

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

MODULAÇÃO DA CARCINOGENÊSE DO CÓLON PELO
COGUMELO *Agaricus blazei* NO RATO

LIANE ZILIOOTTO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – Unesp para obtenção do título de Doutor em Patologia.

BOTUCATU – SP

2008

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

MODULAÇÃO DA CARCINOGENÊSE DO CÓLON PELO
COGUMELO *Agaricus blazei* NO RATO

DOUTORANDA: LIANE ZILIOOTTO
ORIENTADORA: MARIA AP. MARCHESAN RODRIGUES
CO-ORIENTADOR: LUÍS FERNANDO BARBISAN

Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Patologia da Faculdade de
Medicina de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista – Unesp para 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

Ziliotto, Liane.

Modulação da carcinogênese do cólon pelo cogumelo *Agaricus blazei* no rato /
Liane Ziliotto. – 2007.

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

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Ap. Marchesan Rodrigues

Co-orientador: Prof. Luís Fernando Barbisan

Assunto CAPES: 40105008

1. Patologia. 2. Câncer. 3. Rato.

CDD 616.07

Palavras-chave: *Agaricus blazei*; Câncer; Carcinogênese experimental;
Cólon; Focos de criptas aberrantes; Quimioprevenção.

O tamanho das pessoas

*"Os tamanhos variam conforme o grau de envolvimento.
Uma pessoa é enorme para você, quando fala do que leu e viveu,
quando trata você com carinho e respeito,
quando olha nos olhos e sorri destravado.*

*É pequena para você quando só pensa em si mesma,
quando se comporta de uma maneira pouco gentil,
quando fracassa justamente no momento em que teria que demonstrar
o que há de mais importante entre duas pessoas: a amizade, o carinho,
o respeito, o zelo e, até mesmo, o amor.*

*Uma pessoa é gigante para você quando se interessa pela sua vida,
quando busca alternativas para o seu crescimento,
quando sonha junto com você. É pequena quando desvia do assunto.*

*Uma pessoa é grande quando perdoa, quando compreende,
quando se coloca no lugar do outro,
quando age não de acordo com o que esperam dela,
mas de acordo com o que espera de si mesma.*

*Uma pessoa é pequena quando se deixa reger por
comportamentos da moda.
Uma mesma pessoa pode aparentar grandeza ou miudeza dentro de um
relacionamento, pode crescer ou decrescer num espaço de poucas semanas.*

*Uma decepção pode diminuir o tamanho de um amor que parecia ser grande.
Uma ausência pode aumentar o tamanho de um amor que parecia ser ínfimo.*

*É difícil conviver com esta elasticidade: as pessoas que se agigantam nas críticas e
se encolhem quando estão diante dos olhos que sabem "seus segredos íntimos e suas
atitudes covardes fruto de sua própria insegurança".
Nosso julgamento é feito não através de centímetros e metros,
mas de ações e reações, de expectativas e frustrações.*

*Uma pessoa é única ao estender a mão; e ao recolhê-la inesperadamente,
se torna mais uma.
O egoísmo unifica os insignificantes.*

*Não é a altura, nem o peso, nem os músculos que tornam uma pessoa grande...é a
sua sensibilidade, sem tamanho...*

William Shakespeare

*À **minha família**, pelo apoio, compreensão e incentivo para que eu pudesse seguir com meus sonhos.*

*E principalmente, aos meus sobrinhos, **Murilo** e **Bernardo**, por me ensinarem uma nova forma de amar!*

Agradecimentos Especiais

À Profa. Dra. Maria Aparecida Marchesan Rodrigues, carinhosamente conhecida por Professora Tuca:

A Profa. Tuca me ensinou não apenas sobre carcinogênese, câncer de cólon e modelos experimentais. Com ela aprendi ser possível educar de forma positiva, com incentivo; ser carinhosa sem perder a autoridade e ter amor ao trabalho mesmo estando muito atarefada. Conheci uma profissional atenciosa, dedicada, que não somente me orientou, mas cuidou de mim. Carregarei sempre comigo seus ensinamentos. Pretendo seguir seu exemplo e me tornar uma profissional à altura do que ela foi para mim durante meu doutorado. Professora Tuca, por tudo que passamos nestes anos de convívio, ficam minha gratidão e meu afeto.

Muito obrigada!

*Ao **Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan**, pelo apoio, paciência e todo
conhecimento cedido durante estes anos de convivência. Serei sempre grata pelo auxílio
e ensinamentos durante a fase experimental, intelectual e de confecção da tese.*

Agradecimientos

Quem me conhece sabe da minha dificuldade em escrever os agradecimentos. Não por ser mal-agradecida, mas pelo medo de esquecer alguém e, também, de expressar no papel meus sentimentos. Para tentar não faltar com ninguém, vou contar a breve história do meu doutorado e agradecer aqueles que fizeram parte da minha vida e foram importantes neste período.

Vim para Botucatu à procura de orientação e me encontrei com a **Profa. Tuca** que foi muito prestativa, clara e maravilhosamente honesta, ao me dizer que, para entrar no programa de pós-graduação na Patologia, eu precisaria passar pelo teste seletivo exigido. Falhei na primeira tentativa, mas por causa desta falha conheci grandes amigos como o **Tony** e a **Merielen** que me acompanharam até a conclusão desta tese.

O grande agradecimento nessa fase vai para **Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva**, que, sempre muito carinhosa, atenciosa e grande entusiasta da educação, se dispôs a nos ajudar nos estudos. Ela foi fundamental para que tivéssemos sucesso no ingresso à pós-graduação e posteriormente foi igualmente dedicada ao me acompanhar e ensinar durante o estágio docência. A **Profa. Márcia**, foi companhia agradável durante todo o período em que estive em Botucatu.

Após a tão sonhada matrícula na pós da Patologia e início das disciplinas continuei morando em Ribeirão Preto e vinha a Botucatu algumas vezes por semana. Como não tinha nenhuma morada fui recebida por pessoas incríveis que não apenas abriram as portas de suas casas, mas principalmente de sua amizade.

Contei com várias pessoas nesse período. **Tio Francisco e tia Darcy**, me receberam com muito carinho, conversa e comida boa. Sempre preocupados e prestativos. Foi muito agradável a companhia deles e o fato de poder matar a saudade da família. No entanto, para não abusar demais de parentes, resolvi procurar abrigo também com amigos antigos de Jaboticabal e amigos novos de Botucatu. Hospedei-me provisoriamente na república da **Karina** e do **Pedro** e depois na da **Karina, Annelise, Vanessa e Cristiane**. Nestas adoráveis repúblicas pude, não apenas dormir, mas conviver e conhecer melhor pessoas que muito admiro e que trocaram comigo momentos de alegria e muito conhecimento.

Nessa temporada de disciplinas, fora os amigos que agradecerei a seguir, um em especial não pode ser deixado de lado. **Veronese**. Super companheiro de disciplinas, exímio conhecedor de patologia, especialmente melanoma, paciente, atencioso, um ótimo amigo. Saudades!

Mas já estava na hora de começar o experimento e deixar de aborrecer os outros. Mudei-me para Botucatu. Até este momento já havia tido o prazer de fazer amizade com grandes companheiros como o **Rodrigo**, o **Tony**, a **Tânia**, a **Merielen**, a **Clarissa**, a **Patrícia**, a **Marina**, a **Andréia** e a **Roueda**. Eles também eram e são “moradores” do Anexo, sala da pós-graduação, parte integrante do departamento de pós-graduação da patologia, porém separado fisicamente. No Anexo temos nossa infra-estrutura e espaço necessário para desenvolver a mente e o espírito.

Voltando à minha mudança ... olha quem foi me ajudar: o **Rodrigo** e o **Pedro**. Trabalho sujo. Carregar móveis, limpar sofá empoeirado..., tem que ser muito amigo mesmo!

Em Botucatu começaram os preparativos para o experimento. As amostras de cogumelo foram adquiridas com o **Prof. Dr. Augusto Ferreira da Eira**, que arrumou tempo para colhê-las, processá-las, me dar atenção e entregá-las antes do início da fase experimental.

Conheci o biotério e os técnicos **Paulo César (PC)** e **Glória**. Dedicados e sempre prestativos e bem-humorados. Aprendi com eles, **Tony** e **Rodrigo** a laboriosa tarefa de se lidar com animais de experimentação. O que tirei de melhor da fase experimental no biotério, porém, não foi nada técnico. Foi algo que não havia vivido antes e que me encantou: o trabalho em grupo.

Durante os sacrifícios, vários colegas são convidados a ajudar e não falta quem auxilie. Mesa cheia de pós-graduandos e alunos de iniciação científica que se dispõem a cooperar com colegas sem receber nada em troca. Assim, conheci e me aproximei de novos amigos, que fazem parte do Toxícam (Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana). **Alexandre, Bianca, Bruno, Carla, Cristiane, Glenda, João Paulo, Kelly, Luiza, Marcelo, Mariana, Marize, Meire, Mitscheli, Priscilla, Renata, Renato e Shádia**. Sempre prontos a ajudar, trocar idéias ou apenas bater papo.

Outra atividade que pude desenvolver no Toxícam foi a participação nas reuniões científicas. Presididas pelo **Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo** contribuíram para ampliar meu conhecimento em carcinogênese e toxicologia experimental além de estreitar a convivência com tão

brilhante pesquisador. Por ele foi me dada a oportunidade e liberdade de utilizar o laboratório e sua infra-estrutura, onde foram realizadas praticamente todas as fases do experimento.

No Toxícam também convivi com os técnicos **Mara e Paulo**, com a encantadora **Elaine**, e com a prestativa **Cristina**, os quais me auxiliaram muito. Nesse laboratório, sempre com ajuda de colegas, aprendi técnicas de laboratório, convivência em grupo e, especialmente com a ajuda do **Rodrigo**, do **Prof. Luís Fernando** e da **Profa. Tuca**, desenvolvemos a fase técnica do doutorado.

Ufa! Terminadas as disciplinas, entrei na reta final do experimento. Faltava, então, fazer o estágio docência. Além das professoras doutoras **Márcia Guimarães da Silva**, **Rosa Marlene Viero** e **Anete Kinumi Veda**, outro docente foi muito importante em meu aprendizado: o **Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira**. Ele cedeu seu precioso tempo para me ensinar e contribuir com minha formação e ainda me presenteou com sua amizade e generosidade.

No estágio docência na veterinária fui acolhida pelo **Prof. Dr. Carlos Roberto Teixeira**, pela **Profa. Dra. Sheila Canevese Rahal** e pela pós-graduanda **Carol**. Com esse estágio, e contribuição destes profissionais, aprendi muito sobre uma das coisas de que mais gosto na vida: técnica cirúrgica; certamente esse aprendizado será de grande valia em meu futuro profissional.

Vendo assim, parece que tudo é lindo na pós-graduação. Nem sempre! Amigos vão embora, nem tudo sai como previsto, o prazo para a conclusão vai chegando. Contudo, disso se tiram coisas boas. Amigos novos chegam. Como o **João**, que virou integrante do Anexo após a saída da Patrícia, Marina e Clarissa. Grande companheiro, bem humorado, nosso Harry Potter!

Com os imprevistos vêm ensinamentos e se encontram pessoas dispostas a ajudar. O **Luciano**, funcionário da secretaria do departamento, é um desses. Sempre auxiliando com um sorriso no rosto e muita dedicação. Os técnicos de laboratório **José Carlos e Ronaldo** que, mesmo atarefados, arrumaram tempo não só para ajudar, mas para fazê-lo com muito boa vontade, quando careci. A pós-graduanda **Juliana Ferreira da Silva** do Instituto de Biociências que, deixou sua pesquisa e afazeres de lado para me auxiliar com a imuno-histoquímica. E não poderia nunca deixar de lado a querida **Tânia**, secretária da PG e amiga que, por mais impossível que parecesse o pedido, sempre dava um jeito de conseguir resolver.

Outra experiência agradável foi conviver com funcionários educados e atenciosos na seção de pós-graduação: **Janete, Andrea, Lilian Nathanael e Regina**, e na Biblioteca.

Falando em prazo chegando ao fim, vem a conclusão da tese. Nesta fase, mais uma vez a **Profa. Tuca** me deu exemplo, a meu ver, de como um orientador deve ser. A confecção é sempre difícil e foi realizada a quatro mãos, sem pular uma linha.

A qualificação teve a contribuição inestimável da querida **Profa. Dra. Carla Adriene da Silva Franchi** e do **Prof. Dr. Júlio Lopes Sequeira**.

A versão final desta tese foi pacientemente revisada pela grande amiga e maravilhosa profissional **Vanessa Santos Spagnul**, para não deixar vírgulas e pontos em lugares desconexos nem erros embaraçosos que ficariam para posteridade.

Como se não bastasse abusar dos amigos, a família entrou na história. Minha querida irmã **Renata**, deixou seus afazeres de lado para criar a capa desta tese. Cuidou para que ficasse com a minha cara e prontinha para a impressão. Irmã prendada é outra coisa!

Finalmente a versão final. No entanto, não o fim dos agradecimentos. Considero-me uma pessoa de sorte e carrego comigo amigos de anos, alguns de uma vida toda e que, apesar de não terem contribuído diretamente nesta saga, são sempre fundamentais e peças-chaves em minha vida. Minhas amigas de berço: **Karin e Fernanda**. Amigos de infância: **Ana, Brito, Daniel, Léo e Lula**. Amigos de faculdade, pós e Ribeirão: **Regina, Elaine, Alê, Daniel, Francisco, Ana, Paula, Sandra, Sandra Regina, Alexandra, Pedro, Patrícia e Viviam**.

Agora sim chego à finalização, peço desculpas se me esqueci de alguém e agradeço, mais uma vez, a todos que contribuíram e fizeram parte deste trabalho.

Muito obrigada!

Este estudo recebeu o apoio financeiro das instituições:

Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

Fapesp (Fundação para o Desenvolvimento Médico e Hospitalar)

Toxicam (Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana)

Curso de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu,

Universidade Estadual Paulista - Unesp, Brasil

Criar não é chorar o que se perdeu e que não se pode recuperar, mas substituí-lo por uma obra tal que, ao construí-la, se reconstrói a si próprio.

(Sigmund Freud)

Sumário

<i>I. Introdução e Revisão de Literatura</i>	17
I.1 Câncer de Cólon	18
I.2 1,2-Dimetilhidrazina (DMH)	22
I.3 Criptas Aberrantes	23
I.4 <i>Agaricus blazei</i> Murrill	27
<i>II. Referências</i>	30
<i>III. Objetivos</i>	38
<i>IV. Manuscrito 1</i>	40
<i>V. Manuscrito 2</i>	72
<i>VI. Conclusões Gerais</i>	108

I. Introdução e Revisão de Literatura

I.1 Câncer do cólon

O cólon é uma das sedes mais frequentes de neoplasias malignas do organismo. Cerca de 70% das neoplasias malignas do trato gastrointestinal e 15% de todos os tumores malignos originam-se no cólon. O câncer de cólon e reto é de importância crescente como causa de morte por câncer nos EUA, Europa e Brasil (Fearon & Vogelstein, 1990; Hoel et al., 1992; Bruckner et al., 2000; Rodrigues et al, 2002). No mundo, os tumores malignos que acometem o cólon e o reto a cada ano somam cerca de 950 mil casos novos, sendo a quarta causa mais comum de câncer e a segunda em países desenvolvidos. Dados estatísticos recentes no Brasil demonstram que o câncer de cólon está entre as principais causas de morbimortalidade por câncer nas regiões Sudeste e Sul. Os números de casos novos estimados para o Brasil são de 25.360 novos casos em 2006 e a estimativa nos EUA é de 158.410 novos casos e 52.870 mortes para 2007 (Ministério da Saúde, 1999 e 2005; American Cancer Society, 2007).

A maioria das neoplasias malignas do intestino grosso são adenocarcinomas. Muitos se iniciam como pólipos adenomatosos. A progressão a partir de lesões microscópicas discretas, como os focos de criptas aberrantes ou de adenoma, para o carcinoma ocorre pelo acúmulo sequencial de alterações genéticas, que muitos consideram como o principal modelo para o entendimento da carcinogênese (Bruckner et al., 2000; Rodrigues et al, 2002). A carcinogênese ou oncogênese é um processo dinâmico, de múltiplas etapas, que envolve alterações celulares, moleculares e morfológicas, sustentadas por modificações na expressão de genes que coordenam atividades essenciais da célula, como proliferação, diferenciação e apoptose (Pitot, 1989, 1993; Sugimura, 1992; Sequeira, 1997; Ochiai et al, 2003; Agner, 2003). O processo de carcinogênese é dividido em quatro etapas: iniciação, promoção, progressão e manifestação. A etapa de iniciação corresponde ao dano permanente e irreversível do DNA da célula, levando à alteração do material genético (mutação). As alterações genótípicas podem permanecer latentes durante anos, até a etapa seguinte, a promoção, na qual ocorre proliferação celular e a expressão fenotípica da mutação induzida na iniciação. Durante a promoção, as células iniciadas são estimuladas a se dividir por fatores genéticos, hormonais ou mecânicos e, então, dar origem às lesões pré-neoplásicas. A principal característica desta fase é a reversibilidade. Na etapa de

progressão, a neoplasia é expressa fenotipicamente e evidenciada histologicamente, caracterizando-se pela instabilidade do genoma. As alterações estruturais verificadas nesta fase estão diretamente relacionadas à elevada taxa de proliferação celular, as capacidades de invasão e de produzir metástases e às alterações bioquímicas, que fornecem substrato biológico para a última etapa da carcinogênese, que é a manifestação clínica do câncer (Pitot, 1989, 1993; Sugimura, 1992; Agner, 2003; Alves de Lima, 2003; Rodrigues & Sequeira, 2006). A displasia, o tamanho do adenoma, a extensão do componente viloso, a multiplicidade e a idade avançada são fatores associados com alto potencial de malignidade (Bruckner et al., 2000; Rodrigues et al., 2002).

Embora a mucosa colônica normal se origine de várias células tronco e seja, portanto, policlonal, as neoplasias colo-retais têm composição monoclonal. Até mesmo o menor adenoma e o câncer mais precoce são monoclonais, sugerindo que os pólipos e cânceres tenham origem na expansão clonal de uma única célula tronco iniciada (Guillem et al, 1995). No câncer de cólon e reto, as alterações genéticas encontradas são: nos genes ras (principalmente K-ras), C-myc, C-src, p-53, DCC, MCC e APC; instabilidade de microssatélites no cromossomo 2 e desregulação de sinais da via de transdução como a proteína cinase C (Guillem et al, 1995; Kern & Kinzler, 1995).

Na última década foram vistos os maiores progressos no entendimento da etiologia da transformação neoplásica do epitélio gastrointestinal. Avanços no diagnóstico e tratamento têm importante papel no declínio da mortalidade, e a utilização de métodos para o diagnóstico precoce de lesões pré-malignas e malignas é uma das promessas de benefícios adicionais. A determinação de que o pólipo adenomatoso é um fenótipo pré-maligno para o adenocarcinoma colo-retal permitiu estudos epidemiológicos da ocorrência e progressão destes pólipos e isso começou a definir métodos de detecção para o tratamento dos pólipos como representantes precoces na prevenção do câncer (Bruckner et al., 2000; Fuku et al., 2007).

Especula-se que a inflamação tenha papel importante na carcinogênese do cólon por aumentar a atividade proliferativa da mucosa colônica e potencializar a possibilidade de erros da transcrição e as chances de tumorigênese, ou por promover o desenvolvimento tumoral, especialmente de lesões iniciais ou sub-clínicas (Shinozaki et al., 2006).

A carcinogênese do cólon também pode ser consequência patológica do estresse oxidativo persistente, resultando em danos do DNA e mutações em genes associados ao

câncer, interrupção do ciclo celular ou morte celular, mutação e regeneração na qual a produção excessiva celular de reativos de oxigênio e de espécies reativas de nitrogênio tem sido implicadas (Park et al., 2007).

Assim, pelo câncer de cólon se tratar de neoplasia de alta morbidade e mortalidade, medidas preventivas são soberanas para se minimizá-las. Evidências sugerem que dietas e componentes bioativos da dieta são prováveis de afetar o desenvolvimento do câncer de cólon e reto (Ross et al., 2006).

Há três décadas, hipóteses foram formuladas postulando o papel de dietas com altas taxas de gordura na etiologia do câncer colo-retal e do papel protetor das fibras na dieta. Embora o consumo de gorduras tenha sido prematuramente associado à incidência do câncer colo-retal, estudos subseqüentes também destacaram o consumo calórico total. Ademais, tem sido feita distinção entre o consumo de gordura animal saturada, que parece aumentar a incidência de câncer; óleos vegetais, que não têm efeito; e os altamente polinsaturados ômega-3 presentes no óleo de peixe, que parecem ter efeito protetor (Shike, 1995; Bruckner et al., 2000). A exposição à carcinógenos químicos presentes na carne cozida também é aceita como fator de risco para o câncer de cólon (Davis & Feng, 1999).

O aumento de gorduras na dieta pode causar o aumento da secreção de ácidos biliares secundários, ácido deoxicólico e ácido litocólico. Evidências são suportadas pelo fato de que altas quantidades de secreção de ácidos biliares fecais são encontradas em populações de alto risco, quando comparadas à população de baixo risco em múltiplos estudos de grupos demográficos diferentes nas últimas duas décadas. Estes ácidos biliares têm o potencial de serem promotores ou co-carcinogênicos. Alternativamente, eles podem agir com seus sais de sódio ou potássio e aumentar o pH intraluminal, que, isoladamente, é postulado como fator do aumento da atividade carcinogênica (Bruckner et al., 2000).

A relação inversa entre alto consumo de fibras e baixa taxa de câncer colo-retal geralmente permanece como verdade. Estudos subseqüentes encontraram efeito protetor máximo associado a fibras naturais, particularmente originárias de frutas e vegetais (Shike, 1995; Bruckner et al., 2000). Há algum benefício dos grãos, mas nenhum quando o consumo é de fibras sintéticas. A composição da dieta afeta a composição bioquímica do conteúdo fecal e, conseqüentemente, altera o ambiente para as células da mucosa colônica, mudando tanto a taxa como o padrão de sua proliferação (Bruckner et al., 2000). A dieta rica em fibras pode reverter as conseqüências bioquímicas adversas

que são geradas pelas gorduras saturadas e secundárias a ácidos biliares por reduzir os níveis de ácidos biliares fecais e o pH colônico, o qual aumenta a velocidade do trânsito fecal e, assim, diminui tanto o efeito por tempo de contato entre o carcinógeno do conteúdo fecal e a mucosa colônica como também o tempo viável para a flora intestinal agir no conteúdo fecal e gerar possíveis carcinógenos adicionais. O risco elevado de câncer de cólon é notado com a obesidade, baixa atividade física, dieta rica em açúcar refinado e dieta pobre em fibras (Shike, 1995; Bruckner et al., 2000).

O cálcio na dieta pode ter efeito protetor, pelo menos parcialmente, por converter sais biliares fecais ou ácidos graxos livres da dieta em sais insolúveis. Outros sais minerais, como o potássio e o sódio, também mostraram influenciar o desenvolvimento do câncer de cólon. Estudos encontraram redução significativa de câncer de cólon em regiões cuja água e solo contêm altas concentrações de potássio. Foi observado que o consumo elevado de sódio foi fator de alto risco para o câncer colo retal em machos, e alta taxa de consumo de potássio/sódio foi fator protetor em fêmeas (Bruckner et al., 2000). Evidências adicionais sugeriram baixas taxas de câncer observadas em pacientes com doenças que estão associadas com alto potássio intracelular tais como Addison, Parkinson e esquizofrenia. Verificou-se alta incidência de câncer em pacientes com doenças associadas a baixo potássio intracelular, tais como obesidade, alcoolismo, doença de Crohn e Cushing. Dietas ricas em fibras de vegetais e grãos inevitavelmente introduzem potássio e possivelmente promovem o aumento de potássio intracelular, e porque as dietas ricas em gordura têm efeito oposto, o poder protetor de altas taxas de potássio/sódio de forma independente fica como ponto incerto. O consumo de grandes quantidades de frutas e vegetais mostra, portanto, uma relação inversa ao risco de câncer de cólon, e isso em razão do aumento de fibras solúveis, alto potássio e efeito suposto de antioxidantes ou anticarcinógenos como os carotenóides, licopeno, ácido fólico e o alho ou seus constituintes ativos (Bruckner et al., 2000; Ross et al., 2006).

O consumo freqüente de álcool para mais de duas doses por dia e antecedentes de consumo de álcool dobram o risco de câncer de cólon assim como o uso do tabaco (Bruckner et al., 2000; Dias et al., 2006).

Até que outros resultados sejam conhecidos, as recomendações para a prevenção do câncer de cólon incluem atividade física regular e moderada, evitar a obesidade, redução calórica em estados obesos, redução de gordura da dieta em menos de 30% das

calorias totais, alto consumo de grãos, frutas e vegetais, e consumo de álcool modesto. (Bruckner et al, 2000; Fuku et al., 2007).

Em virtude da sua frequência e fácil acesso para investigação diagnóstica, o câncer de cólon têm sido um modelo de câncer bastante estudado. Estudos epidemiológicos, fisiológicos e de biologia molecular tem contribuído para o esclarecimento das causas e mecanismos envolvidos na gênese do câncer do cólon, bem como para referendar os paradigmas conceituais da oncogênese (Vogelstein et al., 1988; Fearon e Vogelstein, 1990; Bird et al., 1997).

1.2 1,2-Dimetilhidrazina (DMH)

Embora história familiar, hábitos alimentares e predisposição genética sejam amplamente aceitos como fatores de risco, a exposição à carcinógenos químicos tem sido investigada. (Feng et al, 1997)

Modelos experimentais, utilizando cancerígenos químicos, são adotados para estudar aspectos da oncogênese do cólon que não podem ser analisados em seres humanos. Além disso, os estudos experimentais permitem a observação detalhada das alterações que precedem o aparecimento da neoplasia maligna na macroscopia e histologia (Chang, 1978, 1982; Mayer et al., 1987).

A 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e seus metabólitos, tais como o azoximetano e o metilazoximetanol, são cancerígenos com alto grau de especificidade para o cólon, em várias espécies de roedores (Reddy et al., 1975; Lamont e O’Gorman, 1978; Rogers e Nauss, 1985). A DMH é um carcinógeno completo que induz a iniciação e promoção da carcinogênese, levando à formação de neoplasias visíveis macroscopicamente de forma dose dependente (Rodrigues et al, 2002). É considerada pró-cancerígeno por requerer ativação metabólica pelo hospedeiro, para que se torne cancerígeno ativo. A ativação metabólica da DMH envolve sua oxidação no fígado, originando o azometano, que sofre segunda oxidação gerando o azoximetano. Esse último, após hidroxilação por enzimas microsômicas hepáticas, resulta em metilazoximetanol que é quimicamente instável. Sua decomposição libera formaldeído, água e nitrogênio, além do agente alquilante metildiazonium, que é capaz de provocar metilação do DNA, RNA e outras proteínas. Seu modo de ação envolve interação com bases purinas dos ácidos nucleicos. Neste

processo, ocorre metilação da guanina em 7-metilguanina, levando à modificação do genoma das células alvo (Rodrigues & Sequeira, 2006).

A oncogenicidade da DMH é altamente específica para a mucosa do cólon de roedores. Tem como alvo as células epiteliais do compartimento proliferativo das criptas e a primeira alteração histológica identificável no processo de carcinogênese colônica é a substituição das células normais de uma cripta por células atípicas (Sequeira, 1997). A administração de doses repetidas de DMH leva à hiperplasia das criptas colônicas, que podem não regredir após a interrupção da administração da droga. Embora a hiperplasia das criptas possa preceder o câncer de cólon, ela não deve ser considerada como lesão pré-neoplásica em animais de experimentação. O primeiro passo no desenvolvimento neoplásico nos modelos experimentais que utilizam a DMH é o aparecimento de criptas ou focos de criptas displásicas na mucosa do cólon (Sequeira, 1997). Posteriormente há o aparecimento de múltiplos tumores que muito se assemelham aos tumores humanos em sua morfologia e comportamento (Sunter et al., 1978; Pozharisski et al., 1979; Sequeira, 1997).

Carcinomas do cólon induzidos pela DMH e seus derivados constituem atualmente um dos modelos mais utilizados na oncologia experimental para o estudo de vários aspectos da morfologia, patogênese, prevenção e tratamento do câncer do cólon. Assim, é possível estudar em roedores, sob condições experimentais controladas, a indução de câncer no cólon e a influência de fatores promotores ou inibidores no processo de oncogênese (Sequeira, 1997).

1.3 Criptas Aberrantes

Pela alta incidência dos tumores no cólon, é de grande interesse se identificar lesões precursoras das neoplasias colônicas em humanos. Estudos iniciais focaram principalmente na definição de alterações histológicas que precedem o desenvolvimento do câncer colo-retal o que levou ao desenvolvimento de conceitos de que a grande maioria dos carcinomas colo-retais se desenvolve via seqüência adenoma-carcinoma (Fenoglio-Preiser & Noffsinger, 1999). Estudos moleculares mostraram que as alterações genéticas seqüenciais acompanham a progressão das mudanças na mucosa que leva ao desenvolvimento do câncer colo-retal. Um importante achado foi o de que

alterações genéticas podem estar presentes na mucosa do cólon que ainda não mostrou alterações histológicas de neoplasia (Fenoglio-Preiser & Noffsinger, 1999).

Ao mesmo tempo que as pesquisas em humanos progrediam, investigações detalhadas em animais, principalmente roedores, procuravam por precursores morfológicos precoces do desenvolvimento do carcinoma em modelos de câncer de cólon experimentais (Fenoglio-Preiser & Noffsinger, 1999). Os estudos pioneiros sobre a histogênese do câncer do cólon em modelos animais, utilizando análises sequenciais de cortes histológicos da mucosa do cólon, identificaram criptas morfolologicamente alteradas nas fases iniciais da oncogênese (Chang, 1978, 1982; Mayer et al., 1987). Essas criptas volumosas e irregulares eram revestidas por epitélio displásico, que constitui uma característica chave do estado pré-neoplásico em sua morfologia. Posteriormente, elas foram reconhecidas no cólon de roedores tratados com cancerígenos químicos específicos, através de uma abordagem metodológica simples, que consistia do exame estereoscópico da mucosa do cólon corado com azul de metileno (Bird, 1987; McLellan e Bird, 1988). Designadas como focos de criptas aberrantes (FCAs), estas criptas morfolologicamente alteradas, podem ser encontradas isoladas ou em focos. Foram descritas primeiramente por Bird em 1987, e inicialmente acreditava-se estarem presentes somente na mucosa do cólon de roedores tratados com cancerígenos químicos (Bird, 1987, Alrawi et al., 2006). Vários estudos foram conduzidos para se estimar o número, tamanho e distribuição dos FCAs no cólon de roedores (Bird, 1987; Pretlow et al., 1991; Park et al., 1997). Posteriormente, os FCAs também foram encontrados na mucosa do cólon humano, especialmente em pacientes portadores de polipose familiar do cólon (Pretlow et al., 1991; Roncucci et al., 1991).

As criptas aberrantes são visualizadas nas primeiras semanas após exposição a cancerígenos químicos específicos como a dimetilhidrazina e o azoximetano (Bird, 1987; McLellan e Bird, 1988). São facilmente observadas ao exame estereoscópico do cólon corado com azul de metileno, giemsa ou azul de toluidina (Bird, 1995). Os FCAs têm sido propostos como marcadores morfológicos intermediários do câncer de cólon e utilizados em estudos experimentais como indicadores de indução neoplásica precoce (McLellan e Bird, 1988; Bird, 1995; Park et al., 1997).

As células que revestem os FCAs apresentam alterações bioquímicas, tais como redução da atividade da hexosaminidase, diminuição da produção de sulfomucinas e aumento da produção de sialomucinas (Whiteley et al., 1996). Em geral, a redução da produção de sulfomucinas e o aumento da produção de sialomucinas estão associados

ao aumento do grau de displasia e multiplicidade das criptas aberrantes (Fenoglio-Preiser & Noffsinger, 1999).

Estudos genéticos demonstram que os FCAs apresentam alta incidência de mutações no oncogene K-ras e instabilidade genômica nos *loci* de microsátélites e podem expressar mutações nos genes APC e beta-catenina e expressão excessiva de bcl-2 e proteína c-fos (Pretlow, 1995; Heinen et al., 1996; Alrawi et al, 2006 e Fuku et al, 2007). Em humanos, a mutação do gene APC é considerada o evento inicial no foco de cripta aberrante, seguida de mutações adicionais do K-ras em adenomas e p53 em carcinomas. Em roedores, a mutação da beta-catenina é freqüentemente observada em tumores de cólon e em FCA displásicas induzidas por agentes carcinógenos químicos. Mutações de K-ras e/ou APC são observadas ocasionalmente em roedores (Fuku et al., 2007). Tais características dos FCAs fortalecem a possibilidade de que possam representar a expressão mais inicial do desenvolvimento neoplásico em sua morfologia, podendo ser úteis como biomarcadores em estudos de modulação da oncogênese no cólon (Fenoglio-Preiser & Noffsinger, 1999).

Os FCAs são visualizados por macroscopia *en face* da mucosa colo-retal aberta. A técnica utiliza microscopia de baixo aumento e exame após coloração em azul de metileno. Eles se diferem das criptas normais por serem de tamanho levemente aumentado, volumosas, elevadas em relação à superfície mucosa adjacente e por se corarem mais fortemente em relação às criptas ao redor. Além disso, as criptas aberrantes são maiores que a cripta colônica normal, com uma distância reduzida entre elas (Fenoglio-Preiser & Noffsinger, 1999; Ochiai et al, 2003). Alguns FCAs, além de protuberantes, podem ser planos, côncavos, mas ainda permanecem corados mais fortemente que as criptas circunvizinhas, permitindo seu reconhecimento. Aspectos dos FCAs que podem ser avaliados pela topografia da mucosa colônica incluem: número, distribuição ao longo do comprimento do cólon (densidade = número de FCA/cm² de mucosa), tamanho (área ocupada por uma cripta aberrante: pequena < 50 criptas/foco; grande > 50 criptas/foco), forma (avaliação histológica) e multiplicidade (número de criptas que constituem cada foco). Os FCAs típicos têm lúmen plano e dilatado, a hiperplásica apresenta lúmen serrilhado e a displásica, aspecto estreito. A maioria dos FCAs encontra-se na porção final do intestino grosso (cólons descendente e sigmóide e no reto) (Fenoglio-Preiser & Noffsinger, 1999).

A atividade proliferativa é maior em alguns FCAs quando comparadas à mucosa normal. FCAs típicos têm índice mitótico normal, mas significativamente alto em FCAs

displásicos. Em criptas normais, a proliferação celular está restrita à base da cripta, e as mitoses são raras (Fenoglio-Preiser & Noffsinger, 1999).

O fator de crescimento TGF α e seu receptor, o Fator de crescimento epidérmico (EGF), estão envolvidos na regulação da diferenciação celular e proliferação e exercem importante papel na manutenção da integridade epitelial. A ligação do TGF α com o EGF estimula a proliferação celular epitelial. Estudos em animais transgênicos mostraram que a expressão excessiva do TGF α acelera o processo carcinogênico. Os FCAs em geral têm deficiência em expressão de TGF α , contrastando com a mucosa ao redor. Esse fato surpreende, não só pelo TGF α ser um potente mitogênico como pelas FCAs hiperplásicas e displásicas apresentarem proliferação aumentada. Esses achados sugerem que o controle dos fatores de crescimento é que estejam alterados ou anormais nos FCAs (Fenoglio-Preiser & Noffsinger, 1999).

Uma pequena porcentagem de criptas aberrantes é monoclonal. O padrão histológico que mostra monoclonalidade é o de displasia moderada ou atipia. A presença de monoclonalidade nos FCAs sugere que eles se desenvolvem de uma única célula iniciada. A identificação de monoclonalidade em suposta lesão precursora mostra vínculo da lesão com a progressão neoplásica (Fenoglio-Preiser & Noffsinger, 1999; Alrawi et al, 2006).

Vários estudos, principalmente em animais, propõem os FCAs como biomarcadores intermediários da carcinogênese do cólon. O número de lesões aumenta com a idade ou com o uso de certos carcinógenos. Cóloons que progridem com altos números de FCAs com elevada multiplicidade de criptas têm maior risco de desenvolverem câncer de cólon. A multiplicidade de criptas nos FCAs pode prever o desenvolvimento de tumores mais seguramente que o número total de FCAs (Fenoglio-Preiser & Noffsinger, 1999; Alrawi et al, 2006; Ross et al, 2006; Fuku et al, 2007; Stevens et al, 2007).

Os FCAs podem ser utilizados em modelos experimentais para o teste de substâncias quimioprotetoras da carcinogênese do cólon. Foi observada redução no número de FCAs em modelos experimentais de carcinogênese de cólon após tratamentos com cálcio, extratos de alho (AGE – aged garlic extract), cebola, B-polifermentais, arginina, AINES (antiinflamatórios não esteroidais), difluorometilornitina, extrato de urucum, chá verde, chá preto, amido e sais biliares (Wargovich, 1996; Fenoglio-Preiser & Noffsinger, 1999; Agner, 2003; Katsuki, 2006; Ross, 2006; Park, 2007; Taché, 2007).

Os FCAs constituem provavelmente estágio intermediário no desenvolvimento do câncer de cólon, mas apenas em tumores diferenciados do cólon distal e não nos pobremente diferenciados secretores de mucina do cólon proximal. Os tumores do cólon proximal provavelmente originam-se da sequência de “de novo” sem passar pelo estágio de displasia anteriormente ao desenvolvimento do carcinoma. Em contraste, os carcinomas do cólon médio e distal seguem a sequência FCA/adenoma/carcinoma e, portanto, os focos de criptas aberrantes podem ser utilizados como biomarcadores de risco para o câncer de cólon bem como para se avaliar o potencial bioativo e quimioprotetor de substâncias e dietas contra o câncer colo-retal (Fenoglio-Preiser & Noffsinger, 1999; Fuku et al, 2007).

I.4 *Agaricus blazei* Murrill

O cogumelo *Agaricus blazei* é um basidiomiceto originário da mata atlântica paulista. Ele foi descoberto pelo Dr. Takatoshi Furumoto, que observou uma população estatisticamente mais saudável nesta região, com baixa ocorrência de doenças geriátricas e câncer, quando comparadas à média da população (Delmanto, 2001; Luiz, 2002). Esse fungo, também conhecido como “cogumelo do sol”, foi levado ao Japão em 1965, onde foram iniciados os estudos sobre sua composição e uso terapêutico (Mizuno et al., 1990; Delmanto, 2001). O basidiocarpo fresco do *Agaricus blazei* Murrill é composto de 85% a 87% de água e, quando desidratado, é rico em proteínas (40% a 45%) e carboidratos (38% a 45%), apresentando, ainda, fibras alimentares (6% a 8%), lipídeos (3% a 4%) e vitaminas (Luiz, 2002).

Seu consumo pode ser feito na forma de cápsulas, de chás, de tinturas ou seco, adicionado a qualquer alimento. Popularmente tem sido recomendado como estimulante e coadjuvante no tratamento de diabetes, hepatite crônica, arteriosclerose, AIDS e câncer (Delmanto, 2001; Takaku et al., 2001; Barbisan, 2002; Luiz, 2002).

Vários pesquisadores atribuem a atividade antitumoral dos cogumelos à capacidade imunoestimuladora dos polissacarídeos, principalmente das beta-glucanas e dos compostos polissacarídeo-proteínas. Em 1989, Kawagishi et al. isolaram polissacarídeos e complexos polissacarídeo-proteínas do *Agaricus blazei* e sua atividade antitumoral foi demonstrada por Mizuno et al. em 1990.

Em estudos com suas frações, foi encontrada atividade antitumoral na glicoproteína FIII 2b, isolada do corpo de frutificação do cogumelo, com a inibição do crescimento do sarcoma 180 implantado em camundongos (Kawagishi et al., 1989; Delmanto, 2001). Tal fração não desencadeou sinais de toxicidade, posteriormente, foi utilizada por Itoh et al. (1994) e mostrou inibição do crescimento do fibrossarcoma Meth A, atuando como aditivo do efeito antineoplásico do 5-fluoruracil sobre este fibrossarcoma. Segundo os autores, a fração FIII 2b parece manifestar sua ação anticâncer de maneira indireta, pela ativação da resposta imunológica específica e não específica do hospedeiro. Outras frações como a IIa, IIb, IIc e IId, extraídas quimicamente do corpo de frutificação, apresentaram várias atividades biológicas e o ácido linoléico parece ser a substância responsável pela atividade antimutagênica da fração IIa (Barbisan, 2002).

Em 1997, foi testada a ação antimutagênica de um novo complexo protéico-polissacarídico (ATOM – substância orgânica antitumoral Mie), derivado do *Agaricus blazei*, em camundongos portadores de tumores. A ação antitumoral foi alcançada e creditada à ativação do sistema complemento e estimulação da atividade fagocítica, mas sem exercer ação citotóxica direta (Itoh et al., 1997). Fujimiya et al (1998) mostraram que, além de ativar o sistema imune, o cogumelo do sol possui uma proteoglicana solúvel (ATF – fração tratada a ácido), obtida do seu corpo de frutificação, que apresenta efeito antitumoral seletivo indireto, mediado por ativação de células “Natural Killer”, e também efeito seletivo direto *in vitro*, inibindo o crescimento de células tumorais pela indução da apoptose.

A função da fração lipídica do cogumelo foi estudada por Takaku et al. (2001) que demonstrou seu potencial inibidor do crescimento tumoral de forma semelhante ao obtido pela fração beta-glucana. Desta fração lipídica foi isolado o ergosterol, que embora não tenha apresentado efeito citotóxico sobre as células do sarcoma 180 *in vitro*, inibiu a angiogênese, promovendo a morte das células tumorais por impedir a neovascularização.

No Brasil, as pesquisas são recentes e, em sua maioria, com extratos aquosos do cogumelo *Agaricus blazei* Murrill. Lorenzo (2001) encontrou aumento da sobrevivência de camundongos portadores do tumor de Ehrlich após a administração oral dos extratos, no entanto eles não apresentaram capacidade de estimular *in vivo* sua ação “Natural killer”. Frantz (2001) observou o aumento da atividade linfoproliferativa de camundongos em

protocolo semelhante. Também utilizando extratos aquosos oralmente em camundongos, Delmanto (2001) avaliou o potencial antimutagênico de diferentes linhagens do cogumelo, *in vivo*, utilizando a ciclofosfamida e o N-etil-N-nitrosuréia como indutores do dano celular. Foi observado que os extratos apresentaram atividade antimutagênica, que pode contribuir para o efeito anticarcinogênico do cogumelo e que os componentes dos extratos não são distribuídos igualmente entre as linhagens, já que a linhagem AB99/26 não mostrou a atividade antimutagênica atingida pelas linhagens Ab96/07, 96/09 e 97/11 associadas. Em 2002, Luiz avaliou a atividade mutagênica e antimutagênica destes extratos *in vitro*, não sendo observados efeito mutagênico nem recombinogênico e ausência de ação protetora e antimutagênica de células CHO-xrs5, sugerindo atividade bio-antimutagênica dos extratos. Quando o órgão alvo do estudo foi o fígado, não foi observada atividade genotóxica ou carcinogênica em ratos Wistar (Barbisan, 2002 e Barbisan et al, 2002). Entretanto, foi mostrado por Barbisan et al (2003) que altas concentrações do extrato do cogumelo *Agaricus blazei* (11,5 mg/ml), em estudo sobre a hepatocarcinogenicidade, podem apresentar propriedades pró-cancerígenas com redução da eliminação de células com dano (menor taxa de apoptose/necrose de células hepáticas), levando à formação de maior número de lesões pré-neoplásicas no fígado.

Não há estudos *in vitro* ou *in vivo* sobre a ação do cogumelo *Agaricus blazei* na oncogênese do cólon. Assim, é de extrema importância que sejam feitas investigações sobre as propriedades medicinais do cogumelo *Agaricus blazei* sobre a mucosa colônica e retal.

*II. Referências**

*International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references [homepage on the Internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine; 2003 [last update 2003 July 09; cited 2005 Jun 01].

Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

National library of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 2003.

Agner AR. Atividade do extrato de urucum sobre a carcinogênese hepática e de cólon em ratos Wistar [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2003.

Alrawi, SJ, Carrol RE, Hill HC, Gibbs JF, Tan D, Brenner BM, et al. Genomic instability of human aberrant crypt foci measured by inter-(simple sequence repeat) PCR and array-CGH. *Mutat Res.* 2006; 601:30-8.

Alves de Lima RO. Efeito do extrato aquoso de própolis na carcinogênese de cólon de ratos Wistar [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2003.

American Cancer Society. Cancer facts & figures 2007. Atlanta: American Cancer Society; 2007.

Barbisan LF. Influência do extrato aquoso do cogumelo *Agaricus blazei* Murrill sobre o processo de hepatocarcinogênese química induzida pela dietilnitrosamina em ratos Wistar [Doutorado]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2002.

Barbisan LF, Miyamoto M, Scolastici C, Salvadori DM, Ribeiro LR, Eira AF, et al. Influence of aqueous extract of *Agaricus blazei* on rat liver toxicity induced by different doses of diethylnitrosamine. *J Ethnopharmacol.* 2002; 83:25-32.

Barbisan LF, Scolastici C, Miyamoto M, Salvadori DM, Ribeiro LR, Eira AF, et al. Effects of crude extracts of *Agaricus blazei* on DNA damage and on rat liver carcinogenesis induced by diethylnitrosamine. *Gen Molec Res.* 2003; 2:295-308.

Bird RP. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: Preliminary findings. *Cancer Lett.* 1987; 37:147-51.

Bird RP. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett.* 1995; 93:55-71.

Bird RP, Salo D, Lasko C, Good C. A novel methodological approach to study the level of specific protein and gene expression in aberrant crypt foci putative preneoplastic colonic lesions by Western Blotting and RT-PCR. *Cancer Lett.* 1997; 116:15-9.

Bruckner HW, Pitrelli J, Merrick M. Adenocarcinoma of the colon and rectum. In: Holland & Frei, editors. *Cancer Medicine*. 5 ed. Hamilton: BC Decker Inc; 2000. p. 1472-98.

Chang WWL. Histogenesis of symmetrical 1,2-dimethylhydrazine-induced neoplasms of the colon of mouse. *J Natl Cancer Inst.* 1978; 60:1405-18.

Chang WWL. Morfological basis of multistep process in experimental colonic carcinogenesis. *Virchows Arch Cell Pathol.* 1982; 41:17-37.

Davis CD, Feng Y. Dietary copper, manganese and iron affect the formation of aberrant crypt in colon of rats administered 3,2'-dimethyl-4-Aminobiphenyl. *J Nutr.* 1999; 129:1060-7.

Delmanto RD, Alves de Lima PL, Sugui MM, Eira AF, Salvadori DM, Speit G, et al. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. *Mutat Res.* 2001; 496:15-21.

Dias MC, Spinardi-Barbisan ALT, Rodrigues MAM, Camargo JLV, Terán E, Barbisan LF. Lack of chemopreventive effects of ginger on colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. *Food Chem Toxicol.* 2006; 44:877-84.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990; 61:759-67.

Feng Y, Fretland AJ, Rustan TD, Jiang W, Becker WK, Hein DW. Higher frequency of aberrant crypt foci in rapid then slow acetylator inbred rats administered the colon carcinogen 3,2'-Dimethyl-4aminobiphenyl. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997; 147:56-62.

Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger A. Aberrant crypt foci: A review. *Toxicol Pathol.* 1999; 27:632-42.

Frantz FG. Efeito de extrato de *Agaricus blazei* Murrill e *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler sobre a atividade linfoproliferativa de camundongos portadores do tumor de Ehrlich [Bacharel em ciências biológicas–modalidade médica] Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; 2001.

Fujimiya Y, Suzuki Y, Oshiman K, Kobori, H, Moriguchi K, Nakashima H, et al. Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from the basidiomycet, *Agaricus blazei* Murill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis. *Cancer Immunol Immunother.* 1998; 46:147-59.

Fuku N, Ochiai M, Terada S, Fujimoto E, Nakagama H, Tabata I. Effect of running training on DMH-induced aberrant crypt foci in rat colon. *Med Sci Sports Exerc.* 2007; 39:70-4.

Guillem JG, Paty PB, Rosen N. Molecular Biology of colorectal cancer. In: Collen AM, Winawer SJ editors. *Cancer of the colon, rectum, and anus*. New York: McGraw-Hill; 1995. p.149-8.

Heinen CD, Shivapurkar N, Tang Z, Groden J, Alabaster O. Microsatellite instability in aberrant foci from human colons. *Cancer Res.* 1996; 56:5339-41.

Hoel DG, Davis DL, Miller AB, Sondik EJ, Swerdlow AJ. Trends in cancer mortality in 15 industrialised countries, 1969-1986. *J Natl Cancer Inst.* 1992; 84:313-20.

Itoh H, Ito H, Amano H, Noda H. Inhibitory action of a (1→6)-β-D-glucan-protein complex (FIII-2-b) isolated from *Agaricus blazei* Murill (“Himematsutake”) on Meth A fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor mechanism. *Jpn J Pharmacol.* 1994; 66:265-71.

Itoh 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 mechanisms in tumor-bearing mice. *Anticancer Res.* 1997; 17(1A):277-84.

Katsuki T, Hirata K, Ishikawa H, Matsuura N, Sumi S, Itoh H. Aged garlic extract has chemopreventative effects on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumors in rats. *J Nutr.* 2006; 136:847S-51S.

Kawagishi H, Inagaki R, Kanao T, Mizuno T, Shimura K, Hagiwara T et al. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydr Res.* 1989; 186:267-73.

Kern SE, Kinzler KW. Molecular genetics of colorectal carcinoma. In: Rustgi AK. Editor. *Gastrointestinal cancers. Biology, diagnosis and therapy.* Philadelphia: Lippincott-Raven; 1995. p.413-22.

Lamont JT, O’Gorman TA. Experimental colon cancer. *Gastroenterology.* 1978; 75:1157-69.

Lorenzo JSF. Ação de extratos de *Agaricus blazei* Murrill e *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler sobre a sobrevivência e atividade “Natural killer” de camundongos portadores do tumor de Ehrlich [Bacharel em Ciências Biológicas – Modalidade Médica]. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; 2001.

Luiz RC. Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade de extratos aquosos e orgânicos do *Agaricus blazei* Murrill (cogumelo do sol) linhagem AB97/11, *in vitro* [Dissertação]. Londrina: Universidade Estadual de Londrina; 2002.

Mayer D, Trocheris V, Hacker HJ, Villard V, Murat JC, Bannasch P. Sequential histochemical and morphometric studies on preneoplastic and neoplastic lesions induced in rat colon by 1,2-dimethylhydrazine. *Carcinogenesis.* 1987; 8:155-61.

McLellan KR, Bird RP. Aberrant crypts : potential preneoplastic lesions in the murine colon. *Cancer Res.* 1988; 48:6187-92.

Ministério da Saúde. Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 1999.

Ministério da Saúde. Estimativa 2006: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2005.

Mizuno T, Hagiwara T, Nakamura T, Tro H, Shimura K, Sumiya T, et al. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from “Himematsutake”, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. Agric Biol Chem. 1990; 54:2889-96.

Ochiai M, Ushigome M, Fujiwara K, Ubagai T, Kawamori T, Sugimura T, et al. Characterization of dysplastic aberrant crypt foci in the rat colon induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. Am J Pathol. 2003; 163:1607-14.

Park HS, Goodlad RA, Wright NA. The incidence of aberrant crypt foci and colonic carcinoma in dimethylhydrazine-treated rats varies in a site-specific manner and depends on tumor histology. Cancer Res. 1997; 57:4507-10.

Park E, Jeon GI, Park JS, Paik HD. A probiotic strain of *Bacillus fermenticus* reduces DMH induced precancerous lesions in F344 male rat. Biol Pharm Bull. 2007; 30:569-74.

Pitot HC. Progression: the terminal stage in carcinogenesis. Jpn J Cancer Res. 1989; 80:599-607.

Pitot HC, Dragan YP. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. FASEB J. 1991; 5:2280-6.

Pozharisski KM, Likhachev AJ, Klimashevski VF, Shaposhnikov JD. Experimental intestinal cancer research with special reference to human pathology. Adv Cancer Res. 1979; 30:165-237.

Pretlow TP, Barrow BJ, Ashton WS, O'Riordan MA, Pretlow TG, Jurecsek JA et al. Aberrant crypts: preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res.* 1991; 51:1564-7.

Pretlow TP. Aberrant crypt foci and K-ras mutations: earliest recognized players or innocent bystanders in colon carcinogenesis? *Gastroenterology.* 1995; 108:600-3.

Reddy BS, Narisawa T, Wright P, Vukusich D, Weisburger JH, Wynder EL. Colon carcinogenesis with azoxymethane and dimethylhydrazine in germ-free rats. *Cancer Res.* 1975; 35(2):287-290.

Rodrigues MAM, Silva LAG, Salvatori DMF, Camargo JLV, Montenegro MR. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in wistar rats. *Braz J Med Biol Res.* 2002; 35:351-5.

Rodrigues MAM, Sequeira, JL. Modelos experimentais de câncer de cólon. In: Rhoden EL, Rhoden, CR, editores. *Princípios e técnicas em experimentação animal*. Porto Alegre: Editora da UFRGS; 2006. p. 299-313.

Rogers AE, Nauss KM. Rodent models for carcinoma of the colon. *Dig Dis Sci.* 1985; 30:875-1025.

Roncucci L, Stamp D, Medline A, Cullen JB, Bruce WR. Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon. *Hum Pathol.* 1991; 22:287-94.

Ross AS, Finley JW, Milner JA. Allyl sulfur compounds from garlic modulate aberrant crypt formation. *J Nutr.* 2006; 136:852-4.

Sequeira JL. Influência do processo de reparação de feridas cutâneas na carcinogênese química experimental do cólon no rato [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 1997.

Shike M. Dietary Factors - Fat, fibers and calories. In: Cohen AM, Winawer SJ, editors. Cancer of the colon, rectum and anus. New York: McGraw-Hill Inc; 1995. p. 35-40.

Shinozaki M, Watanabe T, Sato H, Nagawa H. Chronic colitis promotes tumor development. *Oncol Rep.* 2006; 15:1485-90.

Stevens RG, Swede H, Heinen C, Jablonski M, Grupka M, Ross B, et al. Aberrant crypt foci in patients with a positive family history of sporadic colorectal cancer. *Cancer Lett.* 2007; 248:262-8.

Sugimura T. Multistep carcinogenesis: a 1992 perspective. *Science.* 1992; 258:603-7.

Sunter JP, Appleton DR, Wright NA, Watson AJ. Pathological features of the colonic tumors induced in rats by the administration of 1,2 dimethylhydrazine. *Virchows Arch B Cell Pathol.* 1978; 29:211-28.

Taché S, Ladam A, Corpet DE. Chemoprevention of aberrant crypt foci in the colon of rats by dietary onion. *Eur J Cancer.* 2007; 43:454-8.

Takaku T, Kimura Y, Okuda H. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. *J. Nutr.* 2001; 131:1409-13.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med.* 1988; 319:525-32.

Wargovich, MJ, Chen CD, Jimenez A, Steele VE, Velasco M, Stephen LC, et al. Aberrant crypts as a biomarker for colon cancer - evaluation of potential chemopreventive agents in the rat. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1996; 5:355-60.

Whiteley LO, Hudson Jr L, Pretlow TP. Aberrant crypt foci in colonic mucosa of rats treated with a genotoxic and nongenotoxic colon carcinogen. *Toxicol Pathol.* 1996; 24:681-9.

III. Objetivos

O presente estudo foi delineado com a finalidade de investigar a possível participação do cogumelo *Agaricus blazei* Murrill, administrado pela dieta, no desenvolvimento de neoplasias no cólon, em modelo de carcinogênese induzido pela 1,2-dimetilhidrazina no rato.

1 - A participação do cogumelo na etapa de iniciação da oncogênese e na proliferação celular foi avaliada em protocolo experimental de quatro semanas (Manuscrito 1).

2 - A participação do cogumelo nas etapas de promoção e progressão do desenvolvimento neoplásico foi avaliada em protocolo experimental de vinte semanas (Manuscrito 2).

IV. Manuscrito 1

*Padronizado de acordo com as normas para publicação na revista *Toxicology*

**QUIMIOPREVENÇÃO DA ONCOGÊNESE DO CÓLON E RETO
PELO COGUMELO *Agaricus blazei* NO RATO**

**Liane Ziliotto¹, Luís Fernando Barbisan², Maria Aparecida Marchesan
Rodrigues*¹**

1. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina – Unesp, Botucatu – SP, Brasil

2. Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências – Unesp, Botucatu – SP, Brasil

*Correspondência: Maria Ap. Marchesan Rodrigues, Departamento de Patologia,
Faculdade de Medicina, Unesp, Botucatu-SP, Brasil. Telefone: 55 014 38116238.

E-mail: mariar@fmb.unesp.br

ABSTRACT

The mushroom *Agaricus blazei* is a member of a basidiomycetes family, native from Atlantic forest and known to exhibit antitumoral activity. In Brazil, the investigations on the possible chemopreventive action of this mushroom in cancer are still on beginning. Among the studied malignant tumors, the colon cancer research is of fundamental importance for representing one of the leading causes of death for cancer in Brazil. Experimental studies about colon cancer histogenesis identified morphologically changed crypts, named as aberrant crypt foci (ACF), which are biomarkers of colon oncogenesis. In this study our goal was to investigate the possible protective activity of the mushroom *Agaricus blazei*, administered through the diet, in the initiation phase of colon oncogenesis induced by 1, 2- dimethylhydrazine (DMH) in the rat. Were used male Wistar rats, divided in four groups. The G1 and G2 (control) groups received respectively commercial diet or diet with powder dry mushroom at 5%, for all trial. From the fifth day they got 1ml of EDTA, subcutaneously, twice a week, during two weeks. The G3 and G4 groups received respectively commercial diet and diet with powder dry mushroom at 5%, for all trial. From the fifth day they got 40mg/kg of DMH, subcutaneously, twice a week, during two weeks. All animals were euthanized at the end of the fourth week. The colon sections were stained with methylene blue at 0.1% for mucosal stereoscopic analysis and ACFs count. Samples of colon were submitted to histological sections and stained with H&E for ACFs score. Cell proliferation was analyzed immunohistochemically using the proliferative cell nuclear antigen (PCNA). No macroscopic lesions were found in the colon at necropsy. Control groups (G1 and G2) did not present ACFs. The DMH-treated groups (G3 and G4) presented few ACFs in the proximal colon, composed only by one crypt. In the medial and distal sections, the ACFs were mostly composed by one crypt and a maximum of four crypts. The histopathological exam of the different colon sections did not show any ACFs in the non-treated groups (G1 and G2) and rare ACFs were found in DMH-treated groups (G3 and G4). No statistical differences on the ACFs number were found between the DMH-treated groups (G3 and G4) at stereoscopic analysis and histopathological exam. *Agaricus blazei* intake did not change the PCNA labeling indices in the colonic mucosa. Thus, the mushroom *Agaricus blazei*, when administered in dry powder at 5%, did not show chemopreventive or inhibitory action against the initiation phase of colon carcinogenesis induced by DMH in rats.

Key words: cancer, colon, experimental carcinogenesis, *Agaricus blazei*, aberrant crypt foci, chemoprevention.

RESUMO

O cogumelo *Agaricus blazei* tem sido popularmente utilizado no tratamento de várias doenças, incluindo o câncer. No Brasil, as investigações sobre seu possível papel na quimioprevenção do câncer são recentes e não há informações sobre seus efeitos na oncogênese do cólon. O presente estudo foi delineado para investigar a participação do *Agaricus blazei*, administrado pela dieta, na etapa de iniciação da carcinogênese do cólon induzida pela 1,2-dimetilhidrazina (DMH) no rato. Utilizou-se o ensaio das criptas aberrantes (FCA) como biomarcador da oncogênese do cólon. Ratos Wistar machos foram distribuídos em quatro grupos. Os grupos G1 e G2 (controle) receberam respectivamente ração comercial peletizada e ração com cogumelo seco em pó a 5%, durante todo o experimento. A partir do décimo quinto dia receberam 1 ml de EDTA, via subcutânea, duas vezes por semana, durante duas semanas. Os grupos G3 e G4 receberam respectivamente ração comercial peletizada e ração com cogumelo seco em pó a 5%, durante todo o experimento. A partir do décimo quinto dia receberam 40 mg/kg de DMH, via subcutânea, duas vezes por semana, durante duas semanas. Todos os animais foram eutanasiados na quarta semana do experimento. Os segmentos de cólon e reto foram corados em solução de azul de metileno a 0,1% para análise estereoscópica da mucosa e contagem dos FCAs. Amostras do cólon e reto foram processadas para obtenção de cortes histológicos e coradas por HE para contagem dos FCAs. A atividade proliferativa das células epiteliais da mucosa do cólon foi estimada utilizando-se análise imuno-histoquímica da expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). À necropsia não foram encontradas lesões macroscópicas no cólon nem no reto. Os animais dos grupos não tratados com cancerígeno químico (G1 e G2) não apresentaram FCAs. Os grupos que receberam DMH (G3 e G4) apresentaram raros FCAs no cólon proximal, todos de uma cripta. Nos segmentos médio, distal e reto, os FCAs eram, em sua maioria, constituídos por uma cripta e, no máximo, por quatro criptas. A análise estereoscópica dos FCAs na mucosa do cólon e reto dos grupos tratados com DMH (G3 e G4) não mostrou diferença estatística entre o grupo que recebeu o cogumelo *Agaricus blazei* (G4) e seu respectivo grupo controle (G3). Ao exame histopatológico dos diferentes segmentos de cólon e reto não foram encontrados focos nos grupos não tratados com o cancerígeno (G1 e G2) e foram encontrados raros focos de criptas aberrantes nos grupos que receberam DMH (G3 e G4). A contagem dos FCAs não diferiu entre os grupos tratados com DMH. A exposição à DMH aumentou significativamente os índices de proliferação celular da mucosa do cólon. A administração do cogumelo a 5% na dieta não modificou as taxas de proliferação celular da mucosa do cólon, tanto no grupo tratado com DMH como no respectivo grupo controle. Portanto, estes resultados demonstram que o tratamento com o cogumelo *Agaricus blazei* a 5% pela dieta não conferiu proteção à etapa de iniciação da oncogênese do cólon e reto induzida pela DMH em ratos.

Palavras-chave: câncer, cólon, carcinogênese experimental, *Agaricus blazei*, focos de criptas aberrantes, quimioprevenção.

INTRODUÇÃO

O cogumelo *Agaricus blazei* é um basidiomiceto originário da mata atlântica paulista. Ele foi descoberto pelo Doutor Furumoto, que observou uma população estatisticamente mais saudável nesta região, com baixa ocorrência de doenças geriátricas e câncer, quando comparadas à média da população (Delmanto, 2001; Luiz, 2002). Pesquisadores acreditam que o cogumelo apresente atividade antitumoral e atribuem esta capacidade à ação imunoestimuladora dos polissacarídeos nele presentes, principalmente das beta-glucanas e dos compostos polissacarídeo-proteínas (Kawagishi et al., 1989; Mizuno et al., 1990; Itoh et al., 1997; Delmanto, 2001; Barbisan, 2002). Contudo, em 1998, Fujimiya e colaboradores mostraram que, além de ativar o sistema imune, o cogumelo possui uma proteoglicana solúvel obtida do seu corpo de frutificação que apresenta efeito antitumoral seletivo indireto, mediado por ativação de células “Natural Killer”, e também efeito seletivo *in vitro*, inibindo o crescimento de células tumorais pela indução da apoptose. No Brasil, as pesquisas são recentes, e o presente trabalho faz parte de um projeto temático (Fapesp Proc. 98/077'26-5) com a finalidade de investigar as propriedades do *Agaricus blazei* na proteção do desenvolvimento do câncer, mais especificamente no câncer de cólon.

A pesquisa do câncer do cólon é fundamental já que essas neoplasias malignas têm grande importância epidemiológica por representarem uma das principais causas de morte por câncer no Brasil e corresponderem a aproximadamente 70% das neoplasias malignas do trato gastrointestinal, com estimativa de mais de 25.000 novos casos para o ano de 2006 (Ministério da Saúde, 2005; Rodrigues e Sequeira, 2006). Na busca da melhor compreensão da gênese dos mecanismos envolvidos no câncer de cólon, são adotados modelos experimentais que permitem uma observação detalhada das alterações que precedem o aparecimento da neoplasia maligna em sua macroscopia e histologia (Volgelstein et al., 1988; Fearon e Vogelstein, 1990; Chang, 1984; Mayer et al., 1987). Os estudos pioneiros sobre a histogênese do câncer de cólon em modelos experimentais, utilizando análises sequenciais de cortes histológicos da mucosa do cólon, identificaram criptas morfológicamente alteradas nas fases iniciais da oncogênese (Chang, 1984; Mayer et al., 1987). Essas criptas volumosas e irregulares são revestidas por epitélio displásico, que constitui uma característica chave do estado pré-neoplásico (Bird, 1987; McLellan & Bird, 1988).

As criptas morfológicamente alteradas, isoladas ou em focos, foram designadas como criptas aberrantes (Bird, 1987). Os focos de criptas aberrantes (FCAs) têm sido propostos como marcadores morfológicos intermediários do câncer de cólon e utilizados em estudos experimentais como indicadores de indução neoplásica precoce (McLellan & Bird, 1988; Bird, 1995; Park et al., 1997). Esses focos são revestidos por células que apresentam alterações bioquímicas, tais como redução da atividade da hexosaminidase, diminuição da produção de sulfomucinas e aumento da produção de sialomucinas (Whiteley et al., 1996). Estudos genéticos demonstraram que os FCAs apresentam alta incidência de mutações no oncogene K-ras e instabilidade genômica nos *loci* de microsatélites. Tais características dos FCAs fortalecem a possibilidade de que possam representar a expressão mais inicial do desenvolvimento neoplásico, e ser úteis como biomarcadores em estudos de modulação da carcinogênese do cólon (Pretlow, 1995; Heinen et al., 1996).

O presente estudo foi delineado com a finalidade de investigar a possível influência do cogumelo *Agaricus blazei* Murrill, administrado pela dieta, na etapa de iniciação da oncogênese do cólon e reto, em modelo de carcinogênese do cólon induzido pela 1,2-dimetilhidrazina no rato.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais e ambiente experimental

Foram utilizados 30 ratos machos Wistar, pesando em média 160 g, com seis semanas de idade, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) - Unicamp, Campinas-SP, Brasil. Durante todo o experimento, os animais permaneceram no Biotério do Departamento de Patologia da FMB – Unesp, em salas com temperatura controlada a 22°C, umidade relativa ao redor de 55%, ciclos de luz/escuro de 12 horas e exaustão contínua.

Receberam ração comercial (Purina) e água filtrada *ad libitum*.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (protocolo nº. 366) da Faculdade de Medicina - Unesp, Botucatu-SP, Brasil.

2. Delineamento experimental e avaliações durante o experimento

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, com cinco animais nos grupos G1 e G2 e dez animais nos grupos G3 e G4, e na quarta semana do experimento, eles foram eutanasiados conforme esquema da Figura 1.

O peso dos animais foi avaliado semanalmente e o consumo de água e ração, a cada dois dias.

Protocolo experimental (modulação da fase de iniciação):

❖ Grupo 1 (controle negativo): Os animais receberam ração comercial peletizada, durante todo o experimento. A partir do décimo quinto dia foi aplicado 1 ml de EDTA, via subcutânea (SC), duas vezes por semana, durante duas semanas.

❖ Grupo 2: Os animais receberam ração comercial peletizada adicionada de cogumelo seco na forma de pó na concentração de 5%, durante todo o experimento. A partir do

décimo quinto dia foi aplicado 1 ml de solução de EDTA pela via SC, duas vezes por semana, durante duas semanas.

❖ Grupo 3 (controle positivo): Os animais receberam ração comercial peletizada, durante todo o experimento. A partir do décimo quinto dia foi aplicada solução de dimetilhidrazina (DMH) na dose de 40 mg/kg, SC, duas vezes por semana, durante duas semanas.

❖ Grupo 4: Os animais receberam ração comercial peletizada adicionada de cogumelo seco na forma de pó na concentração de 5%, durante todo o experimento. A partir do décimo quinto dia foi aplicada DMH na dose de 40 mg/kg, SC, duas vezes por semana, durante duas semanas.

3. Preparo de solução de 1,2-dimetilhidrazina

A solução de 1,2 dimetilhidrazina, adquirida da Tokyo Kasei Co, foi preparada pela diluição do cancerígeno químico em solução de EDTA (37 mg/100 ml de água destilada) na concentração de 400 mg/100 ml, no momento do uso. Foi utilizada dose de 40 mg/kg de peso corpóreo, administrada pela via subcutânea, durante duas semanas (duas doses por semana).

4. Preparo ração com o cogumelo *Agaricus blazei*

As amostras do cogumelo seco e pulverizado foram fornecidas pelo Prof. Dr. Augusto Ferreira da Eira, do Departamento de Produção Vegetal – Módulo de Cogumelos – Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp – Botucatu, SP (Brasil). O cogumelo seco e pulverizado (linhagem ABL 29 2003) foi adicionado e homogeneizado à ração comercial (Purina) na concentração de 5% (500 g cogumelo para 10 kg de ração) e processado para a forma peletizada. A ração peletizada adicionada do cogumelo foi armazenada em *freezer* até o momento do uso.

5. Necropsia dos animais, coleta e processamento do material

Os animais foram eutanasiados por injeção de pentobarbital sódico a 4% (45mg/kg de peso corpóreo), pela via intraperitoneal no final da quarta semana do experimento. À necropsia foi feita remoção de todo o cólon e reto, sua secção longitudinalmente, inspeção para observação da presença de alterações macroscópicas e lavagem em solução salina.

O cólon foi dividido em três segmentos identificados como: proximal, médio e distal e reto. Os segmentos foram acondicionados em folha de isopor, fixados em solução de formalina tamponada a 10% por período de 24 horas e, posteriormente, em álcool a 70% até o momento da análise.

6. Identificação e quantificação dos Focos de Criptas Aberrantes (FCAs)

Os segmentos de cólon e reto foram corados em solução de azul de metileno em PBS a 0,1% por 10 minutos para contagem dos focos de criptas aberrantes (FCAs). Os segmentos foram avaliados em microscópio de luz, em objetiva de 4x. Foram adotados os seguintes critérios para identificar e quantificar os FCAs (Bird, 1987):

- a) Foco constituído de uma única cripta: Caracterizado por cripta volumosa, pelo menos duas vezes o tamanho das criptas normais circunvizinhas, com revestimento epitelial espesso.
- b) Foco com duas ou mais criptas: Caracterizado por criptas volumosas, ovais ou elípticas, dispostas em blocos sem criptas normais no interior dos blocos.

Foi feita análise estereoscópica de campos sucessivos da mucosa do cólon e reto, para quantificação do número de FCAs por unidade de área (cm^2), bem como do número de criptas por FCA (multiplicidade de criptas por FCA).

7. Análise histopatológica dos Focos de Criptas Aberrantes

Amostras de segmentos do cólon e reto foram processadas para obtenção de cortes histológicos e coradas pela hemotoxilina e eosina (HE).

8. Índice de proliferação celular

A atividade proliferativa das células epiteliais da mucosa do cólon foi estimada utilizando-se análise imuno-histoquímica da expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) pelo método da biotina streptavidina marcada (KIT LSAB DAKO). Após desparafinização, os cortes histológicos foram incubados com o anticorpo primário anti-PCNA, na diluição de 1/100 (Novocastra, UK) em tampão 0,05 M Tris-HCl (pH 7,6) a 4°C, *overnight*. A seguir os cortes histológicos foram lavados em água destilada por 10 minutos e imersos em solução de PBS contendo o conjugado streptavidina-peroxidase, na diluição de 1/100 a 37°C durante 30 minutos. Os cortes histológicos foram lavados em solução de PBS e a atividade da peroxidase foi visualizada com diaminobenzidina e água oxigenada durante 7 minutos; a contra-coloração foi feita com Hematoxilina de Harris.

Para a determinação do índice de proliferação celular (índice de marcação pelo PCNA) foram examinadas 20 criptas perpendiculares na mucosa do cólon médio em cada animal, à microscopia óptica, com objetiva de 400x. Foram estimados em cada cripta, partindo-se da base em direção ao ápice da cripta, o número de células epiteliais e o número de núcleos corados em marrom (núcleos marcados pelo PCNA). A taxa de proliferação celular foi calculada como a porcentagem de células com núcleos corados em marrom em relação ao número de células epiteliais de cada cripta.

9. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se do Programa Jandel Sigma Stat® versão 2.0. Os dados de ganho de peso corpóreo, consumo de ração e consumo de cogumelo foram avaliados pelo teste da Análise de Variância para Experimentos Inteiramente Aleatorizados (EIA) para amostras independentes. A análise das proporções de ocorrência do número de criptas aberrantes, FCAs, e de criptas por FCA nos diferentes grupos foram comparadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (Zar, 1999) para amostras independentes. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

RESULTADOS

Pela análise de variância, não houve diferenças significativas entre os grupos (Tabela 1).

À necropsia foi realizada ressecção de todo o cólon e reto. Não foram encontradas lesões macroscópicas, com ausência de nodulações em todos os animais. Os cólons e reto de cada animal foram classificados e examinados à microscopia óptica, corados com azul de metileno a 0,1% e divididos como cólon proximal, cólon médio e cólon distal e reto. Os focos de criptas aberrantes foram observados e contados em toda extensão do cólon e reto. As criptas aberrantes foram identificadas por observação estereoscópica e distinguidas das criptas normais por apresentarem aumento de tamanho, forma elíptica e coloração azul mais acentuada (Figura 2).

Não foram encontradas criptas aberrantes nos animais dos grupos não tratados com cancerígeno químico (G1 e G2). Nos grupos que receberam a DMH (G3 e G4) foram notados raros focos no cólon proximal, todos de uma cripta, e nos cólons médio e cólon distal e reto os focos eram, em sua maioria, constituídos por uma cripta e, no máximo, por três criptas.

Nos cólons proximal, médio e distal e reto o número de focos de criptas aberrantes (FCA), o número de criptas aberrantes (CA) e as criptas aberrantes por focos (CA/FCA), não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados com o agente cancerígeno (Tabela 2 a 4).

O exame histopatológico dos diferentes segmentos de cólon e do reto corados pela hematoxilina e eosina revelou ausência de focos nos grupos não tratados com o cancerígeno (G1 e G2) e raros focos de criptas aberrantes nos grupos que receberam a DMH (G3 e G4). A contagem dos FCAs não diferiu entre os grupos tratados com a DMH.

Os índices de proliferação celular pelo PCNA na mucosa do cólon nos diferentes grupos experimentais são apresentados na Tabela 5 e na Figura 3. O grupo tratado com DMH (G3) apresentou aumento significativo da taxa de proliferação celular (Figura 4) quando comparado ao respectivo grupo controle não iniciado (G1). A administração do *Agaricus blazei* a 5% na dieta não modificou as taxas de proliferação das células epiteliais da mucosa do cólon tanto no grupo tratado com DMH (G4) como no grupo não iniciado (G2).

DISCUSSÃO

A DMH é um dos agentes genotóxicos mais freqüentemente utilizados em modelos experimentais de carcinogênese do cólon em roedores. É um carcinógeno completo, que induz a iniciação e promoção da carcinogênese levando à formação de neoplasias visíveis macroscopicamente de forma dose dependente (Rodrigues et al., 2002). Há o desenvolvimento de múltiplos tumores na mucosa do cólon que muito se assemelham aos tumores humanos em sua morfologia e comportamento. Assim, é possível estudar em roedores, sob condições experimentais controladas, a indução de câncer no cólon e reto e a influência de fatores promotores ou inibidores no processo de oncogênese. A oncogenicidade da DMH é altamente específica para a mucosa colo-retal de roedores. Tem como alvo as células epiteliais do compartimento proliferativo das criptas, e a primeira alteração histológica identificável no processo de carcinogênese colônica é a substituição das células normais de uma cripta por células atípicas (Sequeira, 1997). As lesões iniciais das criptas são consideradas como precursoras do câncer de cólon e denominadas de criptas aberrantes (Alrawi et al., 2006). Os focos de criptas aberrantes foram descritos inicialmente por Bird, em 1987, e caracterizadas como criptas volumosas, elevadas em relação à mucosa adjacente e mais densamente coradas pelo azul de metileno que as criptas normais (Ochiai et al., 2003). Estudos mais recentes mostraram que as criptas aberrantes podem expressar alterações como mutações nos genes APC, K-ras e b-catenina e overexpressão de bcl-2 e proteína c-fos (Alrawi et al., 2006 e Fuku et al., 2007).

No presente estudo foi avaliado o potencial do cogumelo *Agaricus blazei* em inibir o processo de iniciação da oncogênese do cólon e reto induzida pela DMH. Os focos de criptas aberrantes foram utilizados com biomarcadores morfológicos da oncogênese do cólon. Não foram encontradas criptas aberrantes nos grupos não tratados com o cancerígeno químico, o que indica que o cogumelo na concentração de 5% e administrado oralmente na forma de pó não exerce ação iniciadora da carcinogênese do cólon. Esses resultados se somam a estudos com frações e extratos do cogumelo em que não se identificou atividade mutagênica em cultura de células (Luiz, 2002), nem atividade genotóxica ou carcinogênica em fígado de ratos Wistar (Barbisan, 2002 e Barbisan et al, 2002). Porém, esses resultados não implicam na aceitação do uso indiscriminado de produtos fitoterápicos como o cogumelo. Foi demonstrado por

Barbisan et al (2003) que altas concentrações do extrato do cogumelo *Agaricus blazei* (11,5 mg/ml), em estudo sobre a hepatocarcinogenicidade, podem apresentar propriedades pró-cancerígenas no fígado com redução da eliminação de células com dano (menor taxa de apoptose/necrose de células hepáticas), levando à formação de maior número de lesões pré-neoplásicas no fígado. No cólon e reto, o *Agaricus* não se mostrou indutor nem protetor da oncogênese. Nos animais tratados com o cancerígeno, o cogumelo não alterou a formação de lesões pré-neoplásicas de forma significativa quando comparado com seu grupo controle, tanto na avaliação estereoscópica da mucosa colo-retal corada pelo azul de metileno quanto na análise dos cortes histológicos em HE.

Diferentemente do observado no cólon, em outros órgãos alvo e em pesquisas *in vitro*, o cogumelo *Agaricus blazei* apresentou atividade antitumoral. Vários pesquisadores atribuem a atividade antitumoral dos cogumelos à capacidade imunoestimuladora dos polissacarídeos, principalmente das beta-glucanas e dos compostos polissacarídeo-proteínas. Em 1989, Kawagishi et al. isolaram polissacarídeos e complexos polissacarídeo-proteínas do *Agaricus blazei* e sua atividade antitumoral foi demonstrada por Mizuno et al. em 1990.

Em estudos com as frações do *Agaricus blazei*, foi encontrada atividade antitumoral na glicoproteína FIII 2b, isolada do corpo de frutificação do cogumelo, com a inibição do crescimento do sarcoma 180 implantado em camundongos (Kawagishi et al., 1989; Delmanto, 2001). Tal fração não desencadeou sinais de toxicidade e foi, posteriormente, utilizada por Itoh et al. (1994) e mostrou inibição do crescimento do fibrossarcoma Meth A, atuando ainda como aditivo do efeito antineoplásico do 5-fluoruracil sobre este fibrossarcoma. Segundo os autores, a fração FIII 2b parece manifestar sua ação anticâncer de maneira indireta, pela ativação da resposta imunológica específica e não específica do hospedeiro. Outras frações como a IIa, IIb, IIc e IId, extraídas quimicamente do corpo de frutificação, apresentaram várias atividades biológicas, e o ácido linoléico parece ser a substância responsável pela atividade antimutagênica da fração IIa (Barbisan, 2002).

Em 1997, foi testada a ação antimutagênica de um novo complexo protéico-polissacarídico (ATOM – substância orgânica antitumoral Mie), derivado do *Agaricus blazei*, em camundongos portadores de tumores. A ação antitumoral foi alcançada e creditada à ativação do sistema complemento e estimulação da atividade fagocítica, mas

sem exercer ação citotóxica direta (Itoh et al., 1997). Fujimiya et al (1998) mostraram que, além de ativar o sistema imune, o cogumelo *Agaricus blazei* possui uma proteoglicana solúvel (ATF – fração tratada a ácido), obtida do seu corpo de frutificação, que apresenta efeito antitumoral seletivo indireto, mediado por ativação de células “Natural Killer”, e também efeito seletivo direto *in vitro*, inibindo o crescimento de células tumorais pela indução da apoptose.

A função da fração lipídica do cogumelo foi estudada por Takaku et al. (2001), que demonstraram seu potencial inibidor do crescimento tumoral de forma semelhante ao obtido pela fração beta-glucana. Dessa fração lipídica foi isolado o ergosterol, que não apresentou efeito citotóxico sobre as células do sarcoma 180 *in vitro*, porém inibiu a angiogênese, promovendo a morte das células tumorais por impedir a neovascularização.

No Brasil, as pesquisas são recentes e, em sua maioria, com extratos aquosos do cogumelo *Agaricus blazei* Murrill. Lorenzo (2001) encontrou aumento da sobrevivência de camundongos portadores do tumor de Ehrlich após a administração oral dos extratos, porém eles não apresentaram capacidade de estimular *in vivo* sua ação “Natural killer”. Frantz (2001) observou o aumento da atividade linfoproliferativa de camundongos em protocolo semelhante. Delmanto (2001), utilizando extratos aquosos em camundongos, avaliou o potencial antimutagênico de diferentes linhagens do cogumelo, *in vivo*, utilizando a ciclofosfamida e o N-etil-N-nitrosuréia como indutores do dano celular. Foi observado que os extratos apresentaram atividade antimutagênica que pode contribuir para o efeito anticarcinogênico do cogumelo e que os componentes dos extratos não são distribuídos igualmente entre as linhagens, já que a linhagem AB99/26 não mostrou a atividade antimutagênica atingida pelas linhagens Ab96/07, 96/09 e 97/11 associadas. Em 2002, Luiz avaliou a atividade mutagênica e antimutagênica destes extratos *in vitro*, não sendo observados efeito mutagênico ou recombinogênico e nem ação protetora e antimutagênica de células CHO-xrs5, sugerindo atividade bioantimutagênica dos extratos.

O cogumelo é popularmente consumido na forma de cápsulas (pó), de chás, de tinturas ou seco, adicionado a qualquer alimento. Recomendado como estimulante e coadjuvante no tratamento de diabetes, hepatite crônica, arteriosclerose, AIDS e câncer (Delmanto, 2001; Takaku et al., 2001; Barbisan, 2002; Luiz, 2002). No entanto, a maioria dos trabalhos estuda o efeito de suas frações e poucos estudos investigam seus

efeitos na forma de pó. Não há estudos *in vitro* ou *in vivo* sobre a ação do *Agaricus* na oncogênese do cólon e reto.

O aumento da proliferação celular é condição importante na oncogênese humana e experimental (Chang et al., 1997). Os resultados do presente estudo demonstraram que a exposição à DMH aumentou significativamente a proliferação celular na mucosa do cólon, tal como observado pelo aumento dos índices de marcação pelo PCNA nas células epiteliais expostas ao cancerígeno químico. A administração do cogumelo a 5% na dieta não modificou as taxas de proliferação celular da mucosa do cólon tanto no grupo tratado com DMH como no respectivo grupo controle não iniciado. Portanto, nossos resultados demonstraram que o tratamento com o cogumelo *Agaricus blazei* a 5% pela dieta não interferiu sobre a atividade proliferativa das células epiteliais da mucosa do cólon e reto.

Assim, os dados encontrados neste trabalho mostram que os efeitos protetores alcançados em estudos *in vitro* e *in vivo* não se reproduzem em casos de câncer de cólon e reto.

A ausência de inibição da iniciação ou falha na proteção da carcinogênese do cólon pode ser atribuída à perda ou degradação de compostos bio-ativos e termo-lábeis durante o processo de secagem e desidratação do cogumelo (Luiz, 2002). Outra possibilidade é que os compostos bioativos do cogumelo não tenham conseguido atingir a mucosa colo-retal por degradação durante o processo de digestão no intestino delgado. Entretanto, o consumo mais freqüente é do *Agaricus blazei* em cápsulas (pó) e chás tanto em humanos como em animais e, assim, os resultados deste estudo são de grande importância, por mimetizarem e esclarecerem os efeitos de sua ação sobre a iniciação do câncer de cólon e reto.

Em síntese, os resultados do presente estudo são relevantes por mimetizarem a via habitual de exposição ao cogumelo, tanto em humanos como em animais, que é a via oral, sob a forma de cápsulas (pó) e chás. Nossos dados esclarecem sobre a falta de eficácia do cogumelo *Agaricus blazei*, quando administrado pela dieta, na proteção da etapa de iniciação da carcinogênese do cólon.

CONCLUSÕES

1) O cogumelo *Agaricus blazei* administrado oralmente na forma de pó, na concentração de 5%, não mostrou ação iniciadora de lesões pré-neoplásicas no cólon e reto de ratos Wistar machos.

2) O cogumelo *Agaricus blazei* administrado pela dieta, na forma de pó, na concentração de 5%, não interferiu sobre a atividade proliferativa das células epiteliais da mucosa do cólon, tanto no grupo exposto ao cancerígeno químico, como no respectivo controle.

3) O cogumelo *Agaricus blazei* administrado oralmente na forma de pó, na concentração de 5%, não mostrou ação inibidora ou protetora da etapa de iniciação do câncer de cólon e reto induzido pela DMH em ratos Wistar machos.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Famesp (Fundação para o Desenvolvimento Médico e Hospitalar) e Toxicam (Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana).

Ao Prof. Dr. Augusto Ferreira da Eira pelo fornecimento das amostras de cogumelo.

REFERÊNCIAS

Alrawi, S.J., Carrol R.E., Hill, H.C., Gibbs, J.F., Tan, D., Brenner, B.M., Nowak, N.J., Swede, H., Stoler, D.L., Anderson, G.R., 2006. Genomic instability of human aberrant crypt foci measured by inter-(simple sequence repeat) PCR and array-CGH. *Mutat Res.* 601, 30-38.

Barbisan, L.F. Influência do extrato aquoso do cogumelo *Agaricus blazei* Murrill sobre o processo de hepatocarcinogênese química induzida pela dietilnitrosamina em ratos Wistar [Doutorado]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2002.

Barbisan, L.F., Miyamoto, M., Scolastici, C., Salvadori, D.M., Ribeiro, L.R., Eira, A.F., Camargo, J.L., 2002. Influence of aqueous extract of *Agaricus blazei* on rat liver toxicity induced by different doses of diethylnitrosamine. *J Ethnopharmacol.* 83, 25-32.

Barbisan, L.F., Scolastici, C., Miyamoto, M., Salvadori, D.M., Ribeiro, L.R., Eira, A.F., Camargo, J.L., 2003. Effects of crude extracts of *Agaricus blazei* on DNA damage and on rat liver carcinogenesis induced by diethylnitrosamine. *Gen Molec Res.* 2, 295-308.

Bird, R.P., 1987. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: Preliminary findings. *Cancer Lett.* 37, 147-151.

Bird, R.P., 1995. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett.* 93, 55-71.

Chang, W.W.L, 1984. Histogenesis of colon cancer in experimental animals. *Scand J Gastroenterol.* 104, 27-43.

Chang, W.L., Chapkin, R.S., Lupton, J.R., 1997. Predictive value of proliferation, differentiation and apoptosis as intermediate markers for colon tumorigenesis. *Carcinogenesis.* 18, 721-730.

Delmanto, R.D., Alves de Lima, P.L., Sugui, M.M., Eira, A.F., Salvadori, D.M., Speit, G., Ribeiro, L.R., 2001. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. *Mutat Res.* 496, 15-21.

Fearon, E.R., Vogelstein, B., 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 61, 759-767.

Frantz, F.G. Efeito de extrato de *Agaricus blazei* Murrill e *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler sobre a atividade linfoproliferativa de camundongos portadores do tumor de Ehrlich [Bacharel em Ciências Biológicas – Modalidade Médica] Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; 2001.

Fujimiya, Y., Suzuki, Y., Oshiman, K., Kobori, H., Moriguchi, K., Nakashima, H., Matumoto, Y., Takahara, S., Ebina, T., Katakura, R., 1998. Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from the basidiomycet, *Agaricus blazei* Murill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis. *Cancer Immunol Immunother.* 46, 147-59.

Fuku, N., Ochiai, M., Terada, S., Fujimoto, E., Nakagama, H., Tabata, I., 2007. Effect of running training on DMH-induced aberrant crypt foci in rat colon. *Med Sci sports Exercise.* 39, 70-74.

Heinen, C.D., Shivapurkar, N., Tang, Z., Groden, J., Alabaster, O., 1996. Microsatellite instability in aberrant foci from human colons. *Cancer Res.* 56, 5339-5341.

Itoh, H., Ito, H., Amano, H., Noda, H., 1994. Inhibitory action of a (1→6)-β-D-glucan-protein complex (FIII-2-b) isolated from *Agaricus blazei* Murill (“Himematsutake”) on Meth A fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor mechanism. *Jpn J Pharmacol.* 66, 265-71.

Itoh, H., Shimura, K., Itoh, H., Kawade, M., 1997. Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade strain 101) “Himematsutake” and its mechanisms in tumor-bearing mice. *Anticancer Res.* 17(1A), 277-84.

Kawagishi, H., Inagaki, R., Kanao, T., Mizuno, T., Shimura, K., Hagiwara, T., Nakamura, T., 1989. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. Carbohydr Res. 186, 267-73.

Lorenzo, J.S.F. Ação de extratos de *Agaricus blazei* Murrill e *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler sobre a sobrevivência e atividade “Natural killer” de camundongos portadores do tumor de Ehrlich [Bacharel em Ciências Biológicas – Modalidade Médica]. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; 2001.

Luiz, R.C. Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade de extratos aquosos e orgânicos do *Agaricus blazei* Murrill (cogumelo do sol) linhagem AB97/11, *in vitro* [Dissertação]. Londrina: Universidade Estadual de Londrina; 2002.

Mayer, D., Trocheris, V., Hacker, H.J., Villard, V., Murat, J.C., Bannasch, P., 1987. Sequential histochemical and morphometric studies on preneoplastic and neoplastic lesions induced in rat colon by 1,2-dimethylhydrazine. Carcinogenesis. 8, 155-161.

McLellan, K.R., Bird, R.P., 1998. Aberrant crypts : potential preneoplastic lesions in the murine colon. Cancer Res. 48, 6187-6192.

Ministério da Saúde. Estimativa 2006: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2005.

Mizuno, T., Hagiwara, T., Nakamura, T., Tro, H., Shimura, K., Sumiya, T., Inagaki, R., Kanao, T., Ixo, H., Asakura, A., 1990. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from “Himematsutake”, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murrill. Agric Biol Chem. 54, 2897-2905.

Ochiai, M., Ushigome, M., Fujiwara, K., Ubagai, T., Kawamori, T., Sugimura, T., Nagao, M., Nakagama, H., 2003. Characterization of dysplastic aberrant crypt foci in the rat colon induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. Am J Pathol. 163, 1607-14.

Park, H.S., Goodlad, R.A., Wright, N.A., 1997. The incidence of aberrant crypt foci and colonic carcinoma in dimethylhydrazine-treated rats varies in a site-specific manner and depends on tumor histology. *Cancer Res.* 57, 4507-4510.

Pretlow, T.P., 1995. Aberrant crypt foci and K-ras mutations: earliest recognized players or innocent bystanders in colon carcinogenesis? *Gastroenterology*. 108, 600-603.

Rodrigues, M.A.M., Silva, L.A.G., Salvatori, D.M.F., Camargo, J.L.V., Montenegro, M.R., 2002. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. *Braz J Med Biol Res.* 35, 351-55.

Rodrigues, M.A.M., Sequeira, J.L., 2006. Modelos experimentais de câncer de cólon. In: Rhoden EL, Rhoden, CR, editores. *Princípios e técnicas em experimentação animal*. Porto Alegre: Editora da UFRGS. p. 299-313.

Sequeira, J.L. Influência do processo de reparação de feridas cutânea na carcinogênese química experimental do cólon no rato [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 1997

Takaku, T., Kimura, Y., Okuda, H., 2001. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. *J. Nutr.* 131, 1409-13.

Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M., Bos, J.L., 1988. Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med.* 319, 525-32.

Whiteley, L.O., Hudson, Jr. L., Pretlow, T.P., 1996. Aberrant crypt foci in colonic mucosa of rats treated with a genotoxic and nongenotoxic colon carcinogen. *Toxicol Pathol.* 24, 681-689.

Zar, J.H., 1999. *Biostatistical analysis*. 4^a Ed. New Jersey: Prentice-Hall.

Legendas de figuras

Figura 1: Protocolo experimental para avaliação da quimioprevenção da carcinogênese do cólon do cogumelo *Agaricus blazei* em ratos Wistar machos.

Figura 2: Focos de criptas aberrantes (criptas volumosas, pelo menos duas vezes o tamanho das criptas normais circunvizinhas, com revestimento epitelial espesso). (A) 20x (B) 4x. Azul de metileno 0,1%.

Figura 3: Índices de marcação pelo PCNA nas células epiteliais do cólon nos diferentes grupos experimentais.

Figura 4: Expressão imunohistoquímica do PCNA (núcleos marrons) em corte histológico de cripta do cólon (400x).

Figura 1

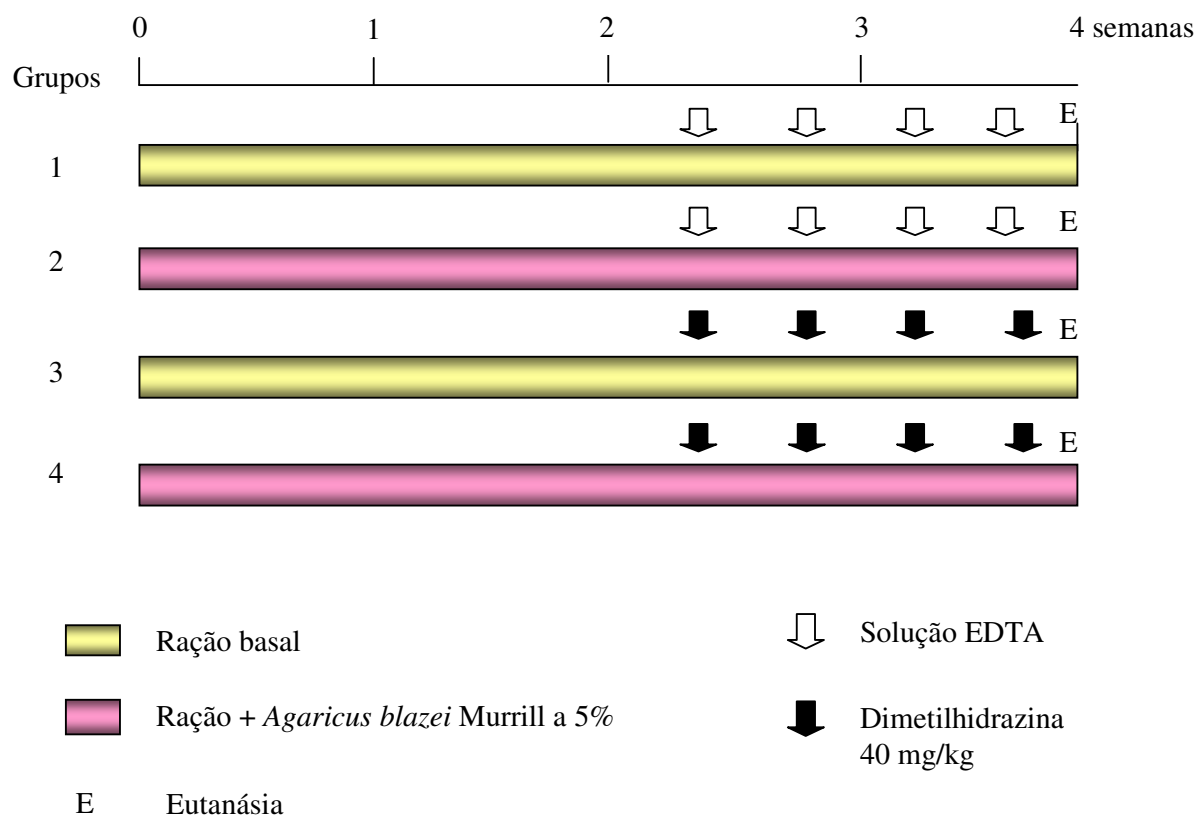


Figura 2

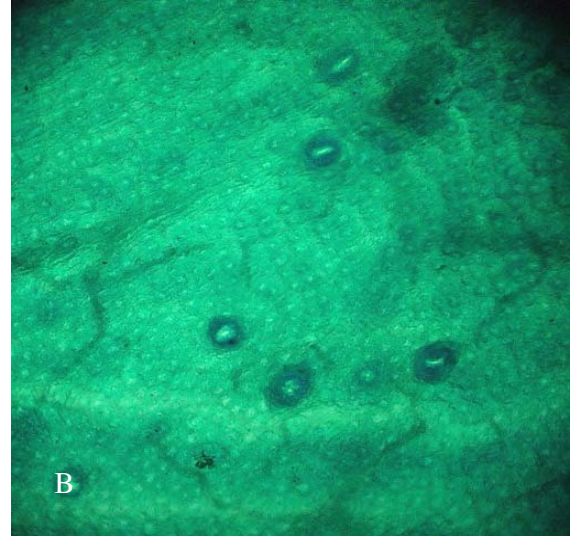
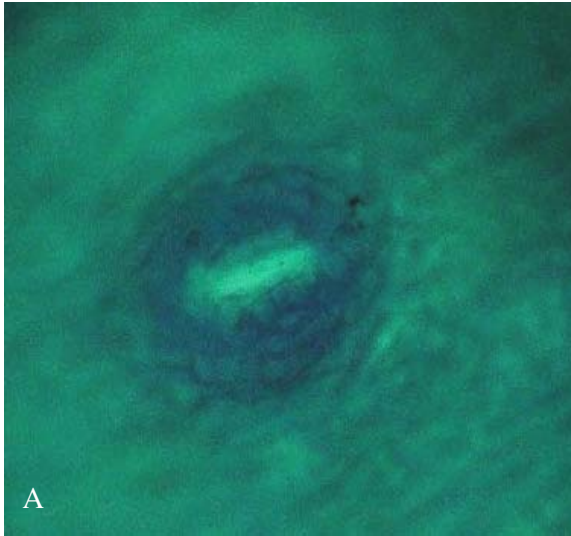


Figura 3

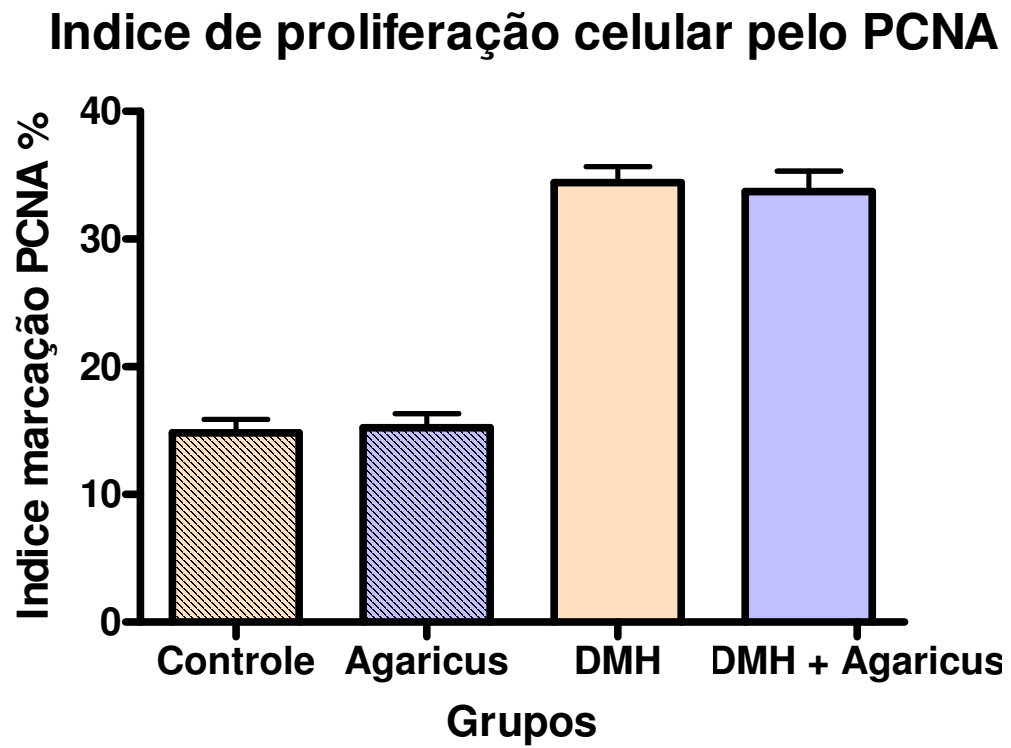


Figura 4



Legendas de tabelas

Tabela 1: Peso corpóreo inicial e final, ganho de peso corpóreo e consumo de ração e cogumelo *Agaricus blazei* em protocolo de curta duração (4 semanas).

Tabela 2: Número de focos de criptas aberrantes (FCA) e multiplicidade de criptas (cripta/FCA) no cólon proximal em protocolo de curta duração (4 semanas), avaliados pela leitura estereoscópica em coloração pelo azul de metileno, nos diferentes grupos experimentais.

Tabela 3: Número de focos de criptas aberrantes (FCA) e multiplicidade de criptas (cripta/FCA) no cólon médio em protocolo de curta duração (4 semanas), avaliados pela leitura estereoscópica em coloração pelo azul de metileno, nos diferentes grupos experimentais.

Tabela 4: Número de focos de criptas aberrantes (FCA) e multiplicidade de criptas (cripta/FCA) no cólon distal e reto em protocolo de curta duração (4 semanas), avaliados pela leitura estereoscópica em coloração pelo azul de metileno, nos diferentes grupos experimentais.

Tabela 5: Índices de marcação pelo PCNA nas células epiteliais do cólon nos diferentes grupos experimentais.

Tabela 1

Grupo/Tratamento	Número de ratos	Peso corpóreo inicial	Peso corpóreo final	Ganho de peso corpóreo	Consumo de ração (g/rato/dia)	Consumo de <i>Agaricus</i> (g/rato/dia)
(G1) Controle	5	230,4 ± 10,6	349,0 ± 16,2	118,6 ± 16,7	25,3 ± 1,19	0
(G2) <i>Agaricus</i> 5%	5	230,6 ± 19,7	350,4 ± 37	119,8 ± 22,9	26 ± 2,02	1,3
(G3) DMH	10	229,5 ± 11,5	334,4 ± 16,8	104,9 ± 12,9	24,5 ± 2,3	0
(G4) DMH + <i>Agaricus</i> 5%	10	227,6 ± 17,8	322,1 ± 30,4	94,6 ± 21	24,8 ± 2,79	1,24

Valores apresentados na forma de: grama (g) ± DP; DMH = 1,2-dimetilhidrazina (40 mg/kg, SC); *Agaricus* 5% = ração comercial adicionada do cogumelo *Agaricus blazei* na concentração de 5%.

Teste de Tukey: significância $p < 0,05$

Tabela 2

Cólon Proximal

Grupo/Tratamento	Número de focos de criptas aberrantes				Número Total CA	Número total FCA	Cripta/FCA
	1 cripta	2 criptas	3 criptas	> 4 criptas			
(G1) Controle	0	0	0	0	0	0	0
(G2) <i>Agaricus</i> 5%	0	0	0	0	0	0	0
(G3) DMH	1,2 + 1,81	0	0	0	1,2 + 1,81	1,2 + 1,81	0,5 + 0,53
(G4) DMH + <i>Agaricus</i> 5%	1,3 + 1,34	0	0	0	1,3 + 1,34	1,3 + 1,34	0,6 + 0,52

Valores apresentados na forma de: média $\pm$ DP; DMH = 1,2-dimetilhidrazina (40 mg/kg, SC); *Agaricus* 5% = ração comercial adicionada do cogumelo *Agaricus blazei* na concentração de 5%; CA = cripta aberrante; FCA = foco de cripta aberrante.

Significância $p < 0,05$.

Tabela 3

Cólon Médio

Grupo/Tratamento	Número de focos de criptas aberrantes				Número Total CA	Número total FCA	Cripta/FCA
	1 cripta	2 criptas	3 criptas	> 4 criptas			
(G1) Controle	0	0	0	0	0	0	0
(G2) <i>Agaricus</i> 5%	0	0	0	0	0	0	0
(G3) DMH	115,6 ± 55,51	1,3 ± 1,25	0	0	116,9 ± 56,24	118,2 ± 56,98	0,5 ± 0,53
(G4) DMH + <i>Agaricus</i> 5%	170,3 ± 57,54	1,9 ± 2,69	0,2 ± 0,63	0	172,4 ± 58,48	174,7 ± 59,71	0,61 ± 0,53

Valores apresentados na forma de: média ± DP; DMH = 1,2-dimetilhidrazina (40 mg/kg, SC); *Agaricus* 5% = ração comercial adicionada do cogumelo *Agaricus blazei* na concentração de 5%; CA = cripta aberrante; FCA = foco de cripta aberrante.
Significância $p < 0,05$.

Tabela 4

Cólon Distal e Reto

Grupo/Tratamento	Número de focos de criptas aberrantes				Número Total CA	Número total FCA	Cripta/FCA
	1 cripta	2 criptas	3 criptas	> 4 criptas			
(G1) Controle	0	0	0	0	0	0	0
(G2) <i>Agaricus</i> 5%	0	0	0	0	0	0	0
(G3) DMH	106,3 ± 68,05	0,9 ± 2,51	0,1 ± 0,32	0	107,3 ± 69,6	108,4 ± 71,24	0,5 ± 0,53
(G4) DMH + <i>Agaricus</i> 5%	175,5 ± 79,02	2,7 ± 3,23	0,1 ± 0,32	0	178,3 ± 81,46	181,2 ± 83,98	0,61 ± 0,53

Valores apresentados na forma de: média ± DP; DMH = 1,2-dimetilhidrazina (40 mg/kg, SC); *Agaricus* 5% = ração comercial adicionada do cogumelo *Agaricus blazei* na concentração de 5%; CA = cripta aberrante; FCA = foco de cripta aberrante.

Significância $p < 0,05$.

Tabela 5

Grupo/Tratamento	Número de células/Cripta	Índice de Marcação de PCNA (%)
(G1) Controle	44,6 ± 2,4	14,8 ± 2,4
(G2) <i>Agaricus</i> 5%	42,4 ± 3,3	15,2 ± 2,5
(G3) DMH	44,4 ± 1,9	34,4 ± 2,8
(G4) DMH + <i>Agaricus</i> 5%	45,2 ± 2,4	33,7 ± 3,6

Valores apresentados na forma de: média ± DP; DMH = 1,2-dimetilhidrazina (40 mg/kg, SC); *Agaricus* 5% = ração comercial adicionada do cogumelo *Agaricus blazei* na concentração de 5%.

Significância $p < 0,05$.

V. Manuscrito 2

*Padronizado de acordo com as normas para publicação na revista
Food and Chemical Toxicology

MODULAÇÃO DA ETAPA DE PROMOÇÃO DA ONCOGÊNESE DO CÓLON E RETO PELO COGUMELO *Agaricus blazei* NO RATO

**Liane Ziliotto¹, Luís Fernando Barbisan², Maria Aparecida Marchesan
Rodrigues*¹**

1. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina – Unesp, Botucatu – SP, Brasil

2. Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências – Unesp, Botucatu – SP, Brasil

*Correspondência: Maria Ap. Marchesan Rodrigues, Departamento de Patologia,
Faculdade de Medicina, Unesp, Botucatu-SP, Brasil. Telefone: 55 014 38116238.

E-mail: mariar@fmb.unesp.br

ABSTRACT

The research on colon cancer is of the most importance due to its epidemiological role as one of the main causes of cancer death in Brazil. Experimental studies on histogenesis of colon cancer have revealed morphologically altered crypts named aberrant crypt foci (ACF), which have been used as biomarkers for colon carcinogenesis. *Agaricus blazei* Murrill, a basidiomycete mushroom native to Brazil has been suggested to present antitumoral and immunostimulating activity. The current study was designed to evaluate the possible role of *Agaricus blazei* given through the diet on the promotion stage of colon carcinogenesis, in the rat. Male Wistar rats were given four subcutaneous injections of the carcinogen 1,2 - dimethylhydrazine (DMH, 40mg/Kg BW, twice a week), during two weeks to induce ACF. The diet containing *Agaricus blazei* at 5% was given after carcinogen treatment to investigate the potential beneficial effects of this edible mushroom on DMH-induced ACF. All groups were killed at the end of the 20th week. Colon segments were stained with 1% methylene blue for stereomicroscopic analysis of the mucosal surface and ACF counting. Colon samples were processed *en face* for histological examination and stained with hematoxylin-eosin (H&E) for ACF counting. ACF were not present in the non-treated control animals (G1 and G2). DMH-treated animals (G3 and G4) presented many ACF in the medial and distal segments, mostly composed of one to four crypts. Concerning DMH-treated groups, no statistically significant difference was observed between the group which received *Agaricus blazei* (G4) and the control group (G3) in the stereomicroscopic analysis of ACF in the colonic mucosa. Findings on the histopathological examination of the colon revealed absence of ACF in non-treated groups (G1 and G2) and hyperplastic or dysplastic aberrant crypts in DMH-treated groups (G3 and G4). Concerning ACF counting and tumors, no statistically significant differences were observed among DMH treated groups. Therefore, administration of *Agaricus blazei* powder at 5% in the diet did not show preventive activity or inhibitory effect on the promotion stage of DMH- induced colon carcinogenesis in rats.

Keywords: *Agaricus blazei*, chemoprevention, colon carcinogenesis, aberrant crypt foci, dimethylhydrazine,

RESUMO

Cerca de 70% das neoplasias malignas do trato gastrointestinal e 15% de todos os tumores malignos originam-se no cólon e de importância crescente como causa de morte por câncer. Sua progressão a partir de lesões microscópicas discretas como os focos de criptas aberrantes (FCAs) para o carcinoma ocorre pelo acúmulo sequencial de alterações genéticas, que muitos consideram como o principal modelo para o entendimento da carcinogênese. Modelos experimentais, utilizando cancerígenos químicos são adotados para estudar aspectos da oncogênese do cólon. Os FCAs podem ser utilizados em modelos experimentais para o teste de substâncias quimioprotetoras da carcinogênese do cólon. Ao cogumelo *Agaricus blazei* são atribuídas atividade antitumoral e capacidade imunoestimuladora. O presente estudo foi delineado com a finalidade de investigar a possível participação do cogumelo *Agaricus blazei*, administrado pela dieta, na etapa de promoção e progressão da oncogênese do cólon e reto, em modelo de carcinogênese do cólon induzido pela 1,2-dimetilhidrazina no rato. Foram utilizados ratos Wistar machos, distribuídos em quatro grupos. Todos os animais receberam ração comercial peletizada durante as duas primeiras semanas. A partir da primeira semana os animais dos grupos G1 (controle) e G2 receberam 1 ml de EDTA, via subcutânea, duas vezes por semana, durante duas semanas e os dos grupos G3 e G4 receberam 40 mg/kg de DMH, via subcutânea, duas vezes por semana, durante duas semanas. A partir do décimo quinto dia os animais dos grupos G1 e G3 receberam ração comercial peletizada e os dos grupos G2 e G4 receberam ração com cogumelo seco em pó a 5%, até o final do experimento. Todos os animais foram eutanasiados na vigésima semana do experimento. Os segmentos de cólon e reto foram corados em solução de azul de metileno a 0,1% para análise estereoscópica da mucosa e contagem dos FCAs. Amostras do cólon e reto foram processadas para obtenção de cortes histológicos *en face* e coradas pelo HE para contagem dos FCAs. Ao exame de necropsia foram encontradas lesões macroscópicas no cólon e reto dos animais dos grupos G3 e G4. Os animais dos grupos não tratados com cancerígeno químico (G1 e G2) não apresentaram FCAs. A análise estereoscópica dos FCAs na mucosa do cólon e reto dos grupos tratados com DMH (G3 e G4) foram observados múltiplos FCAs tanto dos cólons médio como no distal e reto. Os FCAs eram constituídos por uma cripta a mais de quatro criptas não havendo diferença estatística entre o grupo que recebeu o cogumelo *Agaricus blazei* (G4) e seu respectivo grupo controle (G3). Ao exame histopatológico dos diferentes segmentos de cólon e reto não foram encontrados FCAs nos grupos não tratados com o cancerígeno (G1 e G2). Nos grupos que receberam DMH (G3 e G4) foram encontrados vários focos hiperplásicos, displásicos e tumores e a contagem dos FCAs e tumores não diferiu significativamente entre os grupos tratados com DMH. Portanto, o cogumelo *Agaricus blazei*, quando administrado em pó a 5%, não mostrou ação preventiva ou inibidora da promoção da carcinogênese do cólon e reto induzida pela DMH em ratos.

Palavras chaves: câncer, cólon, carcinogênese experimental, *Agaricus blazei*, focos de criptas aberrantes, quimioprevenção.

INTRODUÇÃO

O câncer de cólon e reto é de importância crescente como causa de morte por câncer, e no mundo somam cerca de 950 mil casos novos (Fearon & Vogelstein, 1990; Hoel et al., 1992; Bruckner et al., 2000; Rodrigues et al., 2002; Ministério da Saúde, 2005; American Cancer Society, 2007). Por se tratar de neoplasia de alta morbidade e mortalidade, medidas preventivas são soberanas para se minimizá-las. Evidências sugerem que dietas e componentes bioativos da dieta podem afetar o desenvolvimento do câncer de cólon e reto (Ross et al., 2006).

A progressão do câncer de cólon a partir de lesões microscópicas discretas, como os focos de criptas aberrantes ou de adenoma, para o carcinoma ocorre pelo acúmulo sequencial de alterações genéticas, que muitos consideram como o principal modelo para o entendimento da carcinogênese (Bruckner et al., 2000; Rodrigues et al., 2002).

Modelos experimentais, utilizando cancerígenos químicos, são adotados para estudar aspectos da oncogênese do cólon que não podem ser analisados em seres humanos (Chang, 1978, 1982, 1984; Mayer et al., 1987). A 1,2-dimetilhidrazina (DMH) e seus metabólitos são cancerígenos com alto grau de especificidade para o cólon, em várias espécies de roedores (Reddy et al., 1975; Lamont e O’Gorman, 1978; Rogers e Nauss, 1985). A DMH é um carcinógeno completo que induz a iniciação e promoção da carcinogênese, levando à formação de neoplasias visíveis macroscopicamente de forma dose dependente (Rodrigues et al., 2002).

Os estudos pioneiros sobre a histogênese do câncer do cólon em modelos animais, identificaram criptas morfolologicamente alteradas nas fases iniciais da oncogênese (Chang, 1978, 1982, 1984; Mayer et al., 1987). Posteriormente, essas criptas foram reconhecidas no cólon de roedores tratados com cancerígenos químicos específicos (Bird, 1987; McLellan e Bird, 1988). Essas criptas morfolologicamente alteradas, isoladas ou em focos, foram descritas primeiramente por Bird, em 1987, e designadas como focos de criptas aberrantes (FCAs) (Bird, 1987, Alrawi et al., 2006). As criptas aberrantes são facilmente observadas ao exame estereoscópico do cólon corado com azul de metileno (Bird, 1995). Os FCAs têm sido propostos como marcadores morfológicos intermediários do câncer de cólon e utilizados em estudos experimentais como indicadores de indução neoplásica precoce (McLellan e Bird, 1988;

Bird, 1995; Park et al., 1997). Estudos genéticos demonstram que os FCAs apresentam alta incidência de mutações no oncogene K-ras e instabilidade genômica nos *loci* de microsátélites, podendo expressar mutações nos genes APC e beta-catenina e expressão excessiva de bcl-2 e proteína c-fos (Pretlow, 1995; Heinen et al., 1996; Alrawi et al, 2006 e Fuku et al, 2007).

Os FCAs podem ser utilizados em modelos experimentais para o teste de substâncias quimioprotetoras da carcinogênese do cólon (Wargovich, 1996; Fenoglio-Preiser & Noffsinger, 1999; Agner, 2003; Katsuki, 2006; Ross, 2006; Park, 2007; Taché, 2007).

O cogumelo *Agaricus blazei* foi levado ao Japão em 1965, onde foram iniciados os estudos sobre sua composição e uso terapêutico (Mizuno et al., 1990; Delmanto, 2001; Luiz, 2002). Seu consumo pode ser feito na forma de cápsulas, de chás, de tinturas ou seco, adicionado a qualquer alimento. Popularmente tem sido recomendado como estimulante e coadjuvante no tratamento de diabetes, hepatite crônica, arteriosclerose, AIDS e câncer (Delmanto, 2001; Takaku et al., 2001; Barbisan, 2002; Luiz, 2002). Vários pesquisadores atribuem a atividade antitumoral dos cogumelos à capacidade imunoestimuladora dos polissacarídeos, principalmente das beta-glucanas e dos compostos polissacarídeo-proteínas (Kawagishi et al., 1989; Mizuno et al., 1990; Delmanto, 2001; Itoh et al., 1994; Fujimiya et al., 1998). A função da fração lipídica do cogumelo foi estudada por Takaku et al. (2001), que demonstraram seu potencial inibidor do crescimento tumoral de forma semelhante ao obtido pela fração beta-glucana. No Brasil, as pesquisas são recentes e, em sua maioria, com extratos aquosos do cogumelo *Agaricus blazei* (Delmanto, 2001; Frantz, 2001; Lorenzo, 2001; Barbisan, 2002; Barbisan et al, 2002; Luiz, 2002).

Não há estudos *in vitro* ou *in vivo* sobre a ação do cogumelo *Agaricus blazei* na oncogênese do cólon. Assim, é de extrema importância que sejam feitas investigações sobre as propriedades medicinais do cogumelo *Agaricus blazei* sobre a mucosa colônica.

O presente estudo, portanto, foi delineado com a finalidade de investigar a possível participação do cogumelo *Agaricus blazei* Murrill, administrado pela dieta, na etapa de promoção e progressão da oncogênese do cólon e reto, em modelo de carcinogênese do cólon induzido pela 1,2-dimetilhidrazina no rato.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais e ambiente experimental

Foram utilizados 30 ratos machos Wistar, pesando em média 160 g, com seis semanas de idade, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) - Unicamp, Campinas-SP, Brasil. Durante todo o experimento, os animais permaneceram no Biotério do Departamento de Patologia da FMB – Unesp, em salas com temperatura controlada a 22°C, umidade relativa ao redor de 55%, ciclos de luz/escuro de 12 horas e exaustão contínua.

Receberam ração comercial (Purina) e água filtrada *ad libitum*.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (protocolo nº. 366) da Faculdade de Medicina - Unesp, Botucatu-SP, Brasil.

2. Delineamento experimental e avaliações durante o experimento

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, com cinco animais nos grupos G1 e G2 e dez animais nos grupos G3 e G4; eles foram eutanasiados na vigésima semana do experimento, conforme esquema da Figura 1.

O peso dos animais foi avaliado semanalmente, e o consumo de água e ração, a cada dois dias.

Protocolo experimental (modulação da fase de promoção e progressão)

- ❖ Grupo 1 (controle negativo): Os animais receberam ração comercial peletizada, durante todo o experimento. A partir da primeira semana foi realizada a aplicação de 1 ml de EDTA, via subcutânea (SC), duas vezes por semana, durante duas semanas.
- ❖ Grupo 2: Os animais receberam ração comercial peletizada, durante as duas primeiras semanas do experimento. A partir da primeira semana foi realizada a

aplicação de 1 ml de EDTA, via subcutânea (SC), duas vezes por semana, durante duas semanas. Após décimo quinto dia, os animais receberam ração comercial peletizada adicionada de cogumelo seco na forma de pó na concentração de 5%, até a 20^a semana do experimento.

❖ Grupo 3: Os animais receberam ração comercial peletizada, durante todo o experimento. A partir da primeira semana foi realizada a aplicação de solução de dimetilhidrazina (DMH) na dose de 40 mg/kg, SC, duas vezes por semana, durante duas semanas.

❖ Grupo 4: Os animais receberam ração comercial peletizada, durante as duas primeiras semanas do experimento. A partir da primeira semana foi realizada a aplicação de solução de dimetilhidrazina (DMH) na dose de 40 mg/kg, SC, duas vezes por semana, durante duas semanas. Após décimo quinto dia, os animais receberam ração comercial peletizada adicionada de cogumelo seco na forma de pó na concentração de 5%, até a 20^a semana do experimento.

3. Preparo de solução de 1,2-dimetilhidrazina

A solução de 1,2-dimetilhidrazina, adquirida da Tokyo Kasei Co, foi preparada pela diluição do cancerígeno químico em solução de EDTA (37 mg/100 ml de água destilada) na concentração de 400 mg/100 ml, no momento do uso. Foi utilizada dose de 40 mg/kg de peso corpóreo, administrada pela via subcutânea, durante duas semanas (duas doses por semana).

4. Preparo ração com o cogumelo *Agaricus blazei*

As amostras do cogumelo seco e pulverizado foram fornecidas pelo Prof. Dr. Augusto Ferreira da Eira, do Departamento de Produção Vegetal – Módulo de Cogumelos – Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp – Botucatu, SP (Brasil). O cogumelo seco e pulverizado (lote: ABL 29 2003) foi adicionado e homogeneizado a ração comercial na concentração de 5% (500 g cogumelo para 10 kg de ração) e

processado para a forma peletizada. A ração peletizada adicionada do cogumelo foi armazenada em *freezer* até o momento do uso.

5. Necropsia dos animais, coleta e processamento do material

Os animais foram eutanasiados por injeção de pentobarbital sódico a 4% (45mg/kg de peso corpóreo), pela via intraperitoneal no final da vigésima semana do experimento. À necropsia foi feita remoção de todo o cólon, sua secção longitudinal, inspeção para observação da presença de alterações macroscópicas e lavagem em solução salina.

O cólon foi dividido em três segmentos identificados como médio e distal e reto. Os segmentos foram acondicionados em folha de isopor, fixados em solução de formalina tamponada a 10% por período de 24 horas e, posteriormente, em álcool a 70% até o momento da análise.

6. Identificação e quantificação dos Focos de Criptas Aberrantes (FCAs)

Os segmentos de cólon foram corados em solução de azul de metileno em PBS a 0,1% por 10 minutos para contagem dos focos de criptas aberrantes (FCAs). Os segmentos foram avaliados em microscópio de luz, em objetiva de 4x. Foram adotados os seguintes critérios para identificar e quantificar os FCAs (Bird, 1987):

- a) Foco constituído de uma única cripta: Caracterizado por cripta volumosa, pelo menos duas vezes o tamanho das criptas normais circunvizinhas, com revestimento epitelial espesso.
- b) Foco com duas ou mais criptas: Caracterizado por criptas volumosas, ovais ou elípticas, dispostas em blocos sem criptas normais no interior dos blocos.

Foi feita análise estereoscópica de campos sucessivos da mucosa do cólon, para quantificação do número de FCAs por unidade de área (cm²), bem como do número de criptas por FCA (multiplicidade de criptas por FCA).

7. Análise histopatológica dos Focos de Criptas Aberrantes

Amostras de segmentos do cólon médio e distal e reto foram processadas para obtenção de cortes histológicos e coradas pela hematoxilina e eosina.

Os segmentos foram avaliados em microscópio de luz, em objetiva de 20 e 40x e os focos de criptas aberrantes foram identificados para quantificação do número de FCAs por unidade de área (cm^2), número de criptas por FCA (multiplicidade de criptas por FCA), bem como forma dos focos. Quanto a sua forma, os FCAs foram classificados em hiperplásicos e displásicos.

8. Análise histopatológica dos tumores

As lesões macroscópicas encontradas durante a necropsia e leitura dos FCAs em azul de metileno foram seccionadas e incluídas em parafina separadamente das amostras de cólon para leitura em HE, e os tumores observados durante leitura de amostras de cortes histológicos de leitura de FCAs para análise histopatológica foram corados para hematoxilina e eosina e classificados de acordo com suas características histológicas.

9. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se do Programa Jandel Sigma Stat® versão 2.0. Os dados de ganho de peso, consumo de ração e consumo de cogumelo foram avaliados pelo teste da Análise de Variância para Experimentos Inteiramente Aleatorizados (EIA) para amostras independentes. A análise das proporções de ocorrência do número de FCAs, FCAs/ cm^2 e de criptas por FCA nos diferentes grupos foram comparadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (Zar, 1999) para amostras independentes. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

RESULTADOS

Pela análise de variância, não houve diferenças significativas entre os grupos (Tabela 1).

À necropsia foi realizada ressecção de todo o cólon e reto. Foram observadas cinco lesões macroscópicas nos animais do grupo G3 e uma lesão nos do grupo G4 (Figura 2). Nos animais dos dois grupos não tratados com a DMH (G1 e G2) não foram encontradas lesões macroscópicas.

O cólon e o reto de cada animal foi classificado e dividido como cólon médio e cólon distal e reto, corados com azul de metileno a 0,1% e examinados à microscopia óptica. Os focos de criptas aberrantes foram observados e contados em toda extensão do cólon e do reto. As criptas aberrantes foram identificadas por observação estereoscópica e distinguidas das criptas normais por apresentarem aumento de tamanho, forma elíptica e coloração azul mais acentuada (Figura 3).

Não foram encontradas criptas aberrantes nos animais dos grupos não tratados com cancerígeno químico (G1 e G2). Nos grupos que receberam a DMH (G3 e G4) foram notados múltiplos focos de criptas aberrantes tanto no cólon médio como no cólon distal e reto. Nos parâmetros de quantificação do número de criptas aberrantes, de FCAs e número de criptas por FCA (multiplicidade de criptas por FCA) foram encontrados focos com uma cripta até superiores a quatro criptas aberrantes em todos os animais dos dois grupos tratados com o cancerígeno químico (G3 e G4). Em todos os parâmetros avaliados não houve diferença significativa entre o grupo que recebeu DMH e ração comercial (G3) e o grupo teste que recebeu DMH e ração adicionada de cogumelo a 5% (Tabela 2).

Após a leitura estereoscópica de todo o cólon e reto foram colhidos fragmentos e processados para análise histológica *en face* e corados pela HE. Não foram encontrados focos de criptas aberrantes nos cortes histológicos analisados dos grupos não tratados com o cancerígeno químico (G1 e G2). Nos cortes histológicos dos segmentos de cólon e reto dos grupos tratados com a DMH (G3 e G4) foram encontrados focos de criptas aberrantes hiperplásicos (Figura 4), focos displásicos (Figura 5) e tumores (Figura 6). Os focos hiperplásicos e displásicos observados apresentaram de uma a mais de quatro criptas aberrantes e os displásicos em sua maioria eram superiores a quatro criptas

aberrantes. À avaliação comparativa entre os grupos G3 e G4, nos parâmetros número de focos de criptas aberrantes, FCA, CA/FCA tanto das criptas aberrantes totais (Tabela 3), quanto das criptas aberrantes displásicas (Tabela 4) não foram encontradas diferenças significativas.

As lesões encontradas durante a necropsia foram processadas para análise histológica e coradas pela hematoxilina e eosina. Estas lesões e os tumores encontrados durante a leitura dos cortes histológicos *en face* foram avaliados e classificados de acordo com suas características histopatológicas. No grupo tratado com o cancerígeno químico e ração comercial (G3) foram observados um adenoma, um adenocarcinoma tubular bem diferenciado e um adenocarcinoma bem diferenciado. Nos animais do grupo tratado com a DMH e o cogumelo (G4) foram encontrados dois carcinomas diferenciados intramucosos, um carcinoma bem diferenciado e um adenocarcinoma bem diferenciado. À análise estatística não foi encontrada diferença significativa nos parâmetros de número de tumores, número de ratos portadores de tumores ou número de tumores por ratos (Tabela 5).

DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliado o potencial quimioprotetor do cogumelo *Agaricus blazei* na etapa de promoção da oncogênese do cólon e reto induzida pela DMH, e os focos de criptas aberrantes (FCAs) foram utilizados como biomarcadores morfológicos da oncogênese do cólon e reto.

Não houve diferenças significativas no ganho de peso e no consumo de ração entre os diferentes grupos experimentais, o que mostra que o cogumelo *Agaricus blazei* e/ou o uso do cancerígeno químico no protocolo de média duração da oncogênese do cólon não interferem na ingestão de alimento e conseqüente ganho de peso. Os animais foram eutanasiados após vinte semanas do início do tratamento com o cancerígeno químico e apesar de alguns apresentarem, à necropsia, lesões macroscópicas na mucosa do cólon, nenhum deles desenvolveu sinais clínicos da doença durante o período experimental. A eutanásia foi realizada, portanto, em fase pré-clínica do desenvolvimento neoplásico já que o objetivo do estudo era avaliar lesões precoces, tais como os FCAs, que são biomarcadores da oncogênese colônica.

Não foram encontradas lesões macroscópicas à necropsia nem criptas aberrantes ao exame estereoscópico e histológico nos grupos não tratados com o cancerígeno químico, o que indica que o cogumelo, na concentração de 5% e administrado oralmente na forma de pó, não exerce ação iniciadora da carcinogênese do cólon. Esses resultados se somam a estudos com frações e extratos do cogumelo em que não se notou atividade mutagênica em cultura de células (Luiz, 2002), nem atividade genotóxica ou carcinogênica em fígado de ratos Wistar (Barbisan, 2002 e Barbisan et al, 2002).

Os FCAs representam resposta específica da mucosa do cólon à ação de cancerígenos químicos genotóxicos. A administração de doses repetidas de DMH leva à hiperplasia das criptas colônicas que podem ou não regredir após a interrupção da administração da droga (Sequeira, 1997). São lesões precoces capazes de progredir para o carcinoma colo-retal e/ou ser marcador preditivo de risco futuro. Do ponto de vista experimental, os FCAs oferecem a oportunidade de se investigar alterações moleculares muito precoces na carcinogênese colo-retal e se estudar agentes quimioprotetores ou quimiopreventivos do desenvolvimento neoplásico (Ochiai et al., 2003; Stevens, 2007).

Há evidências de que muitas substâncias na dieta possam oferecer proteção contra o câncer. Essas substâncias poderiam inibir a formação de FCAs e reduzir a incidência de câncer de cólon em animais de laboratório. Entre elas estão os

flavanóides, a vitamina D3, os chás verde e preto, o ginseng vermelho, o alho, a cebola, os vegetais como ervilhas e espinafre, o farelo de trigo e os aditivos alimentares como urucum (Agner, 2003; Dashwood et al., 1999; Katsuki et al., 2006; Ross, 2006; Taché et al., 2007).

Em estudos com cogumelos, vários pesquisadores atribuem sua atividade antitumoral à capacidade imunoestimuladora dos polissacarídeos que compõem os micélios e corpos de frutificação destes basidiomicetos. A atividade antitumoral do *Agaricus blazei* foi demonstrada em estudos de suas frações com a inibição do crescimento do sarcoma 180 e do fibrossarcoma Meth A, atuando como aditivo do efeito antineoplásico do 5-fluoruracil sobre esse fibrossarcoma (Delmanto, 2001; Itoh et al., 1994; Itoh et al., 1997; Kawagishi et al., 1989; Mizuno et al., 1990). Suas frações parecem manifestar ação anticâncer de maneira indireta, pela ativação da resposta imunológica específica e não específica do hospedeiro, ou promovendo a morte das células tumorais por impedir a angiogênese (Barbisan, 2002; Fujimiya et al., 1998; Takaku et al., 2001). As pesquisas com extratos aquosos do cogumelo *Agaricus blazei* encontraram aumento da sobrevivência de camundongos portadores do tumor de Ehrlich. No entanto, eles não apresentaram capacidade de estimular *in vivo* sua ação “Natural killer”. (Frantz, 2001; Lorenzo, 2001). Delmanto, em 2001, avaliou o potencial antimutagênico de diferentes linhagens do cogumelo, *in vivo*, observando que os extratos apresentaram atividade antimutagênica, que pode contribuir para o efeito anticarcinogênico do cogumelo, e que os componentes dos extratos não são distribuídos igualmente entre as linhagens. Em 2002, Luiz avaliou a atividade mutagênica e antimutagênica destes extratos *in vitro*, não sendo observados efeito mutagênico nem recombinogênico e ausência de ação protetora e antimutagênica de células CHO-xrs5, sugerindo atividade bio-antimutagênica dos extratos. Em estudos sobre a atividade do *Agaricus blazei* no fígado, o tratamento com extratos aquosos deste cogumelo mostrou efeito hepatoprotetor da toxicidade e da iniciação da hepatocarcinogênese em modelo experimental de carcinogênese química induzido pela dietilnitrozamina (DEN). Entretanto, mostrou-se ineficaz na proteção do desenvolvimento de focos pré-neoplásicos no fígado (Barbisan, 2002 e Barbisan et al, 2002).

Não há estudos *in vitro* ou *in vivo* sobre a ação do cogumelo *Agaricus blazei* na oncogênese do cólon. Ainda que tenha apresentado efeito protetor em estudos *in vitro* e *in vivo* em outros órgãos alvo, nos animais tratados com o cancerígeno químico e

cogumelo, deste estudo, ele não alterou a formação de FCAs na mucosa do cólon e reto de forma significativa quando comparado com o respectivo grupo controle, tanto na avaliação estereoscópica da mucosa colo-retal corada pelo azul de metileno quanto na análise dos cortes histológicos convencionais da mucosa do cólon. Assim, considerando que os FCAs são lesões precursoras dos tumores no cólon e podem ser utilizados como protocolos para o estudo de carcinogênese e atividade anticâncer em modelos de carcinogênese de cólon, pela avaliação dos parâmetros de número e multiplicidade de focos de criptas aberrantes, tanto na leitura estereoscópica como na histologia, foi demonstrado que o cogumelo *Agaricus blazei* não apresentou atividade protetora da etapa de promoção da carcinogênese do cólon e reto.

Neste estudo também foram avaliados os desenvolvimentos de criptas displásicas e tumores nos cortes histológicos da mucosa colo-retal. Os focos displásicos observados apresentaram em sua maioria mais de quatro criptas e à avaliação comparativa entre os grupos tratados com o cancerígeno químico não foram encontradas diferenças significativas.

Os FCAs com mais de quatro criptas têm maior risco de persistirem e aumentarem de tamanho pela multiplicidade e apresentam maiores chances de se transformar em tumores (Shivapurkar et al., 1994). Embora a hiperplasia das criptas possa preceder o câncer de cólon, o primeiro passo no desenvolvimento neoplásico, nos modelos experimentais, é o aparecimento de criptas displásicas ou de focos de displasia na mucosa colônica (Sequeira, 1997).

Os FCAs são considerados precursores dos adenomas e do câncer em humanos, porém a maioria dos FCAs não progride para o pólo maligno da oncogênese e podem até desaparecer, sugerindo que fatores adicionais devem ser críticos para promover a progressão das lesões. Suspeita-se que a maioria dos FCAs não desenvolve alterações malignas, vários regredem espontaneamente ou se tornam hiperplásicos, enquanto uma fração exibe hiperproliferação com subsequente transformação maligna e esta estaria associada a alterações nos oncogenes e genes supressores k-ras, APC e p53. A mutação do APC está precisamente associada à displasia, já a do oncogene k-ras parece ser independente do aspecto displásico (Alrawi et al., 2006; Feng et al., 1997; Losi et al., 1996; Pretlow et al., 1993; Rodrigues et al., 2002; Vivona et al., 1993).

Os resultados do estudo de Ochiai et al. (2003) indicam que a progressão de criptas displásicas para o câncer de cólon pode ser a rota principal no desenvolvimento

do câncer de cólon em ratos. Considerando esses dados e sabendo que no presente trabalho à análise dos focos de criptas displásicas como marcadores da oncogênese do cólon nos parâmetros número de focos de criptas aberrantes, FCA, CA/FCA e na avaliação de tumores não foram encontradas diferenças significativas quando comparados com os animais tratados com DMH, observa-se que o cogumelo *Agaricus blazei* não apresentou efeito inibidor da carcinogênese do cólon e reto.

Portanto, como os FCAs estão relacionados ao aumento do risco para o desenvolvimento de câncer colo-retal e os focos displásicos estão correlacionados à presença de microadenomas (Stevens, 2007; Archer et al., 1992), pode-se concluir que o *Agaricus blazei*, fornecido pela dieta na forma de pó, não apresenta capacidade protetora ou inibidora da oncogênese do cólon e desta forma não interferiu no risco no desenvolvimento do câncer do cólon e reto.

Em estudo anterior, analisamos a possível influência do cogumelo *Agaricus blazei* na etapa de iniciação da carcinogênese do cólon induzida pela DMH no rato. A perspectiva era investigar a possível ação bloqueadora dos eventuais compostos bioativos do cogumelo nos danos induzidos no DNA das células da mucosa do cólon pelos metabólitos da DMH. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com o *Agaricus blazei* fornecido pela dieta, antes e durante a exposição ao cancerígeno químico, não exerceu atividade protetora contra a agressão genotóxica à mucosa do cólon induzida pela DMH (Manuscrito 1). A falha na proteção da carcinogênese do cólon pode ser atribuída à perda ou degradação de compostos bioativos e termolábeis do *Agaricus blazei* durante o processo de secagem e desidratação do cogumelo (Luiz, 2002). Outra possibilidade é que os compostos bioativos do cogumelo não tenham conseguido atingir seus alvos na mucosa colo-retal, devido à degradação durante o processo de digestão nas porções proximais do trato digestório. Como o consumo mais freqüente do *Agaricus blazei* é sob a forma de cápsulas (pó) ou de chás, tanto em humanos como em animais, os resultados do presente estudo são relevantes, visto que mimetizam a via mais comum de aporte deste cogumelo ao organismo, que é a via oral.

Em síntese, os resultados do presente estudo não confirmaram ação protetora do cogumelo *Agaricus blazei* na etapa de promoção da carcinogênese do cólon induzida pela DMH no rato. Portanto, nossos dados não referendam a crença popular da ação benéfica deste cogumelo, quando consumido pela dieta, na proteção contra o câncer do cólon.

CONCLUSÕES

1) O cogumelo *Agaricus blazei* administrado oralmente na forma de pó, na concentração de 5%, não mostrou ação iniciadora ou promotora de lesões pré-neoplásicas no cólon e reto de ratos Wistar machos.

2) O cogumelo *Agaricus blazei* administrado oralmente na forma de pó, na concentração de 5%, não mostrou ação inibidora ou protetora da formação de lesões pré-neoplásicas (focos de criptas aberrantes) do cólon e reto induzido pela DMH em ratos Wistar machos.

3) O cogumelo *Agaricus blazei* administrado oralmente na forma de pó, na concentração de 5%, não mostrou ação inibidora ou protetora da formação de neoplasias do cólon e reto induzido pela DMH em ratos Wistar machos.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Fapesp (Fundação para o Desenvolvimento Médico e Hospitalar) e Toxicam (Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana).

Ao Prof. Dr. Augusto Ferreira da Eira pelo fornecimento das amostras de cogumelo.

REFERÊNCIAS

Agner, A.R. Atividade do extrato de urucum sobre a carcinogênese hepática e de cólon em ratos Wistar [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2003.

Alrawi, S.J., Carrol R.E., Hill, H.C., Gibbs, J.F., Tan, D., Brenner, B.M., Nowak, N.J., Swede, H., Stoler, D.L., Anderson, G.R., 2006. Genomic instability of human aberrant crypt foci measured by inter-(simple sequence repeat) PCR and array-CGH. *Mutat Res.* 601, 30-38.

American Cancer Society. Cancer facts & figures 2007. Atlanta: American Cancer Society; 2007.

Archer, M.C., Bruce, W.R., Chan, C.C., Corpet, D.E., Medline, A., Roncucci, L., Stamp, D., Zhang, X.M., 1992. Aberrant crypt foci and microadenoma as markers for colon cancer. *Environ Health Perspect.* 98, 195-197.

Barbisan, L.F. Influência do extrato aquoso do cogumelo *Agaricus blazei* Murrill sobre o processo de hepatocarcinogênese química induzida pela dietilnitrosamina em ratos Wistar [Doutorado]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2002.

Barbisan, L.F., Miyamoto, M., Scolastici, C., Salvadori, D.M., Ribeiro, L.R., Eira, A.F., Camargo, J.L., 2002. Influence of aqueous extract of *Agaricus blazei* on rat liver toxicity induced by different doses of diethylnitrosamine. *J Ethnopharmacol.* 83, 25-32.

Bird, R.P., 1987. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: Preliminary findings. *Cancer Lett.* 37, 147-151.

Bird, R.P., 1995. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett.* 93, 55-71.

- Bird, R.P., Salo, D., Lasko, C., Good, C., 1997. A novel methodological approach to study the level of specific protein and gene expression in aberrant crypt foci putative preneoplastic colonic lesions by Western Blotting and RT-PCR. *Cancer Lett.* 116, 15-19.
- Bruckner, H.W., Pitrelli, J., Merrick, M., 2000. Adenocarcinoma of the colon and rectum. In: Holland & Frei, editors. *Cancer Medicine*. 5 ed. Hamilton: BC Decker Inc. p. 1472-1498.
- Chang, W.W.L., 1978. Histogenesis of symmetrical 1,2-dimethylhydrazine-induced neoplasms of the colon of mouse. *J Natl Cancer Inst.* 60, 1405-1418.
- Chang, W.W.L., 1982. Morfological basis of multistep process in experimental colonic carcinogenesis. *Virchows Arch Cell Pathol.* 41, 17-37.
- Chang, W.W.L., 1984. Histogenesis of colon cancer in experimental animals. *Scand J Gastroenterol.* 104, 27-43.
- Dashwood, R.H., Xu, M., Hernaez, J.F., Hasaniya, N., Youn, K., Razzuk, A., 1999. Cancer chemopreventive mechanisms of tea against heterocyclic amine mutagens from cooked meat. *P Soc Ex Bio Med.* 220, 239-243.
- Delmanto, R.D., Alves de Lima, P.L., Sugui, M.M., Eira, A.F., Salvadori, D.M., Speit, G., Ribeiro, L.R., 2001. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. *Mutat Res.* 496, 15-21.
- Fearon, E.R., Vogelstein, B., 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 61, 759-767.
- Feng, Y., Fretland, A.J., Rustan, T.D., Jiang, W., Becker, W.K., Hein, D.W., 1997. Higher frequency of aberrant crypt foci in rapid then slow acetylator inbred rats administered the colon carcinogen 3,2'-Dimethyl-4aminobiphenyl. *Toxicol Appl Pharmacol.* 147, 56-62.

Fenoglio-Preiser, C.M., Noffsinger, A., 1999. Aberrant crypt foci: A review. *Toxicol Pathol.* 27, 632-642.

Frantz, F.G. Efeito de extrato de *Agaricus blazei* Murrill e *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler sobre a atividade linfoproliferativa de camundongos portadores do tumor de Ehrlich [Bacharel em Ciências Biológicas – Modalidade Médica] Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; 2001.

Fujimiya, Y., Suzuki, Y., Oshiman, K., Kobori, H., Moriguchi, K., Nakashima, H., Matumoto, Y., Takahara, S., Ebina, T., Katakura, R., 1998. Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from the basidiomycet, *Agaricus blazei* Murill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis. *Cancer Immunol Immunother.* 46, 147-59.

Fuku, N., Ochiai, M., Terada, S., Fujimoto, E., Nakagama, H., Tabata, I., 2007. Effect of running training on DMH-induced aberrant crypt foci in rat colon. *Med Sci Sports Exerc.* 39, 70-74.

Heinen, C.D., Shivapurkar, N., Tang, Z., Groden, J., Alabaster, O., 1996. Microsatellite instability in aberrant foci from human colons. *Cancer Res.* 56, 5339-5341.

Hoel, D.G., Davis, D.L., Miller, A.B., Sondik, E.J., Swerdlow, A.J., 1992. Trends in cancer mortality in 15 industrialised countries, 1969-1986. *J Natl Cancer Inst.* 84, 313-320.

Itoh, H., Ito, H., Amano, H., Noda, H., 1994. Inhibitory action of a (1→6)-β-D-glucan-protein complex (FIII-2-b) isolated from *Agaricus blazei* Murill (“Himematsutake”) on Meth A fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor mechanism. *Jpn J Pharmacol.* 66, 265-71.

Itoh, H., Shimura, K., Itoh, H., Kawade, M., 1997. Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade strain 101) “Himematsutake” and its mechanisms in tumor-bearing mice. *Anticancer Res.* 17(1A), 277-84.

Katsuki T, Hirata K, Ishikawa H, Matsuura N, Sumi S, Itoh H., 2006. Aged garlic extract has chemopreventative effects on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumors in rats. *J Nutr.* 136, 847S-851S.

Kawagishi, H., Inagaki, R., Kanao, T., Mizuno, T., Shimura, K., Hagiwara, T., Nakamura, T., 1989. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydr Res.* 186, 267-73.

Lamont, J.T., O’Gorman, T.A., 1978. Experimental colon cancer. *Gastroenterology.* 75, 1157-169.

Lorenzo, J.S.F. Ação de extratos de *Agaricus blazei* Murrill e *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler sobre a sobrevivência e atividade “Natural killer” de camundongos portadores do tumor de Ehrlich [Bacharel em Ciências Biológicas – Modalidade Médica]. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; 2001.

Losi, L., Roncucci, L., Di Gregorio, C., De Leon, M.P., 1999. Benhattar J. K-ras and p-53 mutations in human colorectal aberrant crypt foci. *J Pathol.* 178:259-263.

Luiz, R.C. Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade de extratos aquosos e orgânicos do *Agaricus blazei* Murrill (cogumelo do sol) linhagem AB97/11, *in vitro* [Dissertação]. Londrina: Universidade Estadual de Londrina; 2002.

Mayer, D., Trocheris, V., Hacker, H.J., Villard, V., Murat, J.C., Bannasch, P., 1987. Sequential histochemical and morphometric studies on preneoplastic and neoplastic lesions induced in rat colon by 1,2-dimethylhydrazine. *Carcinogenesis.* 8, 155-161.

McLellan, K.R., Bird, R.P., 1988. Aberrant crypts : potential preneoplastic lesions in the murine colon. *Cancer Res.* 48, 6187-6192.

Ministério da Saúde. Estimativa 2006: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2005.

Mizuno, T., Hagiwara, T., Nakamura, T., Tro, H., Shimura, K., Sumiya, T., Inagaki, R., Kanao, T., Ixo, H., Asakura, A., 1990. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from “Himematsutake”, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agric Biol Chem.* 54, 2897-2905.

Ochiai, M., Ushigome, M., Fujiwara, K., Ubagai, T., Kawamori, T., Sugimura, T., Nagao, M., Nakagama, H., 2003. Characterization of dysplastic aberrant crypt foci in the rat colon induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Am J Pathol.* 163, 1607-14.

Park, H.S., Goodlad, R.A., Wright, N.A., 1997. The incidence of aberrant crypt foci and colonic carcinoma in dimethylhydrazine-treated rats varies in a site-specific manner and depends on tumor histology. *Cancer Res.* 57, 4507-4510.

Park, E., Jeon, G.I., Park, J.S., Paik, H.D., 2007. A probiotic strain of *Bacillus fermenticus* reduces DMH induced precancerous lesions in F344 male rat. *Biol Pharm Bull.* 30, 569-574.

Pretlow, T.P., Brasitus, T.A., Fulton, N.C., Cheyer, C., Kaplan, E.L., 1993. K-ras mutations in putative preneoplastic lesions in human colon. *J Natl Cancer Inst.* 85, 2004-2007.

Pretlow, T.P., 1995. Aberrant crypt foci and K-ras mutations: earliest recognized players or innocent bystanders in colon carcinogenesis? *Gastroenterology.* 108, 600-603.

Reddy, B.S., Narisawa, T., Wright, P., Vukusich, D., Weisburger, J.H., Wynder, E.L., 1975. Colon carcinogenesis with azoxymethane and dimethylhydrazine in germ-free rats. *Cancer Res.* 35, 287-290.

Rodrigues, M.A.M., Silva, L.A.G., Salvatori, D.M.F., Camargo, J.L.V., Montenegro, M.R., 2002. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. *Braz J Med Biol Res.* 35, 351-55.

Rogers. A.E., Nauss, K.M., 1985. Rodent models for carcinoma of the colon. Dig Dis Sci. 30, 875-1025.

Ross AS, Finley JW, Milner JA., 2006. Allyl sulfur compounds from garlic modulate aberrant crypt formation. J Nutr. 136, 852-854.

Sequeira, J.L. Influência do processo de reparação de feridas cutânea na carcinogênese química experimental do cólon no rato [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 1997.

Shivapurkar, N., Tang, Z., Ferreira, A., Nasim, S., Garrett, C., 1994. Alabaster O. Sequential analysis of k-ras mutations in aberrant crypt foci and colonic tumors induced by azoxymethane in Fischer-344 rats on high-risk diet. Carcinogenesis. 15, 775-778.

Stevens, R.G., Swede, H., Heinen, C., Jablonski, M., Grupka, M., Ross, B., Parente, M., Tirnauer, J.S., Giardina, C., Raian, T.V., Rosenberg, D.W., Levine, J., 2007. Aberrant crypt foci in patients with a positive family history of sporadic colorectal cancer. Cancer Lett. 248, 262-268.

Taché, S., Ladam, A., Corpet, D.E., 2007. Chemoprevention of aberrant crypt foci in the colon of rats by dietary onion. Eur J Cancer. 43, 454-458.

Takaku, T., Kimura, Y., Okuda, H., 2001. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. J. Nutr. 131, 1409-13.

Vivona, A.A., Shpitz, B., Medline, A., Bruce, W.R., Hay, K., Ward, M.A., Stern, H.S., Gallinger, S., 1993. K-ras mutations in aberrant crypt foci, adenomas and adenocarcinomas during azoxymethane-induced colon carcinogenesis. Carcinogenesis. 14, 1777-1781.

Wargovich, M.J., Chen, C.D., Jimenez, A., Steele, V.E., Velasco, M., Stephen, L.C., Price, R., Gray, K., Kelloff, G.J., 1996. Aberrant crypts as a biomarker for colon cancer:

evaluation of potential chemopreventive agents in the rat. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 5, 355-360.

Zar, J.H., 1999. *Biostatistical analysis*. 4^a Ed. New Jersey: Prentice-Hall.

Legendas de figuras

Figura 1: Protocolo experimental para avaliação da quimioprevenção da promoção e progressão carcinogênese do cólon do cogumelo *Agaricus blazei* em ratos Wistar machos.

Figura 2: Segmento de cólon médio com duas lesões macroscópicas observadas em mucosa de cólon à necropsia.

Figura 3: Focos de criptas aberrantes (criptas volumosas, pelo menos duas vezes o tamanho das criptas normais circunvizinhas, com revestimento epitelial espesso). Aumento de 10x. Azul de metileno 1%.

Figura 4: Corte histológico *en face* de mucosa de cólon, corado em HE. Observa-se um foco com três criptas aberrantes de aspecto morfológico hiperplásico. Aumento de 20x.

Figura 5: Corte histológico *en face* de mucosa de cólon, corado em HE. Observa-se foco com oito criptas aberrantes (seta amarela) e foco com três criptas aberrantes (seta azul) de aspecto morfológico displásico. Aumento de 20x.

Figura 6: Corte histológico *en face* de mucosa de cólon, corado pelo HE. Observa-se lesão neoplásica em mucosa de cólon, classificada como adenocarcinoma. Aumento de 20x.

Figura 1

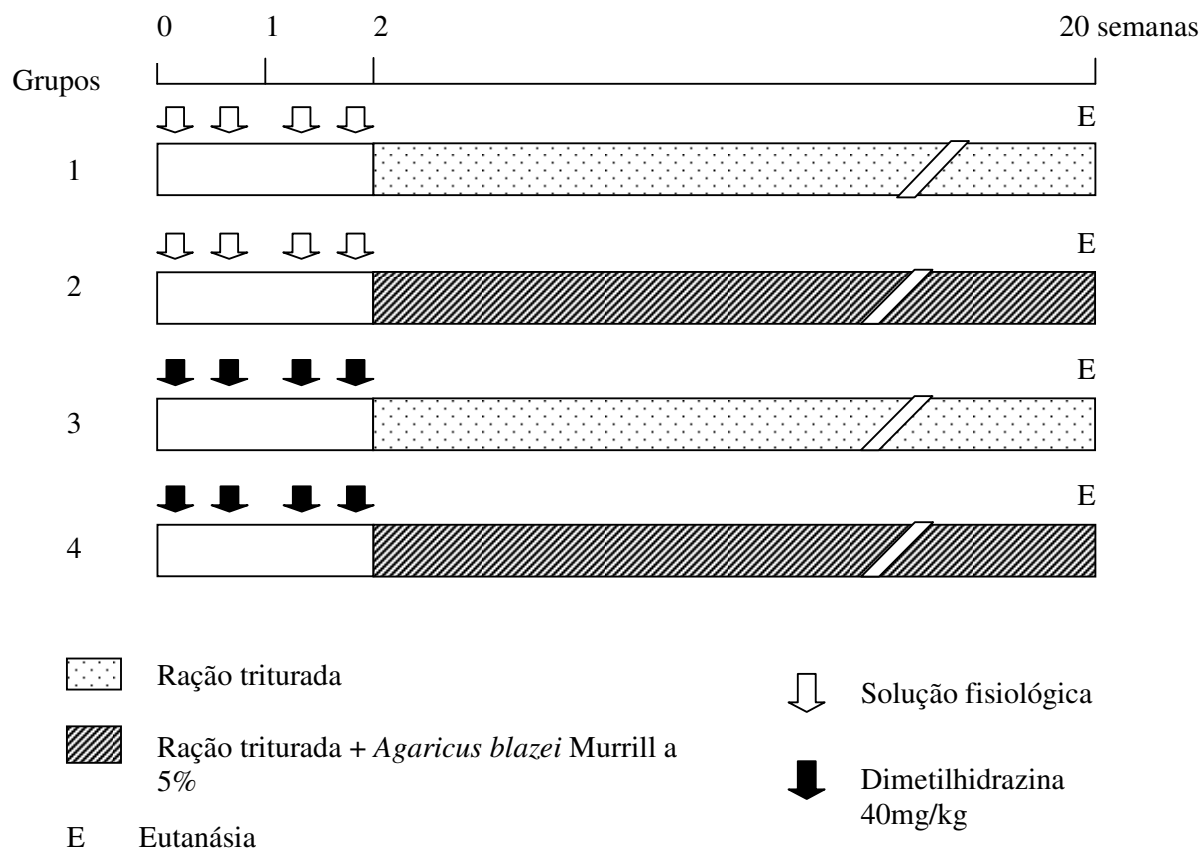


Figura 2

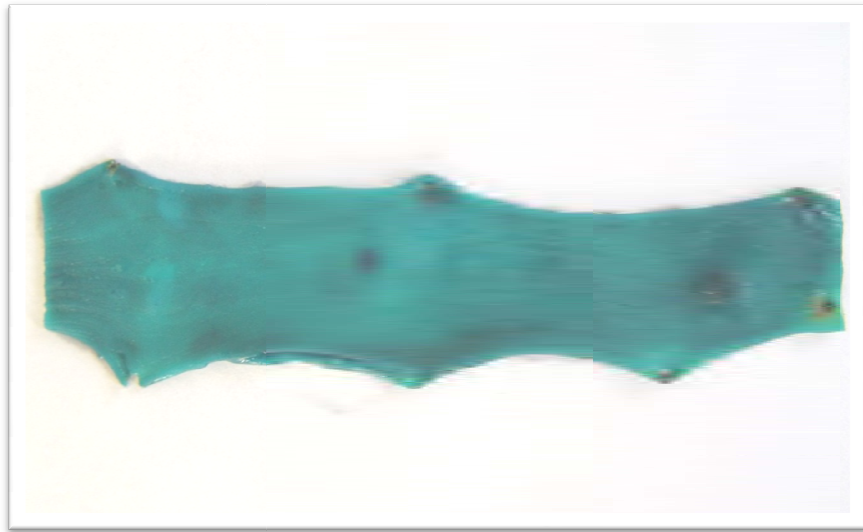


Figura 3

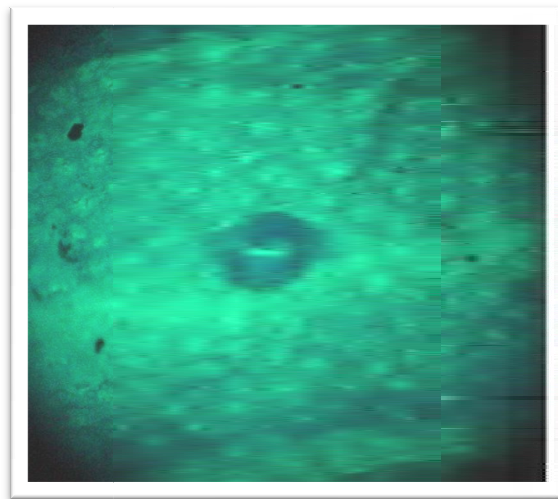


Figura 4

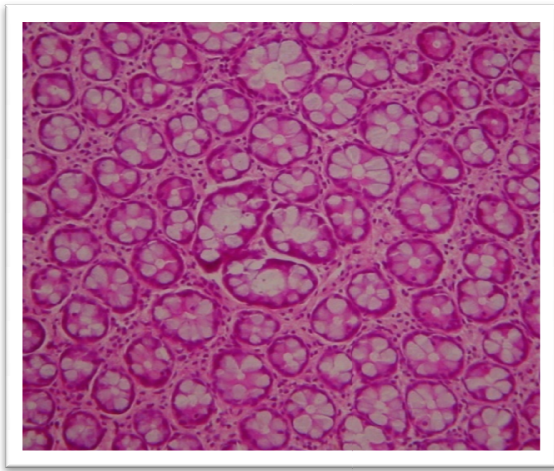


Figura 5

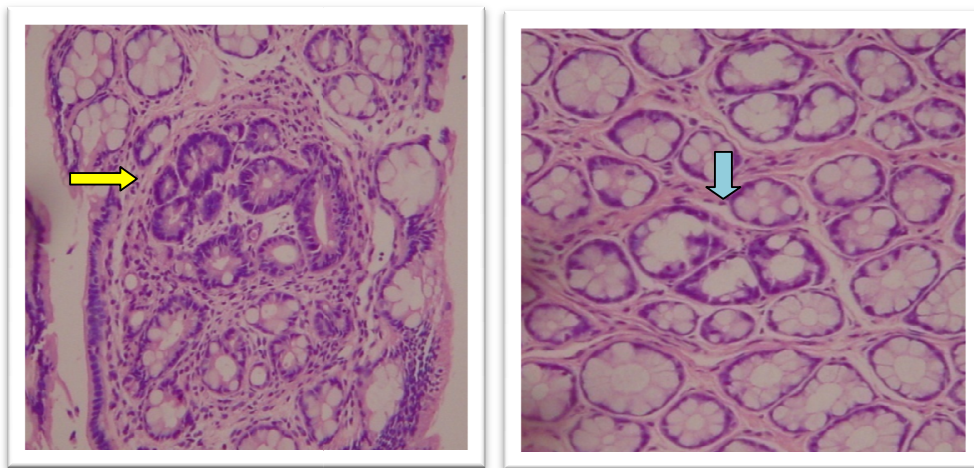
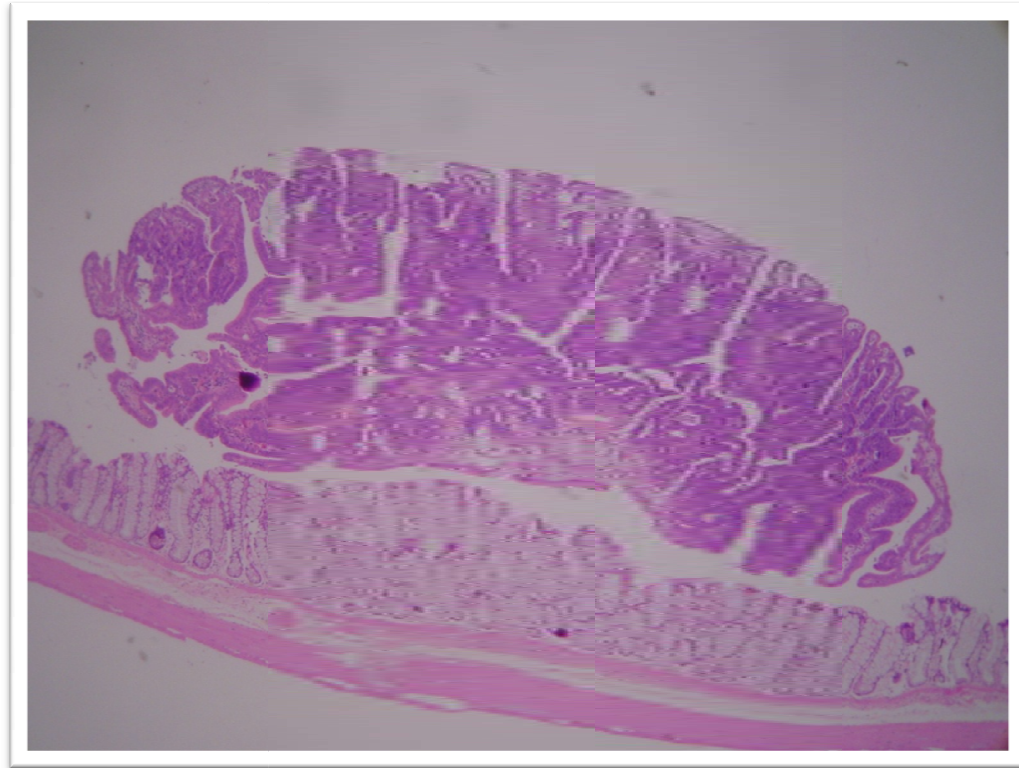


Figura 6



Legendas de tabelas

Tabela 1: Peso inicial e final, ganho de peso e consumo de ração e cogumelo *Agaricus blazei* em protocolo de média duração (20 semanas).

Tabela 2: Número de focos de criptas aberrantes (FCA) e multiplicidade de criptas (cripta/FCA) no cólon médio e cólon distal e reto em protocolo de média duração (20 semanas), avaliados pela leitura estereoscópica em coloração pelo azul de metileno.

Tabela 3: Número de focos de criptas aberrantes (FCA) e multiplicidade de criptas (cripta/FCA) no cólon médio e cólon distal e reto em protocolo de média duração (20 semanas), avaliados pela leitura de cortes histológicos *en face*, em objetiva de 20x, pela coloração de HE.

Tabela 4: Número de focos de criptas aberrantes displásicas (FCAd) e multiplicidade de criptas displásica (cripta aberrante/FCAd) no cólon médio e cólon distal e reto em protocolo de média duração (20 semanas), avaliados pela leitura de cortes histológicos *en face*, em objetiva de 20x, pela coloração de HE.

Tabela 5: Incidência de tumores e criptas displásicas, multiplicidade e distribuição em protocolo de média duração (20 semanas).

Tabela 1

Grupo/Tratamento	Número de ratos	Peso corpóreo inicial	Peso corpóreo final	Ganho de peso corpóreo	Consumo de ração (g/rato/dia)	Consumo de <i>Agaricus</i> (g/rato/dia)
(G1) Controle	5	228,6 ± 15,9	466,4 ± 41,3	237,8 ± 30,6	24,8 ± 1,64	0
(G2) <i>Agaricus</i> 5%	5	226,0 ± 11,7	472,0 ± 15,8	246,0 ± 5,2	25,6 ± 1,76	1,28
(G3) DMH	10	228,3 ± 16,9	470,3 ± 29,5	242 ± 32,7	24,6 ± 1,84	0
(G4) DMH + <i>Agaricus</i> 5%	10	224,9 ± 13,3	465,4 ± 29,7	240,5 ± 27,4	25,8 ± 2,11	1,29

Valores apresentados na forma de: grama (g) ± DP; DMH = 1,2-dimetilhidrazina (40 mg/kg, SC); *Agaricus* 5% = ração comercial adicionada do cogumelo *Agaricus blazei* na concentração de 5%.

Significância $p < 0,05$.

Tabela 2

Grupo/Tratamento	Número de ratos	Número de focos de criptas aberrantes				Número total CA	Número total FCA	Cripta/FCA
		1 cripta	2 criptas	3 criptas	> 4 criptas			
Cólon médio								
(G1) Controle	5	0	0	0	0	0	0	0
(G2) <i>Agaricus</i> 5%	5	0	0	0	0	0	0	0
(G3) DMH	10	73,9 ± 44,44	56,3 ± 29,08	42,3 ± 18,54	59,4 ± 30,27	604,9 ± 248,33	231,9 ± 96,37	2,65 ± 0,50
(G4) DMH + <i>Agaricus</i> 5%	10	71,2 ± 53,48	52,8 ± 25,64	46,8 ± 21,94	64,7 ± 31,16	636,4 ± 284,06	235,5 ± 109,95	2,68 ± 0,33
Cólon distal e reto								
(G1) Controle	5	0	0	0	0	0	0	0
(G2) <i>Agaricus</i> 5%	5	0	0	0	0	0	0	0
(G3) DMH	10	49,8 ± 29,83	55,5 ± 35,31	36,6 ± 21,18	37,7 ± 23,97	446,5 ± 214,98	179,6 ± 87,94	2,52 ± 0,42
(G4) DMH + <i>Agaricus</i> 5%	10	43,6 ± 36,02	50,9 ± 32,12	40,4 ± 19,61	32,2 ± 18,13	412,8 ± 204,60	167,1 ± 90,06	2,46 ± 0,40

Valores apresentados na forma de: média ± DP; DMH = 1,2-dimetilhidrazina (40 mg/kg, SC); *Agaricus* 5% = ração comercial adicionada do cogumelo *Agaricus blazei* na concentração de 5%; CA = cripta aberrante; FCA = foco de cripta aberrante.

Significância $p < 0,05$.

Tabela 3

Grupo/Tratamento	Número de ratos	Número de focos de criptas aberrantes				Número total CA	Número total FCA	Cripta/FCA	FCA/cm ²
		1 cripta	2 criptas	3 criptas	> 4 criptas				
(G1) Controle	5	0	0	0	0	0	0	0	0
(G2) <i>Agaricus</i> 5%	5	0	0	0	0	0	0	0	0
(G3) DMH	10	2,0 ± 1,80	2,55 ± 2,45	3,2 ± 2,96	7,45 ± 6,37	56,4 ± 45,60	15,2 ± 11,10	3,23 ± 1,28	27,18
(G4) DMH + <i>Agaricus</i> 5%	10	1,4 ± 1,81	3,35 ± 2,43	4,85 ± 3,34	7,55 ± 6,04	64,78 ± 41,50	18,05 ± 10,66	3,44 ± 0,59	30,38

Valores apresentados na forma de: média ± DP; DMH = 1,2-dimetilhidrazina (40 mg/kg, SC); *Agaricus* 5% = razão comercial adicionada do cogumelo *Agaricus blazei* na concentração de 5%; CA = cripta aberrante; FCA = foco de cripta aberrante.

Significância $p < 0,05$.

Tabela 4

Grupo/Tratamento	Número de ratos	Número de focos de criptas displásicas				Número total CAd	Número total FCAd	Cripta/FCAd	FCAd/cm ²
		1 cripta	2 criptas	3 criptas	> 4 criptas				
(G1) Controle	5	0	0	0	0	0	0	0	0
(G2) <i>Agaricus</i> 5%	5	0	0	0	0	0	0	0	0
(G3) DMH	10	0,3 ± 0,67	0,9 ± 0,88	1,4 ± 1,78	4,5 ± 4,35	32 ± 27,02	7,1 ± 5,38	4,06 ± 1,69	3,29
(G4) DMH + <i>Agaricus</i> 5%	10	0,1 ± 0,32	0,5 ± 0,71	1,1 ± 1,10	2,0 ± 1,49	13,7 ± 2,41	3,7 ± 2,41	2,54 ± 1,82	1,94

Valores apresentados na forma de: média ± DP; DMH = 1,2-dimetilhidrazina (40 mg/kg, SC); *Agaricus* 5% = razão comercial adicionada do cogumelo *Agaricus blazei* na concentração de 5%; CAd = cripta aberrante displásica; FCAd = foco de cripta aberrante displásica.

Significância $p < 0,05$.

Tabela 5

Grupo/Tratamento	Número de ratos	Número de criptas displásicas	Número de ratos portadores de tumores	Número total de tumores	Número de tumores por rato
(G1) Controle	5	0	0	0	0
(G2) <i>Agaricus</i> 5%	5	0	0	0	0
(G3) DMH	10	71	3	3	0,3
(G4) DMH + <i>Agaricus</i> 5%	10	37	3	4	0,4

Valores apresentados na forma de: somatória; DMH = 1,2-dimetilhidrazina (40 mg/kg, SC); *Agaricus* 5% = ração comercial adicionada do cogumelo *Agaricus blazei* na concentração de 5%; CA = cripta aberrante; FCA = foco de cripta aberrante.
Significância $p < 0,05$.

VI. *Conclusões Gerais*

O cogumelo *Agaricus blazei* administrado oralmente na forma de pó, na concentração de 5%:

1) Não mostrou ação iniciadora ou promotora de lesões pré-neoplásicas no cólon e reto de ratos Wistar machos.

2) Não interferiu sobre a atividade proliferativa das células epiteliais da mucosa do cólon, tanto no grupo exposto ao cancerígeno químico, como no respectivo controle.

3) Não mostrou ação inibidora ou protetora da iniciação do câncer de cólon e reto induzido pela DMH em ratos Wistar machos.

4) Não mostrou ação inibidora ou protetora da formação de lesões pré-neoplásicas (focos de criptas aberrantes) do cólon e reto induzido pela DMH em ratos Wistar machos.

5) Não mostrou ação inibidora ou protetora da formação de neoplasias do cólon e reto induzido pela DMH em ratos Wistar machos.