17] Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN- $\gamma$  in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine & Growth Factor Rev*. 2002; 13: 95-109.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] Tetsuhiro T, Atsuhito Y, Koichi H, Torigoe T, Araya J et al. Interleukin-10 natural killer (NK) sensitivity of tumor cells by downregulating NK target structure expression. *Cellular Immunol*. 1999; 198: 103-10.
- [21] Paiva DL, Lampman GM, Kriz GS. *Introduction to Spectroscopy*. W. B. Saunders, Philadelphia, 1996.

- [22] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193: 265.
- [23] Farmacopéia Brasileira. 3rd ed. Andrei. São Paulo, 1977.
- [24] Almeida A, Thiery JP, Magdelénat H, Radvanyi. Gene expression analysis by real-time reverse transcription polymerase chain reaction: influence of tissue handling. Anal Biochem. 2004; 328:101-08.
- [25] Mathy JA, Lenton K, Nacamuli RP, Fong KD, Song HM et al. FGF-2 stimulation affects calvarial osteoblast biology: quantitative analysis of nine genes important for cranial suture biology by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. Plast Reconstr Surg. 2003;112:528-39.
- [26] Yang H, Xu Z, Iuvone PM, Grossniklaus HE. Angiostatin decreases cell migration and vascular endothelium growth factor (VEGF) to pigment epithelium derived factor (PEDF) RNA ratio in vitro and in a murine ocular melanoma model. Mol Vis. 2006; 12:511-17.
- [27] 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.
- [28] Oshiman K, Fujimiya Y, Ebina T, Suzuki I, Noji M. Orally administered  $\beta$ -1,6-D-polyglucose extracted from *Agaricus blazei* results in tumor regression in tumor-bearing mice. Planta Med. 2002; 68: 610-14.
- [29] Kawagishi H, Kanao T, Inagaki R, Mizuno T, Shimura K et al. Formolysis of a potent antitumor  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucan-protein complex from *Agaricus blazei* Murill fruiting bodies and antitumor activity of resulting products. Carbohydr Polymers 1990; 12: 393-403.

- [30] Da Silva RJ, Da Silva MG, Vilela LC, Fecchio D. Cytokine profile of Ehrlich ascites tumor treated with Bothrops jararaca venom. *Mediators Inflamm.* 2002; 11(4):197-201.
- [31] Gor DO, Rose NR, Greenspan NS. TH1-TH2: a procrustean paradigm. *Nat Immunol.* 2003; 4: 503-05.
- [32] Trikha M, Corringham R, Klein B, Rossi JF. Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for câncer: a review of the rationale and clinical evidence. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 4653-65.
- [33] Ellyard JI, Simson L, Parish CR. Th2- mediated anti-tumor immunity: friend or foe? *Tissue Antigens* 2007; 70: 1-11.
- [34] Saleh M, Davis ID, Wilkis AF. The paracrine role of tumor- erived mIL-4 on tumor-associated endothelium. *Int J Cancer* 1997; 72:664-72.
- [35] Lee IY, Kim J, Ko E-M, Jeoung EJ, Kwon Y-G et al. Interleukin-4 inibits the vascular endothelial growth factor- and basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in vitro. *Mol Cells* 2000; 14: 115-21.
- [36] Quin Z, Blankenstein T. CD4<sup>+</sup> T cell-mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN- $\gamma$  receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity* 2000; 12:677-86.
- [37] Tsuruma T, Atsuhito Y, Koichi H, Torigoe T, Araya J et al. Interleukin-10 natural killer (NK) sensitivity of tumor cells by downregulating NK target structure expression. *Cellular Immunol.* 1999; 198: 103-10.
- [38] Segura JA, Barbero LG, Márquez J. Early tumor effect on splenic Th lymphocytes in mice. *FEBS Lett.* 1997; 414: 1-6.

- [39] Valadares MC, Klein SI, Guaraldo AM, Queiroz LMS. Enhancement of natural killer cell function by titanocenes in mice bearing Ehrlich ascites tumor. *Eur J pharmacol.* 2004; 25:191-96.
- [40] Agarwal A, Verma S, Burra U, Murthy NS, Mohanty NK et al. Flow cytometric analysis of Th1 and Th2 cytokines in PBMCs as a parameter of immunological dysfunction in patients of superficial transitional cell carcinoma of bladder. *Cancer Immunol Immunother.* 2006; 55: 734-43.
- [41] Kanazawa M, Yoshiraha K, Abe H, Iwadate M, Watanabe K et al. Effect of PSK on T and dendritic cells differentiation in gastric or colorectal cancer patients. *Anticancer Res.* 2005; 25: 443-49.
- [42] Sakamoto T, Saito H, Tatebe S, Tsujitani S, Ozaki M et al. Interleukin-10 expression significantly correlates with minor CD8<sup>+</sup> T-cell infiltration and high microvessel density in patients with gastric cancer. *Int J Cancer* 2006; 118: 1909-14.
- [43] Takimoto H, Wakita D, Kawaguchi K, Kumazawa Y. Potentiation of cytotoxic activity in naïve and tumor-bearing mice by oral administration of hot-water extracts from *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Biol Pharm Bull.* 2004; 27(3):404-06.
- [44] Zhong M, Tai A, Yamamoto I. In vitro augmentation of natural Killer activity and interferon-gamma production in murine spleen cells with *Agaricus blazei*. *Biotechnol Biochem.* 2005; 69(12):2466-69.

## IV. Anexos

### Anexo 1 - Guide for Authors

#### INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY

The preferred medium of submission is online submission (see **Online submission of papers**) or, if that is not possible, on disk with accompanying manuscript (see **Submission of manuscripts on disk**) *International Immunopharmacology* is an interdisciplinary journal devoted to the publication of original scientific papers interrelating immunology and pharmacology. Manuscripts will be considered for publication on the condition that the results reported are based on original research that has not been published elsewhere in any journal or language. Upon acceptance for publication of an article in **International Immunopharmacology**, the author tacitly agrees to make available any materials used in the published experiments, or novel or natural products disclosed in the article that are not commercially available, so that qualified investigators may confirm the observations. Neither abstracts nor posters that have been presented at scientific meetings and symposia are considered prior publications. Submissions are assumed to be on behalf of all authors and their respective institutes. The *Journal* will publish the following types of publications:

- **Commentary.** Topical editorials, commentaries, prospective reviews and hypotheses demonstrating acceptable standards of originality. Such articles will only be published following an invitation to the author(s) from the Editor(s). Other prospective authors should obtain editorial permission before submitting a manuscript. Commentaries (3000-10,000 words) will serve as the means for expressing controversial, critical and often personal evaluations of research trends. Commentaries in the form of prospective reviews or hypotheses will be composite presentations of wide-ranging observations from the literature, which should indicate, and possibly stimulate, new directions for potentially rewarding immunopharmacological research.
- The **Regulatory Reports** section will provide a repository of standards for cytokines/chemokines/etc., as well as a forum for thoughts, ideas, and recommendations on toxicology and pathology of immunoregulatory molecules. This section will also track items receiving RAC and IND approval (in the United States) and their counterparts elsewhere.
- **Rapid Reports.** Short, complete studies of such scientific importance that they merit

rapid publication. If the editors conclude that a paper does not qualify as a Rapid Report, it will be considered for publication as a full-length manuscript. Rapid Reports are generally two to four journal pages in length, including illustrations and tables. Authors should submit Rapid Reports to either Editor-in-Chief and include a cover letter that indicates the author's wish that it be considered as a Rapid Report and briefly outline why the work merits rapid publication.

- **Full-length articles** are full-length descriptions of original research. Scope may include basic science, clinical results, or applications. These manuscripts will undergo standard review and normally are not expedited.
- **Reviews** are comprehensive appraisals of research and clinical outcomes in a field of current interest. All reviews are subject to the normal review process. Consult with either Editor-in-Chief regarding content and length prior to submission.
- **Book Reviews.** Books for review may be sent to James E. Talmadge. Authors interested in reviewing a particular book should communicate directly with him.
- **Preliminary Studies/Reports.** This section is for the publication of new observations that are promising but have not achieved the stature of a regular article, yet are judged by the reviewers or editorial staff to contribute a novel, important, or useful observation worthy of publication. These reports, including clinical studies on a limited patient population, will generally be brief reports of a single or a few observations or results comprising up to four printed pages including all references and display items; appropriate statistical analyses should be included.
- **Natural Products** contributions must meet the following specific criteria: a) any natural extract or drug should be fully characterized and information provided regarding origin - specifically, the "drug" under study must have been fractionated and the active substances within the natural product identified; b) isolation or purification techniques must be described in detail; and c) the authors must state in their paper that the material under study is endotoxin free, including not only natural products, but also all biologics and synthetics used for immunopharmacologic studies. The Editor-in-Chief requests that authors of Natural Product contributions read the guidelines as set out in the Editorial article of International Immunopharmacology volume 6, issue 8. You can read the article by following this link: [Editorial](#)

- **Meeting/Symposia reports** are synopses of meetings and symposia, generally shorter than five journal pages. Please contact either Editor-in-Chief prior to submitting. Reports must be submitted within two weeks of the end of the meeting.
- **Special Thematic Reports** are collections of full-length articles and/or reviews on a specific topic.
- **Correspondence** is a forum for presentation of preliminary clinical data, technology changes, and case reports. Letters extending or disputing claims published in previous issues of the Journal are encouraged. They will be forwarded to the original authors for written comment. Both opinions will be published concurrently. Limited correspondence relating only to articles previously published in the *International Immunopharmacology* will be considered for publication at the discretion of the Editors.

### **Submission of manuscripts**

#### **Online submission of papers**

The preferred mechanism of submission of Manuscripts is electronic, by using the EES submission tool at <http://www.elsevier.com/submit/intimsubmit>. After registration, authors will be asked to upload their article and associated artwork. The submission tool will generate a PDF file to be used for the reviewing process. The submission tool generates an automatic reply which incorporates the manuscript number for future correspondence. Please ensure to upload your file in an editable format and not in a pdf format. The system will convert your uploaded source file into a pdf file. The editor will then receive both your source file and pdf file. The pdf file will be used for reviewing purposes and the source file will be used by production on the acceptance of your paper. Full instructions on how to use the online submission tool are available at the above web address.

For those authors who cannot submit via EES, please follow the instructions to authors as shown below.

Send one original and three copies of the text and one original set of figures along with three copies to the editorial office:

**International Immunopharmacology**

**attn. James E. Talmadge**

**University of Nebraska Medical Center**

**987660 Nebraska Medical Center**

**Omaha, NE 68198-7660**

**U.S.A.**

Authors must include a cover letter that contains the title, authors, a brief outline of the work's originality, desired section of publication, corresponding author's name, address, telephone and fax numbers (including country and city codes), and e-mail address. Authors are encouraged to provide the names, addresses, e-mail addresses and fax numbers of up to four researchers qualified to review the manuscript.

Original materials will be discarded one month following publication unless return is requested.

**Submission of manuscripts on disk**

Authors are required to submit a computer diskette (3.5 inch HD/DD) to the editorial office when the manuscript is first submitted following these guidelines:

- Specify software, including release, e.g. Word Office 97).
- Specify platform (PC or Mac).
- Include the text file and separate table and illustration files.
- The file should be single-spaced and should use the wrap-around, end-of-the-line feature (i.e. no return at the end of each line). All textual elements should begin flush left; no paragraph indents. Place two returns after every element such as title, headings, paragraphs, figure and table call-outs.
- Keep a back-up disk for reference and safety.
- When your paper has been refereed, revised if necessary and accepted, send a disk containing the final version with the final hard copy. Verify that the disk and hard copy match exactly.

**Preparation of manuscripts**

- Manuscripts should be concisely written in English and typed double-spaced throughout on letter-size or A-4 paper with margins of at least 2.5 cm.
- Each manuscript must have a title page, which includes only the title, the authors' names, and laboratory of origin, the name and address of the person to whom proofs should be mailed, and any necessary footnotes. The title should be as short as is consistent with clarity.
- Pages should be numbered in succession, the title page being page 1.
- Tables and figures should be on separate pages placed at the end of the manuscript.

- Footnotes to the text should be used sparingly; where they must be used superscript numbers should indicate their locations. Footnotes should be typed with corresponding numbers on a separate sheet. In Tables, reference to footnotes should be made using superscript letter.
- Simple chemical compounds should be named in the text of the Materials and Methods and Results sections by formulae when these can be printed in single horizontal lines of type.
- Isotopic specifications should conform to the IUPAC system (Biochem. J. (1975) 145, 1-20).
- Drug names should be the official or approved names; trade names or common names may be given in brackets where the drug is first mentioned. The manufacturer's name and address must be given. The doses of the drugs should be given as unit weight/unit body weight, e.g. mmol/kg or mg/kg. Concentrations should be given in terms of molarity (eg. nM or uM), or as unit weight/unit volume solution (eg. mg/l) stating whether the weight refers to the salt or the active component of the drug. The molecular weight, inclusive of water of crystallization, should be stated if doses are given as unit weight.
- The IUB Enzyme Commission (EC) number must be quoted with the full name of the enzyme when it is first mentioned in the text. Subsequently the *accepted* trivial name shall be used, e.g. *Full Name*: Acetyl-CoA:choline O-acetyltransferase (EC 2.3.1.6.) *Trivial Name*: Choline acetyltransferase not choline acetylase. For this information the author should refer to *Enzyme Nomenclature* (1973), Elsevier, Amsterdam.
- Authors are requested to follow the IUPHAR Guidelines for Classification of New Receptor Subtypes (see Immunopharmacology, Vol. 30, p. 189 or p. 255).
- Symbols for physical units should be restricted to the Systeme Internationale (S.I.) Units. Examples of commonly used symbols can be found in Biochemical Journal 145, 1-20 (1975) and more detailed description, in Quantities, Units and Symbols (1971) The Royal Society, London.
- The excessive use of abbreviations in the text is strongly discouraged. In particular, awkward and unfamiliar abbreviations and those intended to express concepts or experimental techniques will not be permitted. In order to aid communication between scientists of different disciplines, authors should only use abbreviations sparingly and

should always define the abbreviation when first used by placing it in parentheses after the full term, e.g. fetal bovine serum (FBS).

### **Organization of manuscript**

- Each paper must begin with an **Abstract** that summarizes the results obtained and the conclusions drawn. It should not exceed 250 words.
- A short list of **keywords** or phrases (3-6) should be supplied following the abstract.
- An **Introduction** should first "set the scene" for a non-specialist and then continue with the specific reasons for undertaking the investigation. Exhaustive reviews of the literature should be avoided and no attempt should be made to indicate the results obtained.
- **Materials and Methods.** Procedures used should be given in sufficient detail to permit the repetition of the work by others. However, published procedures should be briefly summarized and only described in detail if they have been substantially modified. Special chemicals, drugs, etc. with their sources of supply should be grouped under a separate subheading, *Materials*.
- **Results.** In this section the findings should be described without discussion of their significance. Subsections should be used to clarify the expression of the results.
- **Discussion.** In this section the authors' interpretations of their findings should be accompanied by an assessment of their significance in relation to previous work. Subsections should be used wherever possible.
- **References.** Only papers closely related to the author's work should be cited. Follow the Vancouver format. References should be cited in the text as Arabic numerals in square brackets and listed numerically in the order of citation at the end of the text. All authors should be cited if six or fewer; if more than six, list the first six and et al. Abbreviations for titles of medical journals should conform to *Index Medicus*. References should include the names of all authors, title of article, chapter or book, journal name, the year, volume and first and last pages. For a book include the names of any editors, the city and name of publisher. Examples for an article in a journal (a) or book chapter (b) or for a book (c) are:  
a) Maldonado-Lopez R, De Smedt T, Michel P, Godfroid J, Pajak B, et al. CD8a+ and CD8a- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J.Exp Med* 1999; 189: 587-592.

b) Gullick WJ and Venter DJ. The c-erbB2 and its expression in human tumours. In: Waxman J, Sikora K, editors. The molecular biology of cancer. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1989; p. 38-53.

c) Lumley JSP, Green CJ, Lear P, Angell-James JE. Essentials of experimental surgery. London: Butterworths, 1990.

Unpublished experiments, papers in preparation, and personal communications may be mentioned only in the text; they may not be listed in the list of references. A paper that has been accepted for publication but not yet published may be included in the list of References. In the citation, replace year, volume and page numbers with "In press". The date of acceptance should be indicated when submitting the paper.

- **Figure legends.** Each figure must have a legend. Include all legends together in one section, each on a separate page.

- **Tables.** Each table must be on a separate page and together with its caption and legend, be self-explanatory.

- **Figures.** Each figure must be numbered with the authors' names and *International Immunopharmacology* written on the back. The figure together with its legend should be self-explanatory. Photomicrographs should be prepared using these guidelines: For micrographs to be printed to the edge of the page, the prints should fill a space 155 mm wide and up to 200 mm long. To allow for trimming, important material and lettering *should not occur* within 10 mm of the edge. The authors should directly label micrographs. For other half tones (including color plates), the maximum area available is 155 X 210 mm. The authors should also directly label these prints. A charge is made for reproducing color photographs; the cost will be given on request. Final lettering of Figures will be done by the Publisher if the lettering desired is indicated in soft pencil. Figures lettered in India ink will be accepted if the lettering is of high standard and large enough to be legible when the Figures are reduced to the final size. Symbols on graphs etc. should be inserted by the author using standard characters.

#### **Colour illustrations with Colour e-Product**

Submit colour illustrations as original photographs, high-quality computer prints or transparencies, close to the size expected in publication, or as 35 mm slides. Please make sure the artwork is in an acceptable format (TIFF, EPS, MS Office files) and is at the correct resolution. Polaroid colour prints are not suitable. If, together with your accepted

article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., Science Direct and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://authors.elsevier.com/artwork> [Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to "grey scale" (for printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations.]

### **Submission of Rapid Reports**

Manuscripts submitted for consideration as a Rapid Report should present scientifically sound and novel research in a clear and concise fashion and contain conclusions of unusual interest to immunologists and pharmacologists that are justified by the data presented. Chief criteria for acceptance are scientific novelty and quality, originality, conciseness and clarity.

Manuscripts submitted as a *Rapid Report* should conform to the additional guidelines listed below as well as to the information for authors for full-length manuscripts discussed above. *Rapid Report* submissions are reviewed rapidly (normally within a few weeks). Only minor revisions are permitted because of time constraints. Brief reviewer comments may be provided to authors.

**The maximum length of Rapid Report articles is usually four printed pages. However, at the discretion of the Editor, this may be extended to six printed pages.** Rapid Report submissions require four copies of the manuscript; all gray scale images should be submitted as publication-quality prints. In addition to hard copies of the manuscript, Rapid Report authors are also required to submit a 3.5" computer disk containing an electronic version of the text and figures. The figures must also be provided electronically.

- Add "Attention: Rapid Report" to the mailing label, and mail the manuscript to either Editor-in-Chief.
- Rapid Report articles, including figures and references must fit within four journal pages. Authors should estimate the size of the figures and tables and limit the text accordingly.
- The abstract is limited to 150 words.

- The Materials and Methods section may be sharply limited which should be sufficient to allow the evaluation of results and conclusions.
- Authors may choose to fuse the Results and Discussion sections.
- Given the constraints of rapid publication and use of the author's electronic file to typeset the article, no proofs will be provided for Rapid Reports.

### **Proofs**

One set of proofs will be supplied for the author to check for typesetting accuracy, to be returned to the publisher within 3 days of receipt. No changes to the original manuscript will be allowed at this stage.

Authors can keep track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature of Elsevier's [Author Gateway](#).

### **Offprints**

Twenty-five offprints of each accepted paper will be supplied to the corresponding author at no cost. Additional offprints will be available by ordering on the reprint order form.

### **Journal Publishing Agreement**

All authors must sign the Journal Publishing Agreement (JPA) before the article can be published. This agreement enables Elsevier Science Ltd to protect the copyrighted material for the authors, but does not relinquish the author's proprietary rights. The JPA covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article, including reprints, photographic reproductions, microform or any other reproductions of similar nature and translations, and includes the right to adapt the article for use in conjunction with computer systems and programs, including reproduction or publication machine-readable form and incorporation in retrieval systems. If excerpts (for example figures) from copyrighted works are included the author is responsible for obtaining written permission from the JPA holder prior to submitting the final version of the paper. Full credit must be given to such sources.

## Anexo 2

**Tabela.** Quantificação do RNA extraído da massa tumoral de camundongos BALB/c tratados com salina ou ATF. A partir dos valores das concentrações obtidas, todas as amostras foram ajustadas para construção do cDNA, conforme mencionado no item 3.4 da seção de material e métodos.

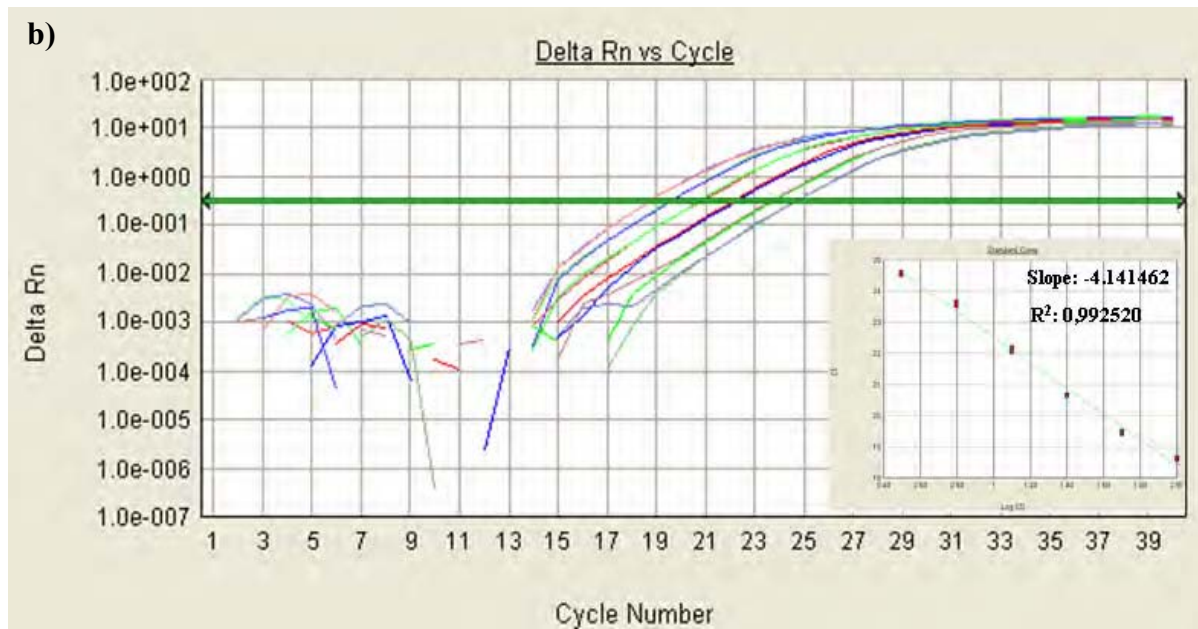
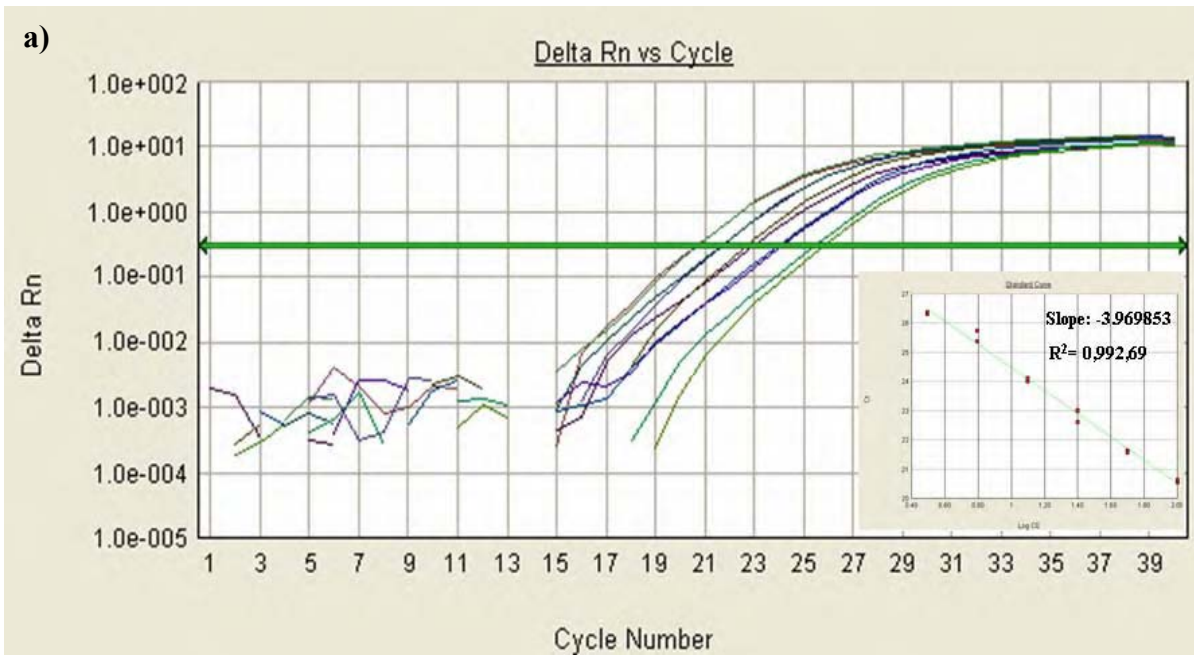
| <b>Identificação</b> | <b>Grupo experimen</b> | <b>Período de estu<br/>(dias)</b> | <b>Concentração d<br/>RNA (µg/mL)</b> | <b>Pureza<br/>(razão)</b> |
|----------------------|------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------|
| S1                   | Ehr                    | 7                                 | 237                                   | 2,21                      |
| S2                   | Ehr                    | 7                                 | 390                                   | 1,36                      |
| S3                   | Ehr                    | 7                                 | 560                                   | 1,47                      |
| S4                   | Ehr                    | 7                                 | 470                                   | 1,40                      |
| A1                   | Ehr/ATF                | 7                                 | 520                                   | 1,42                      |
| A2                   | Ehr/ATF                | 7                                 | 560                                   | 1,48                      |
| A3                   | Ehr/ATF                | 7                                 | 820                                   | 1,60                      |
| A4                   | Ehr/ATF                | 7                                 | 420                                   | 1,37                      |
| S5                   | Ehr                    | 14                                | 230                                   | 2,59                      |
| S6                   | Ehr                    | 14                                | 520                                   | 2,20                      |
| S7                   | Ehr                    | 14                                | 320                                   | 2,46                      |
| S8                   | Ehr                    | 14                                | 450                                   | 2,33                      |
| A5                   | Ehr/ATF                | 14                                | 290                                   | 2,48                      |
| A6                   | Ehr/ATF                | 14                                | 160                                   | 3,0                       |
| A7                   | Ehr/ATF                | 14                                | 150                                   | 3,36                      |
| A8                   | Ehr/ATF                | 14                                | 440                                   | 2,37                      |

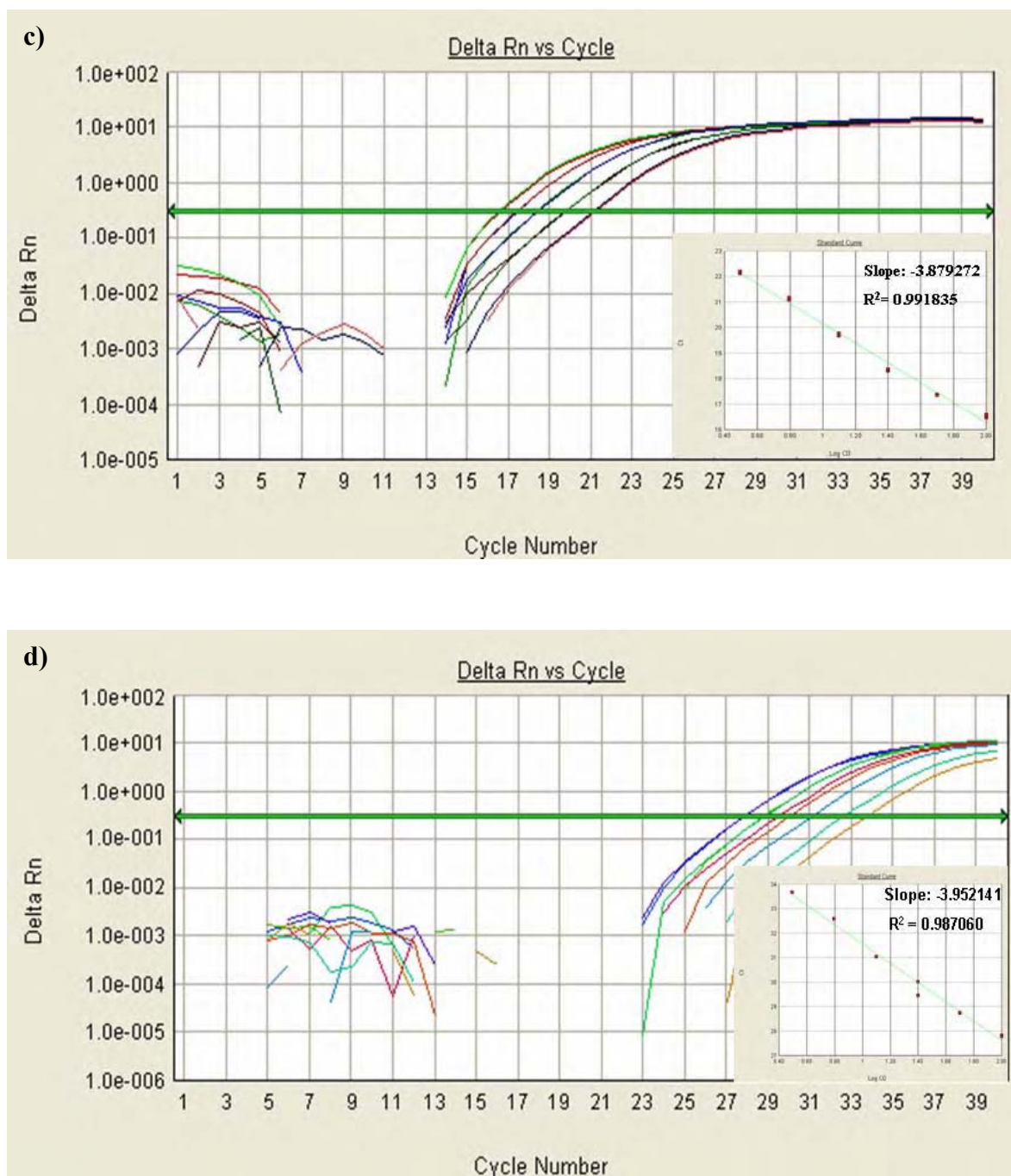
### Anexo 3

**Tabela.** Valor relativo de Ct do cDNA de referência para VEGF, FGF-2, TGF- $\beta$  e  $\beta$ -actina, em diferentes diluições, pela PCR em tempo real.

| DNA  | Valor relativ | Ct VEGF | Ct FGF-2 | Ct TGF- $\beta$ | Ct $\beta$ -actin |
|------|---------------|---------|----------|-----------------|-------------------|
| 1:2  | 100           | 20,59   | 27,80    | 18,62           | 16,52             |
| 1:4  | 50            | 21,60   | 28,75    | 19,45           | 17,36             |
| 1:8  | 25            | 22,81   | 29,72    | 20,65           | 18,34             |
| 1:16 | 12,5          | 24,06   | 31,04    | 22,30           | 19,73             |
| 1:32 | 6,25          | 25,56   | 32,59    | 23,59           | 21,13             |

## Anexo 4





**Fig.2.** Representação gráfica da curva de amplificação da PCR em tempo real para, VEGF-A (a), TGF- $\beta$  (b), FGF-2 (c) e  $\beta$ -actina (d) das diluições do cDNA de referência utilizado como padrão nas reações. Em ordem decrescente de diluição, da esquerda para a direita, apresentam-se as diluições 1:2 à 1:32. No detalhe o gráfico da curva padrão, construída com cinco pontos das referidas diluições, obtida a partir da PCR em tempo real para cada fator estudado.