

Universidade de Brasília – UnB
Faculdade de Ciências da Saúde
Pós-Graduação em Nutrição Humana

Vanessa Cunha Taveira

**Aspectos Farmacológicos e Nutricionais do Fungo *Agaricus*
sylvaticus no Tumor Sólido de Walker 256**

Brasília

2007

VANESSA CUNHA TAVEIRA

**Aspectos Farmacológicos e Nutricionais do Fungo *Agaricus sylvaticus* no
Tumor Sólido de Walker 256**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Nutrição Humana no Curso de Pós-Graduação em Nutrição Humana do Departamento de Nutrição, da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Maria Rita Carvalho Garbi Novaes

Brasília

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Taveira, Vanessa Cunha.

Aspectos Farmacológicos e Nutricionais do Fungo *Agaricus sylvaticus* no Tumor Sólido de Walker 256/ Vanessa Cunha Taveira – Brasília, 2007

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília – Faculdade de Ciências da Saúde – Departamento de Nutrição – Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Título em inglês: Pharmacological and Nutritional Aspects of the Fungus *Agaricus sylvaticus* on the Walker 256 Solid Tumor.

1. *Agaricus sylvaticus*
2. tumor de Walker
3. Adjuvante

VANESSA CUNHA TAVEIRA

Aspectos Farmacológicos e Nutricionais do Fungo *Agaricus sylvaticus* no Tumor Sólido de

Walker 256

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Nutrição Humana, Departamento de Nutrição, Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Nutrição Humana.

BANCA EXAMINADORA

PRESIDENTE: Prof^ª Dr^ª Maria Rita Carvalho Garbi Novaes
Departamento de Nutrição
Faculdade de Ciências da Saúde
Universidade de Brasília

2º MEMBRO: Prof^ª Dr^ª Vânia Maria Moraes Ferreira
Departamento de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Faculdade de Ciências da Saúde
Universidade de Brasília

3º MEMBRO: Prof^ª Dr^ª Egle Machado de Almeida Siqueira
Departamento de Nutrição
Faculdade de Ciências da Saúde
Universidade de Brasília

4º MEMBRO: Prof^ª Dr^ª Wilma Maria Coelho Araújo
Departamento de Nutrição
Faculdade de Ciências da Saúde
Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Senhor de todas as coisas, por sua incomparável presença que me deu força e perseverança desde o planejamento do experimento até a consolidação dos dados. A Nossa Senhora poderosa intercessora por sempre ser meu apoio e refúgio.

Não existem palavras para expressar aos meus pais Paulo e Lourdes e minhas irmãs Clarice e Mariane a minha gratidão pelo amor, apoio incondicional, incentivo e ajuda incomparável em todos os momentos.

À minha orientadora a Prof^{ra}. Dra. Maria Rita Novaes pelo exemplo, incentivo e pelas sugestões sempre pertinentes que contribuíram enormemente para o aprimoramento deste trabalho.

Aos companheiros do Laboratório de Cirurgia Experimental: Dedé, Gabriela, Édelyn, Renata, Leo, dona Maria, Rafael, Carvalho e Helena pela amizade, apoio, carinho, compreensão e por acompanharem de perto o experimento e nunca medirem esforços para ajudar.

Aos meus amigos Marcelo e Monique alunos da Escola Superior de Ciências da Saúde (ESCS/FEPECS) por participarem prestando grande ajuda nos experimentos, pela presença constante e o interesse e por se alegrarem juntamente comigo a cada resultado positivo obtido.

Às minhas companheiras Viviane e Andresa alunas da Escola Superior de Ciências da Saúde (ESCS/FEPECS) por ensinarem toda a parte experimental com muito carinho e paciência.

A todos os colegas do curso de Pós Graduação em Nutrição Humana, em especial à Renata, que sempre fizeram sugestões valiosas para o aprimoramento do meu trabalho e dos meus conhecimentos.

À Francisca pelo grande e valioso apoio nas análises estatísticas.

À equipe do Laboratório Sabin e do Núcleo de Apoio à Pesquisa pela grande ajuda prestada e pela seriedade e competência com que realizaram as análises.

À Adriana, doutoranda e à Rilva, técnica do Laboratório de Farmacologia Molecular por sua constante boa vontade em ajudar.

A todos os meus familiares e amigos que acompanharam de longe ou de perto incentivando e apoiando o meu trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Objetivo Geral.....	15
1.2. Objetivos Específicos.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. Base Conceitual.....	16
2.2. Carcinogênese.....	16
2.3. Taxonomia, Morfologia e Biologia dos Agaricales com Interesse Farmacológico.....	21
2.4. Aspectos Nutricionais dos Fungos Agaricales.....	22
2.5. Aspectos Farmacológicos dos Fungos Agaricales.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1. Preparação dos Animais.....	26
3.2. Forma de Preparo das Soluções de <i>A. sylvaticus</i> e Placebo.....	26
3.3. Dieta dos animais e posologia do <i>A. sylvaticus</i> (Agaricaceae).....	27
3.4. Procedência, Manutenção e Inoculação do Tumor Sólido de Walker 256.....	27
3.5. Amostragem e Grupos de Estudo.....	28
3.6. Peso da Carcaça.....	29
3.7. Tempo de Sobrevivência dos Animais.....	29
3.8. Avaliação Clínica dos Animais.....	30
3.9. Exame Anátomo-patológico dos Animais.....	32
3.10. Pesagem e Determinação do Volume dos Tumores.....	32
3.11. Análise Bioquímica.....	33
3.12. Análise Hematológica.....	33
3.13 Análise Estatística.....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1 Artigo 1.....	35
4.2. Artigo 2.....	58
CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
ANEXO A.....	89
ANEXO B.....	90
ANEXO C.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

A. bisporus – *Agaricus bisporus*

a.C. – Antes de Cristo

ACS – American Cancer Society

A. sylvaticus- *Agaricus sylvaticus*

CHGM – concentração de hemoglobina globular média

d.C. – Depois de Cristo

EDTA – Ethylene Diamine Tetracetic Acid

HGM – hemoglobina globular média

HIV – Human Immunodeficiency Virus

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IL- Interleucina

Kcal - Kilocaloria

LPL- Lipoproteína-lipase

NF- Nuclear Factor

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – proteína C reativa

TNF- Tumor Necrosis Factor

VGM – volume globular médio

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Materiais e Métodos - Avaliação de dor, sofrimento e desconforto em animais experimentais.....	31
Tabela 1 – Artigo 1 - Hemograma completo de animais controle tratados com placebo (Grupo I), animais controle tratados com <i>A. sylvaticus</i> (Grupo II), animais inoculados com tumor de Walker tratados com placebo (Grupo III) e animais inoculados com tumor de Walker tratados com <i>A. sylvaticus</i> (Grupo IV).	45
Tabela 2 – Artigo 2 - Parâmetros bioquímicos de animais controle tratados com placebo (Grupo I), animais controle tratados com <i>A. sylvaticus</i> (Grupo II), animais inoculados com tumor de Walker tratados com placebo (Grupo III) e animais inoculados tratados com <i>A. sylvaticus</i> (Grupo IV).....	46
Tabela 1–Artigo 2 - Avaliação de dor, sofrimento e desconforto em animais experimentais.....	67
Tabela 2 – Artigo 2 - Volume dos tumores de animais inoculados com tumor de Walker tratados com solução placebo (grupo III) e inoculados com tumor de Walker e tratados com <i>A. sylvaticus</i> (grupo IV).....	70
Tabela 3 – Artigo 2 Tempo de sobrevivência de animais inoculados com tumor de Walker e tratados com placebo (grupo IIIS) ou <i>A.sylvaticus</i> (grupo IVS).....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Revisão Bibliográfica – <i>Agaricus sylvalticus</i>.....	22
Figura 2 – Materiais e Métodos - Realização de gavagem orogástrica em animal experimental.....	27
Figura 3 – Materiais e Métodos - Medição de um tumor retirado no 13º dia após a inoculação.....	32
Figura 4 - Materiais e Métodos - Realização de punção cardíaca para coleta de sangue venoso.....	33
Figura 1 – Artigo 2 Animal com tumor sólido de Walker 256 no 13º após a inoculação dilobular na região dorso-lombar.....	71
Figura 2 – Artigo 2 - Aspectos macroscópicos do tumor sólido de Walker 256, extraído durante a necropsia de um animal no 13º dia após a inoculação.....	71
Figura 3 – Artigo 2 - Pequenas massas palpáveis na região torácica identificadas como metástases distais.....	71
Figura 4 – Artigo 2 - Animais com câncer apresentando olhos pálidos e piloereção.....	72
Figura 5 –Artigo 2-Animal sadio apresentando comportamento exploratório característico, pelagem com aspecto normal e olhos normocorados.....	72

RESUMO

INTRODUÇÃO: O câncer é considerado a segunda principal causa de morte em vários países do mundo apesar dos avanços da terapêutica. Em países Orientais cogumelos comestíveis especialmente os da família Agaricaceae fazem parte da medicina tradicional e são extensamente utilizados no tratamento do câncer devido às suas propriedades nutricionais que atuam na melhora das alterações metabólicas constantemente presentes em pacientes portadores de tumores malignos e também devido às suas propriedades farmacológicas que atuam principalmente no aumento da resposta imunológica.

OBJETIVOS: Avaliar os efeitos farmacológicos e nutricionais do fungo *Agaricus sylvaticus* (Agaricaceae) em animais inoculados com tumor sólido de Walker 256.

MATERIAIS E MÉTODOS: Foram utilizados 120 ratos machos adultos separados em 6 grupos, sendo 2 grupos controle não inoculados com tumor de Walker: Grupo I – tratado com solução placebo por gavagem a cada 12 horas por 12 dias e Grupo II- tratado com solução de *A. sylvaticus* por gavagem a cada 12 horas por 12 dias. Quatro grupos foram inoculados com tumor de Walker e tratados da seguinte forma: Grupo III – tratado com solução placebo por gavagem a cada 12 horas por 12 dias; Grupo IIIS – tratado com solução placebo por gavagem a cada 12 horas até o dia do óbito para avaliação do tempo de sobrevivência; Grupo IV tratado com solução de *A. sylvaticus* a cada 12 horas por 12 dias e Grupo IVS – tratado com solução *A. sylvaticus* a cada 12 horas até a data do óbito. Para a análise das variáveis estudadas, foram realizadas avaliações clínicas, hemograma completo, exame bioquímico, medição dos tumores, necropsia e avaliação do tempo de sobrevivência.

RESULTADOS: Todos os animais inoculados com tumor apresentaram anemia normocítica, alteração das taxas de creatinina, uréia, triglicerídeos, glicose e proteína C reativa, perda de peso, sinais clínicos e mudança de comportamento característico de dor, sofrimento e desconforto. Os animais inoculados com tumor tratados com *A. sylvaticus* apresentaram valores de hematócrito e hemoglobina mais próximos dos valores de referência comparados aos animais inoculados com tumor tratados com placebo ($p < 0,05$) indicando uma melhora do quadro anêmico. Os exames bioquímicos mostraram que as taxas de uréia, triglicerídeos e proteína C reativa foram mais próximas do normal nos animais inoculados com tumor tratados com *A. sylvaticus* comparados aos animais inoculados com tumor tratados com placebo ($p < 0,05$). Na avaliação clínica os animais com tumor tratados com o fungo apresentaram menor incidência de sinais característicos de dor e sofrimento comparados aos tratados com placebo ($p < 0,01$). O volume tumoral também foi menor no grupo tratado com cogumelo comparado ao grupo não tratado ($p < 0,05$). Não foi observado aumento da sobrevivência dos animais tratados com *A. sylvaticus* ($p > 0,05$). Os animais controle tratados com *A. sylvaticus* não apresentaram alterações hematológicas, bioquímicas ou clínicas, comparados aos animais controle tratados com placebo o que indica que este fungo apresenta boa tolerabilidade.

CONCLUSÃO: Estes resultados sugerem que o fungo *A. sylvaticus* pode ser utilizado como adjuvante no tratamento do câncer atuando na melhora do quadro clínico.

PALAVRAS CHAVE: *Agaricus sylvaticus*, tumor de Walker 256, adjuvante.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Cancer is the second cause of death in a great number of countries despite therapeutic advances. In Oriental countries such as Japan and China, edible mushrooms, specially the ones belonging to Agaricaceae family are ingredients of traditional medicine and are widely used as adjuvants in the treatment of cancer due to its nutritional properties that improve metabolic alterations and also to its pharmacological properties that increase the immunological response.

AIM: The aim of the present study was to evaluate the pharmacological and nutritional properties of the mushroom *Agaricus sylvaticus* (Agaricaceae) in animals inoculated with Walker 256 tumor.

MATERIALS AND METHODS: 120 male Wistar rats, adults were separated in 6 groups. Two control groups: Group I- treated with placebo solution by gavage every 12 hours for 12 days and Group II- treated with *A. sylvaticus* solution by gavage every 12 hours for 12 days. Four groups of animals were inoculated with Walker 256 tumor and separated as following: Group III – treated with placebo solution by gavage every 12 hours for 12 days; Group IIIS – treated with placebo solution by gavage every 12 hours until the day of death to evaluate animal's surviving time; Grupo IV- treated with *A. sylvaticus* solution by gavage every 12 hours for 12 days and Group IV- treated with *A. sylvaticus* solution by gavage every 12 hours until the day of death.

RESULTS: The control animals treated with *A. sylvaticus* presented no alterations in clinical, hematological and biochemical analyses compared to control animals treated with placebo indicating that this fungus is well tolerated. The animals inoculated with tumor presented normocytic anemia, alteration in creatinine, urea, triglicerides, glucose and C reactive protein rates, weight loss, clinical signs and behavioural changes that are characteristics of pain and suffering. Cancer animals treated with *A. sylvaticus* presented hematocrit and hemoglobin rates nearer the normal values when compared to animals treated with placebo ($p < 0,05$), indicating an improvement of anemic state. The biochemical exams showed an improvement of urea, triglicerides and C reactive protein rates in the animals treated with *A. sylvaticus*, compared to animals treated with placebo ($p < 0,05$). In clinical evaluation the animals treated with the fungus presented less incidence of characteristic signs of pain and suffering compared to the ones treated with placebo ($p < 0,01$). The tumoral volume was also smaller in the group treated with mushroom compared to the no treated group ($p < 0,05$). It was not observed an improvement in surviving time in the animals treated with *A. sylvaticus* ($p > 0,05$).

CONCLUSION: These results suggest that the edible mushroom *A. sylvaticus* can be used as an adjuvant in cancer treatment to improve patient's clinical state.

KEY WORDS: *Agaricus sylvaticus*, cancer, adjuvant.

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença que apresenta diferentes manifestações clínicas, variadas localizações topográficas e mesmo dentro de uma mesma topografia apresenta diferentes tipos morfológicos que guardam em comum duas características biológicas principais: o crescimento celular descontrolado e a capacidade de se estender para além do tecido de origem. Estas características são resultado de eventos diversos, que são iniciados a partir de alterações moleculares progredindo para as alterações genéticas, cromossômicas, nucleares, celulares, teciduais, orgânicas e então sistêmicas ¹.

Teorias atuais definem o câncer como um tecido anormal gerado por mutações gênicas ². A carcinogênese é resultado do acúmulo de defeitos genéticos na célula que resultam em comportamentos anormais como: estímulo mitogênico constante, insensibilidade aos sinais inibidores de crescimento e pró-apoptóticos, potencial proliferativo ilimitado, angiogênese, invasão e metástase ³.

O câncer é uma doença com alta prevalência associada a altas taxas de mortalidade sendo a segunda principal causa de morte em vários países do mundo ⁴. Segundo o Instituto Nacional do Câncer no Brasil estimativa para o ano de 2006 era de 234.570 novos casos para o sexo masculino e 237.480 para o sexo feminino, estando em primeiro lugar o câncer de pele não melanoma e em seguida os tumores de mama e próstata ⁵.

O tratamento atual do câncer consiste na radioterapia, quimioterapia e cirurgia. Alguns tumores em estágios iniciais podem ser curados com uma modalidade terapêutica isolada enquanto no tratamento de tumores avançados e com metástases distais são utilizadas associações terapêuticas ⁶.

Desde a última década tem sido observado o aumento do uso de terapias não convencionais mesmo em países desenvolvidos. A busca por formas de cura alternativas deve-se a uma falta de uniformidade na cura do câncer e da necessidade de reduzir a ansiedade e de retomar o controle da saúde ⁷.

Alguns cogumelos comestíveis são utilizados em todo o mundo como fontes de nutrientes e possuem substâncias com efeito farmacológico que podem ser benéficas na terapia adjuvante do câncer ⁸. O documento mais antigo sobre os cogumelos como agentes medicinais foi escrito na Índia, 3000 anos antes de Cristo. Na China os efeitos benéficos de várias espécies foram compilados no "Shen Nong Ben Cao Jing", uma espécie de matéria médica escrita entre 200 a.C e 200 d.C. ⁹.

O efeito antitumoral é atribuído à restauração e melhora da resposta imunológica através da estimulação da imunidade celular por polissacarídeos que estão presentes na composição dos cogumelos ¹⁰. Substâncias com ação antitumoral foram também identificadas além de metabólitos com ação antiinflamatória em espécies do gênero *Agaricus* ^{11, 12}. Nutrientes essenciais como proteínas, aminoácidos e carboidratos são encontrados em cogumelos, desta forma estes podem reduzir as deficiências nutricionais bem como a progressão da caquexia melhorando a qualidade de vida do paciente ^{13, 14}.

Ensaio *in vitro*, *in vivo* e clínicos mostram a ação benéfica de fungos medicinais em várias doenças principalmente no câncer, sendo estes utilizados como adjuvantes terapêuticos. Desta forma, algumas espécies como o *Agaricus sylvaticus* vem despertando o interesse de pesquisadores visto que esta espécie é rica em substâncias farmacologicamente ativas e nutrientes essenciais, demonstrando boa tolerabilidade e baixíssima toxicidade ^{15, 16, 17}.

Neste estudo pretende-se desenvolver primeiramente os conceitos e discussões sobre o câncer, origem, tratamentos e epidemiologia, bem como a terapia adjuvante com cogumelos comestíveis sendo abordados também a biologia, taxonomia e morfologia dos fungos agaricales suas propriedades farmacológicas e nutricionais no item revisão de literatura. A dissertação foi elaborada no formato de artigo, sendo os resultados e discussão apresentados em dois artigos. O primeiro: “Efeitos do cogumelo comestível *Agaricus sylvaticus* sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos de animais inoculados com tumor sólido de Walker 256”, traz uma pequena revisão sobre anemia e alterações bioquímicas dos pacientes com câncer e demonstra como o cogumelo *A. sylvaticus* foi capaz de melhorar o quadro anêmico e os parâmetros bioquímicos de animais portadores de um tumor experimental. O segundo artigo: “Efeitos farmacológicos do cogumelo *Agaricus sylvaticus* sobre o tumor sólido de Walker 256”, aborda os efeitos secundários do câncer e suas implicações para a qualidade de vida e sobrevida e mostra como o cogumelo *Agaricus sylvaticus* atua na melhora do quadro clínico, reduz o crescimento tumoral e a ocorrência de metástases em animais inoculados com tumor experimental.

1.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos farmacológicos e nutricionais do fungo *Agaricus sylvaticus* em ratos inoculados com tumor sólido de Walker 256.

1.2. Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos do tratamento com o fungo *Agaricus sylvaticus* no tempo de sobrevivência dos animais inoculados com Tumor sólido de Walker 256;
- Avaliar os efeitos do tratamento com o fungo *Agaricus sylvaticus* na melhora do quadro clínico dos animais inoculados com Tumor sólido de Walker 256;
- Avaliar os efeitos do tratamento com o fungo *Agaricus sylvaticus* no crescimento tumoral e na disseminação metastática nos animais inoculados com Tumor sólido de Walker 256;
- Avaliar a ocorrência de alterações hematológicas e bioquímicas após a suplementação dietética com fungos *Agaricus sylvaticus* nos animais com Tumor sólido de Walker 256.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Base Conceitual

A seguir serão apresentados os conceitos que fundamentam a discussão a ser realizada nessa dissertação. Tais conceitos englobam a carcinogênese e seus efeitos e os tratamentos utilizados atualmente; os aspectos farmacológicos e nutricionais dos fungos agaricales e a utilização do fungo *Agaricus sylvaticus* no tratamento adjuvante do câncer.

2.2. Carcinogênese

A proliferação exacerbada das células é a base da formação de tumores em consequência de deficiências na regulação do ciclo celular¹⁸. As células tumorais apresentam crescimento anormal e diferem das células normais por não serem responsivas aos mecanismos que controlam a divisão celular, possuem potencial replicativo ilimitado e serem capazes de escapar da apoptose. Câncer é um tumor bem desenvolvido com capacidade específica para invadir e destruir o parênquima do órgão afetado. O substrato nutricional para estas células provém da circulação sanguínea sendo que estas são capazes de produzir proteínas que estimulam o crescimento de vasos sanguíneos para suprir o tumor^{19, 20}.

Progressos no entendimento dos mecanismos da carcinogênese têm sido feitos a partir da descoberta dos oncogenes, protooncogenes e genes supressores de tumores. Os proto-oncogenes codificam várias das proteínas do complexo sinalizador que permite à célula normal responder a fatores de crescimento exógenos. Oncogenes são celulares ou inseridos na célula por vírus e participam deste circuito de sinalização, porém apresentam um comportamento aberrante. As proteínas codificadas pelos oncogenes ativam o circuito

de divisão celular mesmo na ausência de fatores de crescimento extracelular, forçando as células a iniciarem o processo de divisão ²¹. Os genes supressores de tumores têm habilidade de induzir a morte celular programada suprimindo o crescimento de células tumorais que contenham múltiplas alterações genéticas ^{22, 23, 18, 24}.

Vários agentes estão direta ou indiretamente relacionados ao surgimento de tumores. A ligação dos agentes carcinogênicos ao DNA das células provoca mutações que podem agir de várias formas incluindo a promoção direta da proliferação celular ou o bloqueio da apoptose resultando um acúmulo de danos celulares que não foram reparados ³. Os agentes que podem causar danos ao DNA incluem produtos naturais do metabolismo como as espécies reativas de oxigênio, produtos da peroxidação lipídica, agentes alquilantes, estrógenos, espécies reativas de nitrogênio, agentes clorinantes e certos intermediários de algumas vias metabólicas, fontes exógenas inevitáveis tais como radiações ultravioleta e radiações ionizantes de ocorrência natural e substâncias químicas genotóxicas presentes naturalmente ou como contaminantes na dieta e no ar ²⁵.

As células tumorais geralmente diferem histologicamente de suas correspondentes normais, sendo menos especializadas nas suas funções. Conforme as células cancerosas vão substituindo as normais os tecidos invadidos vão perdendo suas funções podendo levar à disfunção orgânica e conseqüentemente à falência do órgão sendo esta a causa de muitas complicações e em casos mais graves pode levar o paciente a óbito ²⁶.

A massa tumoral presente do sítio de conversão das células normais em células tumorais é chamada de câncer primário. As células tumorais podem expandir como resultado da contínua divisão celular, invadindo os tecidos adjacentes ou podem formar metástases distais, considerando que estas estão pouco aderidas entre si e podem se desprender e atingir tecidos distantes migrando via circulação sanguínea ou linfática, sendo

que o local aonde estas células vão se alojar formando novos tumores é determinado por fatores quimiotáticos e de crescimento ^{27, 28}. As metástases são responsáveis pela maioria das falhas no tratamento e por 60% das mortes por câncer no mundo inteiro ²⁹.

As síndromes paraneoplásicas são o indicativo de que os tumores afetam os tecidos normais distantes do sítio primário. Estas síndromes são extremamente diversas e afetam todos os órgãos e tecidos. As manifestações clínicas mais freqüentes são: caquexia, anorexia, náusea, neuropatia, retinopatia, mal-estar generalizado e mau funcionamento dos órgãos. Entre 7 e 15% dos pacientes com câncer apresentam síndromes paraneoplásicas que podem ser o sinal da presença de um tumor ainda não descoberto, podem ocorrer em estágios avançados da doença ou serem o sinal de recidiva de uma neoplasia ^{3,30}.

Inúmeros efeitos sistêmicos são observados em pacientes com câncer em estágios mais avançados. Estes incluem a caquexia caracterizada pela perda de massa muscular e adiposa, supressão da imunidade, efeitos bioquímicos como redução da catalase hepática, albumina e ferro sérico ³¹. Ocorrem também alterações no metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídeos e alterações nas taxas de uréia, creatinina, triglicerídeos e glicose ^{32, 33}. Muitos destes efeitos estão associados a um mau prognóstico e uma redução da sobrevida dos pacientes ^{34, 31}.

A cada ano o câncer tem se consolidado como um problema de saúde pública em todo o mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer atinge pelo menos 9 milhões de pessoas e mata 5 milhões a cada ano, sendo hoje a segunda causa de morte por doenças em países desenvolvidos. A American Cancer Society (ACS) estima que mais de 1 milhão de novos casos sejam diagnosticados a cada ano ³⁵.

A distribuição das taxas de incidência e mortalidade de tumores malignos tem sido, em muitos países de grande importância para o estabelecimento de diretrizes de políticas

públicas e o planejamento de ações de prevenção e controle do câncer e de assistência paliativa, em âmbito nacional, estadual e municipal ³⁶.

Os tipos de câncer mais incidentes na população brasileira segundo as estatísticas realizadas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2006 seriam: o câncer de pele não melanoma (116 mil novos casos), seguido pelos tumores de mama feminina (49 mil), próstata (47 mil), pulmão (27 mil), cólon e reto (25 mil), estômago (23 mil) e colo de útero (19 mil) ⁵.

Os tumores mais incidentes para o sexo masculino seriam: o câncer de pele não melanoma (55 mil novos casos), próstata (47 mil), pulmão (18 mil), estômago (15 mil) e cólon e reto (11 mil). Para o sexo feminino destacam-se os tumores de pele não melanoma (61 mil novos casos), mama (49 mil), colo do útero (19 mil), cólon e reto (14 mil) e pulmão (9 mil) ⁵.

A distribuição de novos casos de câncer, é bem heterogênea entre estados e capitais do país, o que fica bem evidenciado ao se observar a representação espacial das diferentes taxas brutas de incidência. As regiões Sul e Sudeste apresentam as maiores taxas, enquanto as regiões Norte e Nordeste apresentam taxas mais baixas. As taxas da região Centro-Oeste apresentam um padrão mediano ⁵.

A radioterapia, quimioterapia e a cirurgia constituem atualmente o tratamento do câncer podendo ser combinadas quando os tumores encontram-se bastante desenvolvidos e com metástases distais ⁶. Na radioterapia, ondas eletromagnéticas penetram nos tecidos e dão origem a elétrons livres, radicais livres e espécies livres de oxigênio que são capazes de interagir com o DNA da célula causando a morte da mesma, desta forma atingindo células cancerosas e normais ³⁷. Os agentes quimioterápicos também interagem com o DNA da célula causando a morte da mesma e atuam de forma inespecífica danificando os tecidos

normais. A técnica cirúrgica pode levar à remoção de tumores sólidos com eficácia se não houver metástases ou extensa invasão tecidual ²⁶.

Terapias alternativas e adjuvantes são muitas vezes empregadas na melhora da qualidade de vida do paciente. A Organização Mundial de Saúde define qualidade de vida relacionada à saúde e estado subjetivo de saúde como : “conceitos centrados na avaliação subjetiva do paciente, mais necessariamente ligados ao impacto do estado de saúde sobre a capacidade do indivíduo viver plenamente ³⁸.

As terapias não convencionais são descritas como um conjunto de práticas de prevenção, diagnóstico e tratamento à parte do modelo médico dominante. Com a doença, particularmente o câncer, o indivíduo sente-se intimidado com a possibilidade do fim da sua existência. A ansiedade gerada determina comportamentos variados e leva à busca de outras formas de tratamento. Assim as práticas não convencionais dão ao paciente oncológico mais uma opção e complementação ao tratamento oficial a ele sugerido. Esta prática, no entanto deve ser aplicada com cautela devido ao risco do paciente abandonar o tratamento tradicional prejudicando as chances de cura e o risco de interações indesejáveis entre o tratamento padrão e as terapias alternativas ⁷.

Avanços no estudo do câncer e em formas terapêuticas eficazes vêm sendo feitos por pesquisadores do mundo inteiro. A utilização de modelos experimentais de câncer permite conhecer mais profundamente esta doença bem como testar novas modalidades terapêuticas. O carcinossarcoma de Walker foi descoberto e isolado por George Walker em 1928, a partir de um adenocarcinoma de mama de rata e vem sendo extensamente empregado no estudo da fisiopatologia do câncer ³⁹. Este tumor representa um bom modelo experimental pela facilidade de ser manipulado *in vitro* e falhas na inoculação ou remissão espontânea são raras ^{40,41}.

2.3. Taxonomia, Morfologia e Biologia dos Agaricales de Interesse Farmacológico

A rota taxonômica do *Agaricus sylvaticus* (Figura 1) é: Reino Fungi, divisão Basidiomycota, sub-divisão Homobasidiomycetidae, ordem Agaricales, família Agaricaceae, gênero *Agaricus*⁴². Os basidiomicetos fazem parte dos chamados fungos verdadeiros que somam aproximadamente 35% das espécies de fungos descritas na literatura. Seu impacto ecológico varia de acordo com seu estilo de vida podendo ser: saprófitas, que tem papel importante na reciclagem de material orgânico, simbiontes que formam ectomicorrizas com plantas vasculares, facilitando a absorção de nutrientes por essas e parasitas, capazes de causar doenças em plantas e animais⁴³. (renumerar as referências)

Os cogumelos são fungos macroscópicos que produzem enzimas capazes de degradar a matéria orgânica complexa e então absorver substâncias solúveis⁴⁴. Na verdade, o cogumelo constitui uma fase temporária do ciclo de vida destes fungos, é a estrutura onde ocorre a reprodução sexuada sendo também conhecido como corpo de frutificação, carpóforo ou basidiocarpo, atualmente denominado basidioma. Após a dispersão dos basidiósporos os basidiomas acabam apodrecendo ou sendo comidos por insetos, enquanto o organismo em si é formado pelo micélio vegetativo, que coloniza e explora o substrato⁴⁵.

O micélio é formado por células tubulares que se juntam formando filamentos que são chamados hifas. As hifas se juntam formando o micélio e estes em casos especiais formam tecidos como os corpos de frutificação. As células dos fungos não são protegidas por cutícula e contém quitina em sua composição⁴⁶.

O número estimado de espécies de cogumelos no mundo inteiro é de 140.000 sendo 2.000 consideradas próprias para consumo e 700 possuem propriedades farmacológicas

comprovadas ¹². No Brasil existem aproximadamente 136 gêneros e 1.011 espécies de acordo com um levantamento realizado entre 1990 e 1991. Estes números vêm sofrendo alterações com a descrição de novas espécies ⁴⁵.

A ordem Agaricales tem sido bastante estudada, compreende 300 gêneros e aproximadamente 5000 espécies em termos mundiais ⁴⁵. Poucos cogumelos são cultivados no mundo inteiro em escala comercial, entre estes podem ser citadas seis espécies: *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus brunescens*, *Agaricus bitorquis*, *Lentinula edodes*, *Volvariella volvacea* e *Flamulina velutipes* ⁴⁷.



Figura 1: *Agaricus sylvaticus*

2.4. Aspectos Nutricionais dos Fungos Agaricales

O uso de cogumelos na alimentação brasileira é pouco comum, apesar de seu sabor apreciável e de seu alto valor nutricional ⁴⁷. Estes estão entre as maiores fontes de nutrientes essenciais podendo ser comparados com carne, ovos e leite. São encontrados em sua composição: fibras, polissacarídeos estruturais, beta-glucanas, homo e hetero-glucanas, vitaminas como tiamina e riboflavina e minerais como fósforo, sódio, potássio e cálcio. O valor calóricos dos cogumelos *A. bisporus* e *Pleurotus ostreatus* é de 34 e 131 kcal em uma porção de 100g ^{48,49}.

A avaliação do perfil lipídico do cogumelo *A. bisporus*, revelou que este apresenta 10 ácidos graxos, sendo que o ácido linoleico e o oléico são os ácidos graxos insaturados predominantes e o ácido graxo saturado predominante é o ácido palmítico. Foi detectada a presença de esteróis, acilglicerois e fosfolípidos ⁵⁰.

A quantidade de proteínas presente em cogumelos da família Agaricaceae pode variar de 19 a 39% em peso seco. A análise de espécies do gênero *Agaricus* revelou a presença dos aminoácidos: ácido aspártico, treonina, serina, glutamina, glicina, valina, alanina, cisteína, metionina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, lisina, histidina, arginina e prolina ^{51, 52}.

O extrato aquoso do cogumelo *Agaricus sylvaticus* apresenta em sua composição de acordo com as análises do Japan Food Research Laboratories Center: carboidratos (18.51g/100g) lipídeos (0.04g/100g) ergosterol (624 mg/100g), proteínas (4.99g/100g), aminoácidos (arginina:1.14%; lisina:1.23%; histidina:0.51%; fenilalanina:0.92%; tirosina:0.67%; leucina:1.43%; metionina:0.32%; valina:1.03%; alanina:1.28%; glicina:0.94%; prolina:0.95%; ácido glutâmico:3.93%; serina:0.96%; treonina:0.96%; ácido aspártico:1.81%; triptofano:0.32%; cisteína:0.25%) e micronutrientes em quantidades traço.

2.5. Aspectos Farmacológicos dos Fungos Agaricales

Por vários séculos os povos asiáticos atribuíram propriedades medicinais aos cogumelos. Documentos foram escritos na China por volta do ano 500 a.C. sobre as propriedades do extrato do cogumelo *Ganoderma lucidum*, especialmente as propriedades anticancerígenas. As propriedades do fungo *Lentinula edodes* foram escritas no ano 1650 d.C na China sendo este considerado o elixir da vida por possuir a habilidade de aumentar a

energia vital. No final do século XX pesquisadores japoneses demonstraram as propriedades antitumorais do cogumelo *Agaricus blazei* sendo este atualmente o alvo de vários estudos⁵³.

Os fungos além de apresentarem em sua composição vários nutrientes, possuem substâncias com diversas ações farmacológicas. Estudos *in vivo* mostram que animais com deficiência de células-T, células natural killer ou moléculas específicas como interferon- δ , interleucina-12 e fator de necrose tumoral apresentaram maior incidência de tumores. A presença de substâncias imunomoduladoras justifica o uso dos cogumelos no tratamento de várias doenças por serem capazes de produzir o aumento da resposta imunológica do hospedeiro contra infecções fúngicas, bacterianas, virais bem como contra células tumorais^{54, 55}.

As beta-glucanas são um grupo heterogêneo de polímeros de glicose cuja cadeia principal é formada por unidades glucopiranosídica unidas por ligações $\beta(1\rightarrow3)$, $\beta(1\rightarrow4)$ ou ambas podendo ser simples ou ramificada e as cadeias laterais são unidas por ligações $\beta(1\rightarrow6)$. Os efeitos imunomoduladores estão ligados ao tamanho da cadeia, grau de ramificação e estrutura terciária. Os leucócitos possuem receptores de membrana para as glucanas. Em estudos *in vitro* estas substâncias foram capazes de estimular a produção de mediadores pro-inflamatórios e citocinas como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α ^{56, 54}.

Alguns autores sugerem que nutrientes específicos possam melhorar a resposta imunológica e conseqüentemente o prognóstico de pacientes com câncer, dentre estes nutrientes destaca-se o aminoácido arginina presente em espécies de fungos. Este aminoácido tem apresentado muitas ações farmacológicas e fisiológicas tais como: precursor metabólico da creatinina, creatina, poliaminas, óxido nítrico e importante participação no ciclo da uréia além de estar relacionado ao aumento da atividade das células

natural killer e células T-helper além de estimular a produção das citocinas interleucina 1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α).⁵⁷.

A fração lipídica de *Agaricus blazei* administrada a animais com tumores experimentais mostrou a redução do crescimento tumoral devido à presença do ergosterol que não tem ação citotóxica direta, porém inibe a neovascularização induzida pelo tumor. Em um estudo *in vivo* o ergosterol foi administrado na cavidade peritoneal de animais com carcinoma hepático de Lewis. Os resultados mostraram que esta substância foi capaz de reduzir o crescimento tumoral devido à redução da neovascularização do mesmo^{58,59}. Takei (2005) realizou um ensaio *in vitro* no qual mostrou que peróxidos de ergosterol extraídos de espécies de cogumelos são capazes de induzir apoptose em células HL60 de leucemia humana⁶⁰.

Lectinas são proteínas que têm a capacidade de se ligar irreversivelmente à carboidratos tendo propriedades biológicas como: aglutinação de hemácias e inibição do crescimento de determinadas células⁶¹. A lectina encontrada no fungo *Volvariella volvacea* apresenta ação antitumoral contra as células de sarcoma S180, a lectina extraída do fungo *Grifola frondosa* é citotóxica para as células HeLa enquanto a lectina de *Agaricus bisporus* possui atividade antiproliferativa contra a linhagem HT29 de câncer de cólon e a linhagem MCF-7 de tumor de mama. Estas substâncias têm se mostrado eficazes em ensaios clínicos para tratamento da psoríase⁶².

Muitos aspectos importantes como os mecanismos de ação e possíveis efeitos tóxicos das substâncias ativas encontradas em espécies de cogumelos que possuem atividade terapêutica ainda precisam ser elucidados através de ensaios *in vitro*, *in vivo* e clínicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Preparação dos Animais

Foram utilizados 120 ratos Wistar machos, com idade de 90 dias, isogênicos, com pequeno desvio padrão de peso. Todos foram distribuídos em gaiolas contendo cinco ratos e mantidos para ambientação durante os cinco dias que antecederam o início do tratamento, sob idênticas condições, com ciclos de luz de 12h/dia, água e ração *ad libitum*. Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília, em 12 de abril de 2004.

3.2. Forma de preparo das soluções de *Agaricus sylvaticus* e placebo

O extrato aquoso foi preparado a partir de uma infusão do cogumelo desidratado, em água filtrada inicialmente a 100° C por 30 minutos, liquidificado, peneirado e seco em dissecador. A solução final contendo extrato de *A. sylvaticus* apresenta a seguinte formulação: Extrato de *A. sylvaticus*, sorbato de potássio, extrato de cravo da índia, açúcar e xarope de glicose. A solução placebo apresenta em sua formulação: Sorbato de potássio, extrato de cravo da índia, extrato de canela, açúcar refinado e xarope de glicose.

Ambas as soluções foram obtidas de produtor da região de Tapiraí, interior do Estado de São Paulo, credenciado pela Empresa Brasileira de Agropecuária (Embrapa).

3.3. Dieta dos Animais e Posologia do *Agaricus sylvaticus* (Agaricaceae)

A ração utilizada no estudo foi Labina (Agribands Purina do Brasil, LTDA), que contém proteína (23,0%), minerais (8,0%), fibras (5,0%) e vitaminas (traços). A solução contendo *Agaricus sylvaticus* foi administrada na concentração de 50mg/kg/dia mediante procedimentos de gavagem orogástrica (Figura 2).



Figura 2: Realização de gavagem orogástrica em animal experimental.

3.4. Procedência, Manutenção e Inoculação do Tumor sólido de Walker 256

A linhagem A do tumor de Walker 256 (origem :The Crist Hospital Line, National Cancer Institute Bank, Cambridge, Mass., USA), foi obtida junto à Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e foi conservada em freezer -80°C. A técnica de inoculação utilizada nos animais foi dilobular e subcutânea, na região dorso-lombar, totalizando 2 inoculações por animal, com aproximadamente 4 milhões de células por inoculação, seguindo o protocolo de Novaes, 1999⁶³.

3.5. Amostragem e Grupos de Estudo

O número total de animais do experimento foi de 120 ratos machos que foram separados nos seguintes grupos:

Grupo I (n = 20): Controle/ placebo. Os animais não foram inoculados com tumor sólido Walker 256 e receberam solução placebo por gavagem a cada 12 horas por 12 dias. No 13º dia foi realizada coleta de sangue por punção cardíaca, em seguida eutanásia sob anestesia com halotano e a necropsia foi realizada imediatamente após o óbito do animal.

Grupo II (n = 20): Controle/agaricus. Os animais não foram inoculados com tumor sólido de Walker 256 e receberam suplementação com *A. sylvaticus* na dose de 50mg/kg de peso corporal por gavagem a cada 12 horas por 12 dias. No 13º dia foi realizada a coleta de sangue por punção cardíaca, em seguida eutanásia sob anestesia com halotano e a necropsia foi realizada imediatamente após o óbito do animal.

Grupo III (n = 20): Tumor/placebo. Os animais foram inoculados com tumor sólido de Walker 256. A administração da solução placebo foi iniciada 12 horas após a inoculação das células tumorais e mantida de 12 em 12 horas por 12 dias. No 13º dia foi realizada coleta de sangue por punção cardíaca e em seguida a eutanásia sob anestesia com halotano e a necropsia foi realizada imediatamente após o óbito do animal.

Grupo IIIS (n = 20): Tumor/placebo-sobrevida. Os animais foram inoculados com tumor sólido de Walker 256. A administração da solução placebo foi iniciada 12 horas após a inoculação das células tumorais e mantida de 12 em 12 horas até a data do óbito do animal para avaliação do tempo de sobrevida.

Grupo IV (n = 20): Tumor/agaricus. Os animais foram inoculados com tumor sólido de Walker 256. Foi administrada solução contendo o extrato de *A. sylvaticus* na dose de

50mg/kg de peso corporal por gavagem, sendo iniciada 12 horas após a inoculação das células tumorais e mantida de 12 em 12 horas por 12 dias. No 13º dia foi realizada a coleta de sangue, em seguida eutanásia sob anestesia com halotano e a necropsia foi realizada imediatamente após o óbito do animal.

Grupo IVS (n = 20): Tumor/agaricus-sobrevida. Os animais foram inoculados com tumor sólido de Walker 256. Foi administrada solução contendo extrato de *A. sylvaticus* na dose de 50mg/kg de peso corporal, por gavagem sendo iniciada 12 horas após a inoculação das células tumorais e mantida de 12 em 12 horas até a data do óbito do animal para avaliação do tempo de sobrevida.

3.6. Peso da Carcaça

O peso dos animais de cada grupo foi aferido a cada dois dias em balança semi-analítica. A alteração do peso corpóreo foi calculada pela subtração do peso final (animal morto) e o peso inicial. O peso da carcaça dos animais correspondeu ao último peso do animal subtraindo-se o peso dos tumores.

3.7. Tempo de Sobrevivência dos Animais

Os animais foram tratados até o dia do óbito e foi calculada a média entre grupos do tempo de sobrevivência.

3.8 Avaliação Clínica dos Animais

Fichas individuais para avaliação clínica foram utilizadas. Para cada parâmetro clínico foi dada uma pontuação de acordo com as reações apresentadas pelo animal segundo o sistema desenvolvido por Morton e Griffiths (1985)⁶⁴ (Tabela 1).

Tabela 1: Avaliação de dor, sofrimento e desconforto em animais experimentais:

Parâmetro	ID do animal	data	data
<i>Alterações ponderais</i>	Normal (0)		
	Incerto: < 5% de perda (1)		
	10 – 15% de perda; alterações nas fezes (2)		
	> 20% de perda; redução da ingestão de água e alimento (3)		
<i>Aparência física</i>	Normal (pelagem normal, olhos claros e brilhantes) (0)		
	Pelagem áspera (1)		
	Piloereção, secreção nasal e ocular (2)		
	Piloereção, postura anormal, olhos pálidos e pupilas dilatadas (3)		
<i>Sinais clínicos mensuráveis</i>	Normal (0)		
	Pequenas mudanças com significado importante (1)		
	Alteração da temperatura, alterações do ritmo cardíaco e respiratório > 30% (2)		
	Alteração da temperatura, alterações do ritmo cardíaco e respiratório > 50% (3)		
<i>Comportamento</i>	Normal (0)		
	Pequenas mudanças (1)		
	Redução da mobilidade, do estado de alerta, inatividade e separação do grupo (2)		
	Vocalizações espontâneas, auto-mutilação e imobilidade (3)		
<i>Respostas comportamentais aos estímulos externos</i>	Normal (0)		
	Depressão ou respostas exageradas (1)		
	Respostas moderadamente anormais, mudanças moderadas de comportamento (2)		
	Reações violentas a estímulos externos ou resposta muscular muito fraca (3)		

3.9. Exame Anátomo-patológico dos Animais

A necropsia dos animais foi realizada imediatamente após o óbito, mediante a dissecação total das vísceras.

3.10. Pesagem e Determinação do Volume Final dos Tumores

Os tumores foram pesados em balança analítica. O peso final refere-se à média dos 2 tumores de cada rato, conforme validado previamente (NOVAES *et al*, 1999). O volume do tumor estimado utilizando-se a fórmula: $V = L.W.D / 6$, onde L é o comprimento, W é a largura e D é a espessura. As medições foram realizadas com paquímetro, adotando-se a precisão de duas casas decimais (Figura 2). O instrumento foi aferido pela Associação Brasileira de Normas Técnicas-ABNT (Novaes, 1999) ⁶³.



Figura 3: Medição de um tumor retirado no 13º dia após a inoculação.

3.11. Análise Bioquímica: Dosagem de Creatinina, Uréia, Glicose, Triglicerídeos e Proteína C Reativa

Foram colhidos 2,5 ml de sangue venoso por punção cardíaca para realização da análise bioquímica do sangue dos animais.

Para dosagem de triglicerídeos, uréia, creatinina e glicose foi utilizado método colorimétrico enzimático e a dosagem de proteína C reativa foi realizada por turbidimetria.

3.12. Análise Hematológica

Foram colhidos 2,5 ml de sangue venoso com anticoagulante (EDTA a 10%) por punção cardíaca (Figura 3) então realizado o hemograma completo-dosagem de hemácias, hemoglobina, hematócrito e valores hematimétricos (VGM, HGM e CHGM). Dosagem de leucócitos sanguíneos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos), utilizando-se o aparelho Cell-dyn 3500.



Figura 4: Realização de punção cardíaca para coleta de sangue venoso.

3.11. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada pelo software Prisma versão 3.0. Os dados foram analisados utilizando-se procedimentos de análise de variância (ANOVA). A significância estatística aceita foi de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

4.1. ARTIGO 1- Enviado para publicação na revista *Annals of Nutrition and Metabolism*, da Universidade de Viena, indexada nas bases de dados: Medline, Lifesciences, Reference Update, Excerpta Medica e Biological Abstracts na data de 01/02/2007.

EFEITOS DO COGUMELO COMESTÍVEL *AGARICUS SYLVATICUS* SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS DE ANIMAIS INOCULADOS COM TUMOR SÓLIDO DE WALKER 256

EFFECTS OF THE EDIBLE MUSHROOMS *AGARICUS SYLVATICUS* ON THE HEMATOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF ANIMALS INOCULATED WITH WALKER 256 TUMOR.

Vanessa Cunha Taveira¹, Maria Rita Carvalho Garbi Novaes², Marcelo dos Anjos Reis³,

Monique Fernandez Silva³, Bárbara Helena Alvarenga Sala³ e Lídia Freire Abdala⁴.

- 1- Mestranda em Nutrição Humana – Universidade de Brasília- DF, Brasil.
- 2- Professora do Curso de Medicina (ESCS/FEPECS/GDF) / Orientadora de Mestrado em Nutrição Humana, Universidade de Brasília – DF, Brasil.
- 3- Graduandos do Curso de Medicina da Escola Superior em Ciências da Saúde (ESCS/FEPECS/GDF) e estudantes do PIBIC/CNPq.
- 4- Pesquisadora do Laboratório Sabin Análises Clínicas – Brasília – DF, Brasil.

RESUMO

Introdução/ Objetivos: A anemia é comumente observada em pacientes com câncer devido principalmente à liberação de mediadores inflamatórios os quais apresentam efeitos hemolíticos e reduzem a absorção de ferro e ao mesmo tempo podem estimular o aumento do número de leucócitos. Anormalidades nos parâmetros bioquímicos são também encontradas devido às alterações no metabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos. Devido às propriedades nutricionais e terapêuticas de alguns fungos estes têm sido utilizados como adjuvantes no tratamento do câncer. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da espécie *Agaricus sylvaticus* sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos de animais inoculados com tumor sólido de Walker 256. **Métodos:** 80 ratos Wistar machos foram separados em 4 grupos sendo n = 20 em cada. O grupo I não foi inoculado com tumor de Walker 256 e tratado com solução placebo. O grupo II não foi inoculado com tumor sólido de Walker e tratado com solução *A. sylvaticus*. O grupo III foi inoculado com tumor de Walker e tratado com solução placebo e o grupo IV foi inoculado com tumor de Walker e tratado com solução *A. sylvaticus*. As soluções foram administradas por gavagem a todos os grupos a cada 12 horas por 12 dias. No 13º dia o sangue foi coletado por punção cardíaca para realização de hemograma e medida das taxas de creatinina, uréia, triglicerídeos, proteína C reativa e glicose em seguida foi realizada eutanásia. **Resultados:** Resultados estatisticamente significativos foram obtidos para hematócrito, hemoglobina, proteína C reativa, uréia e triglicerídeos quando comparados os animais dos grupos III e IV. Os animais do grupo II não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros bioquímicos e hematológicos quando comparados aos animais do grupo I. **Conclusão:** A melhora dos parâmetros diagnósticos utilizados no presente ensaio indica que o *Agaricus sylvaticus* utilizado como adjuvante no tratamento do câncer pode melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Palavras-chave: *Agaricus sylvaticus*, anemia, parâmetros bioquímicos, câncer.

ABSTRACT

Background: Anemia is commonly observed in cancer patients mainly due to the release of some inflammatory mediators which have hemolytic effects and reduce iron absorption and at the same time can stimulate the release of white blood cells. Abnormalities in biochemical parameters are also found due to alterations in carbohydrate, protein and lipid metabolism. Some edible mushrooms are used in the adjuvant treatment of cancer due to their nutritional and therapeutical properties. **Objective:** The aim of the present study was to evaluate the effects of the specie *Agaricus sylvaticus* on hematological and biochemical parameters of animals inoculated with Walker 256 tumor. **Methods:** 80 male Wistar rats were separated in 4 groups with n = 20 in each group. Group I was not inoculated with Walker 256 tumor and treated with placebo solution. Group II was not inoculated with Walker 256 tumor and treated with *A. sylvaticus* solution. Group III was inoculated with tumor and was treated with placebo solution and Group IV was inoculated with Walker tumor and treated with *A. sylvaticus* solution. In the 13^o day blood was collected following heart section and then animals were sacrificed under anesthesia with halothane. **Results:** Statistically significant results were obtained for hematocrit, hemoglobin, CRP, urea and triglicerides levels comparing Groups III and IV. No significant differences were obtained for hematimetric indices, leucocytes count, creatinine and glucose levels comparing Groups III and IV. No significant differences in hematological and biochemical parameters were obtained between groups I and II. **Conclusion:** The improvement of diagnostic parameters used in the present assay indicates that *Agaricus sylvaticus* used as an adjuvant in cancer treatment can improve the quality of life of cancer patients.

Key words: *Agaricus sylvaticus*, biochemical parameters, anemia, cancer.

INTRODUÇÃO

A anemia é uma complicação comumente observada em pacientes com câncer e está relacionada à deficiências nutricionais, liberação de mediadores inflamatórios associados à tumorigênese, redução da absorção de ferro, invasão da medula óssea por tumores e efeitos da radioterapia e quimioterapia [1, 2, 3]

Além da anemia são também observadas linfocitopenia, trombocitopenia e aumento do número de leucócitos totais devido à presença de mediadores inflamatórios [2, 4, 5]. Níveis anormais de uréia, creatinina, triglicerídeos e glicose devido ao status nutricional do indivíduo foram amplamente estudados em pacientes com câncer [6, 7, 8].

O nível de proteína C reativa (PCR) também é alterado e pode ser um indicador do prognóstico do paciente [9, 10]. A PCR é uma proteína de fase aguda produzida no fígado em resposta à presença da interleucina-6 (IL-6) sendo um marcador sorológico da inflamação que pode ser utilizado para investigar a associação entre inflamação e o risco de câncer [11, 12, 13].

Estratégias terapêuticas alternativas e adjuvantes que possam melhorar a qualidade de vida do paciente vêm sendo testadas nos últimos anos. Cogumelos comestíveis têm sido utilizados como importantes fontes terapêuticas e de nutrientes principalmente em países orientais como Japão e China onde se tornaram ingredientes da medicina tradicional [14, 15].

Alguns cogumelos medicinais em especial os pertencentes à ordem Agaricales são usados em combinação com o tratamento convencional do câncer [16, 17]. Os polissacarídeos extraídos de *Ganoderma lucidum* são eficazes inibidores do crescimento tumoral sendo utilizados clinicamente no oriente. O extrato desta espécie antagoniza os

efeitos inibitórios que as drogas Mitomicina e Etoposida possuem sobre culturas de linfócitos [18].

As principais substâncias responsáveis pelos efeitos farmacológicos dos cogumelos são as β -D-glucans que consistem em polímeros de glicose e possuem propriedades imunomoduladoras [19]. A arginina é também um importante imunomodulador e está presente em espécies do gênero *Agaricus* [20]. Algumas lectinas apresentam atividades imunomoduladoras, antiproliferativas e antitumorais [21].

O *Agaricus sylvaticus* é uma espécie brasileira, nativa da região de Tapiraí no Estado de São Paulo que apresenta em sua composição química, vários nutrientes essenciais e substâncias farmacologicamente ativas que podem ter ação como adjuvantes na terapia do câncer.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficácia do tratamento com a espécie *Agaricus sylvaticus* sobre a anemia e alterações em parâmetros bioquímicos de animais inoculados com tumor sólido de Walker 256.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento do Estudo

O estudo foi conduzido no laboratório de Cirurgia experimental, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal, da Universidade de Brasília, datado de 12/04/2004. O estudo foi cego, placebo-controlado, de forma a minimizar as variáveis influenciadoras que poderiam comprometer a qualidade e veracidade dos resultados. A pesquisa contou com a colaboração de estudantes do PIBIC/CNPq, do Curso de Medicina da Escola Superior em Ciências da Saúde (ESCS/FEPECS). Os animais foram provenientes do Biotério da Empresa Bioagri – Brasília-DF.

Forma de preparo da solução contendo extrato de *Agaricus sylvaticus* e solução placebo

O extrato aquoso foi preparado a partir de uma infusão do cogumelo desidratado em água filtrada inicialmente a 100° C por 30 minutos, liquidificado, peneirado e seco em dissecador. A solução final contendo extrato de *A. sylvaticus* apresenta a seguinte formulação: Extrato de *A. sylvaticus*, sorbato de potássio, extrato de cravo da índia, extrato de canela, açúcar e xarope de glicose. A solução placebo apresenta em sua formulação: Sorbato de potássio, extrato de cravo da índia, extrato de canela, açúcar refinado e xarope de glicose. Ambas as soluções foram obtidas de produtor credenciado pela Empresa Brasileira de Agropecuária (Embrapa), da região de Tapiraí, interior do Estado de São Paulo.

Composição Química da Solução Contendo *Agaricus sylvaticus*

A composição final da solução do extrato de *A. sylvaticus* foi analisada pelo Japan Food Research Laboratories Center e revelou a presença de carboidratos (18.51g/100g) lipídeos (0.04g/100g), ergosterol (624 mg/100g), proteínas (4.99g/100g), aminoácidos (arginina:1.14%; lisina:1.23%; histidina:0.51%; fenilalanina:0.92%; tirosina:0.67%; leucina:1.43%; metionina:0.32%; valina:1.03%; alanina:1.28%; glicina:0.94%; prolina:0.95%; ácido glutâmico:3.93%; serina:0.96%; treonina:0.96%; ácido aspártico:1.81%; triptofano: 0.32%; cisteína:0.25%) e micronutrientes em quantidades traço.

Preparação dos Animais

Foram utilizados 80 ratos machos, adultos jovens, isogênicos, com pequeno desvio padrão de peso. Todos foram distribuídos em gaiolas contendo cinco ratos e mantidos para ambientação durante os cinco dias que antecederam o início do tratamento, sob idênticas condições, com ciclos de luz de 12h/dia, água e ração *ad libitum*.

Dieta dos Animais e Posologia do *Agaricus sylvaticus* (Agaricaceae)

A ração utilizada no estudo foi Labina (Agribands Purina do Brasil, LTDA), que contém proteína (23,0%), minerais (8,0%), fibras (5,0%) e vitaminas (traços). A solução contendo *Agaricus sylvaticus* foi administrada na concentração de 50mg/kg/dia mediante procedimentos de gavagem orogástrica.

Procedência, Manutenção e Inoculação do Tumor Sólido de Walker 256

A linhagem A do tumor de Walker 256 (origem: The Crist Hospital Line, National Cancer Institute Bank, Cambridge, Mass., USA), foi obtida junto à Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e foi conservada em freezer -80°C. A técnica de inoculação utilizada nos animais foi dilobular e subcutânea, na região dorso-lombar, totalizando 2 inoculações por animal, com aproximadamente 4 milhões de células por inoculação (Novaes, 1999) [22].

Amostragem e Grupos de Estudo

Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

Grupo I – controle/placebo (n = 20). Os animais não foram inoculados com tumor sólido de Walker 256 e receberam solução placebo a cada 12 horas por gavagem por 12 dias. No 13º dia foi realizada a coleta de sangue e em seguida a eutanásia sob anestesia com halotano.

Grupo II – controle/*agaricus* (n = 20). Os animais não foram inoculados com tumor sólido de Walker 256 e receberam *A.sylvaticus* na dose de 50mg/kg de peso corporal a cada 12 horas por gavagem por 12 dias. No 13º dia foi realizada coleta de sangue seguida da eutanásia sob anestesia com halotano.

Grupo III – tumor/placebo (n = 20). Os animais foram inoculados com tumor sólido de Walker 256 e tratados com solução placebo a cada 12 horas por gavagem durante 12 dias. No 13º dia foi realizada coleta de sangue em seguida eutanásia sob anestesia com halotano.

Grupo IV – tumor/*agaricus* (n = 20). Os animais foram inoculados com tumor sólido de Walker 256 e tratados com *A. sylvaticus* por gavagem na dose de 50mg/kg de peso corporal

a cada 12 horas por 12 dias. No 13º dia foi realizada a coleta de sangue em seguida eutanásia sob anestesia com halotano.

Análise Bioquímica: Dosagem de Creatinina, Uréia, Glicose, Triglicerídeos e Proteína C Reativa

Foram colhidos 2,5 ml de sangue venoso por punção cardíaca para realização da análise bioquímica do sangue dos animais.

Para dosagem de triglicerídeos, uréia, creatinina e glicose foi utilizado o método colorimétrico enzimático e a dosagem de proteína C reativa foi realizada por turbidimetria.

Análise Hematológica

Foram colhidos 2,5 ml de sangue venoso com anticoagulante (EDTA a 10%) por punção cardíaca e então realizado o hemograma completo, dosagem de hemácias, hemoglobina, hematócrito e valores hematimétricos: volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM). Dosagem de leucócitos sanguíneos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos), utilizando-se o aparelho Cell-dyn 3500.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada no software Prisma versão 3.0. Os dados foram analisados utilizando-se procedimentos de análise de variância (ANOVA). A significância estatística aceita foi de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais não inoculados e tratados com placebo (grupo I) foram utilizados como valores de referência para comparar com os demais grupos. Os animais não inoculados tratados com *A. sylvaticus* (grupo II) não apresentaram alterações nos parâmetros hematológicos comparados aos animais do grupo I. Todos os animais inoculados com tumor de Walker desenvolveram tumores e apresentaram anemia normocítica e anormalidades nos parâmetros bioquímicos quando comparados aos animais controle (grupo I). Diferenças significativas entre os animais inoculados com tumor de Walker e tratados com *A. sylvaticus* (grupo IV) e animais inoculados com tumor e tratados com placebo (grupo III) foram obtidas para os valores de hemoglobina e hematócrito. Os animais inoculados com tumor de Walker (grupos III e IV) não apresentaram alterações nos índices hematimétricos comparados aos animais do grupo I. Diferenças significativas foram obtidas na contagem de leucócitos quando comparados os animais não inoculados com os animais inoculados com tumor de Walker. Entre o grupo III e o grupo IV não foram observadas diferenças significativas (Tabela 1). Os animais inoculados com tumor de Walker (grupos III e IV) apresentaram alterações nos parâmetros bioquímicos quando comparados aos animais controle (grupo I). Diferenças significativas entre o grupo IV e o grupo III foram obtidas para os níveis de triglicerídeos, uréia e proteína C reativa. Entre os grupos II e I não foram encontradas diferenças significativas quanto aos parâmetros bioquímicos (Tabela 2).

Tabela 1: Hemograma completo de animais controle tratados com placebo (Grupo I), animais controle tratados com *A. sylvaticus* (Grupo II), animais inoculados com tumor de Walker tratados com placebo (Grupo III) e animais inoculados com tumor de Walker tratados com *A. sylvaticus* (Grupo IV).

	Grupos Controle		Animais inoculados com tumor de Walker	
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Eritrócitos ^a	6,15 ± 1,53 x 10 ⁶	6,39 ± 1,39 x 10 ⁶	3,69 ± 1,39 x 10 ⁶	4,48 ± 1,01 x 10 ⁶
Hemoglobina (g/dL) ^b	13,41 ± 2,08	13,41 ± 1,25	7,56 ± 1,76	8,87 ± 2,21
Hematócrito (%) ^c	38,82 ± 4,03	39,39 ± 3,20	22,32 ± 5,20	25,49 ± 5,94
VGM (fl)	61,65 ± 12,79	63,34 ± 11,98	57,81 ± 4,36fl	60,48 ± 7,22
HGM (pg)	22,39 ± 4,57	22,91 ± 4,54	20,68 ± 1,62 pg	20,67 ± 2,21
CHGM (%)	35,22 ± 1,10%	35,31 ± 1,53%	34,11 ± 3,128	35,01 ± 1,08
Leucócito / mm ³	6,94 ± 4,50 x 10 ³	6,08 ± 2,64 x 10 ³	8,52 ± 5,64 x 10 ³	9,22 ± 4,21 x 10 ³
Linfócitos/ mm ³	4,25 ± 2,27 x10 ³	4,06 ± 1,94 x 10 ³	2,66 ± 2,11	3,00 ± 1,68 x 10 ³
Bastonetes / mm ³	0	0	0	0
Neutrófilos / mm ³	1,25 ± 0,93 x 10 ³	1,42 ± 1,30 x 10 ³	3,97 ± 2,78 x 10 ³	4,31 ± 2,76 x 10 ³
Eosinófilos / mm ³	0,19 ± 0,12 x 10 ³	0,19 ± 0,12 x 10 ³	0,19 ± 0,12 x 10 ³	0,23 ± 0,13 x 10 ³
Basófilos / mm ³	0,11 ± 0,09 x 10 ³	0,07 ± 0,1 x 10 ³	0,25 ± 0,1 x 10 ³	0,28 ± 0,15 x 10 ³
Monócitos / mm ³	0,024 ± 0,04 x 10 ³	0,065 ± 0,1 x 10 ³	1,65 ± 1,2 x 10 ³	1,07 ± 0,8 x 10 ³

Análise Univariada (ANOVA). Teste: Newman-Keulls. Os resultados representam a média ± desvio padrão. Índices hematimétricos: VGM = volume globular médio; HGM = hemoglobina globular média; CHGM = concentração de hemoglobina globular média. ^aHemácias: Grupo IV x Grupo II (p < 0,001), Grupo IV x Grupo I (p < 0,001), Grupo II x Grupo III (p < 0,001) e Grupo III x Grupo I (p < 0,001); ^bHematócrito: Grupo IV x Grupo III (p < 0,05), Grupo IV x Grupo II (p < 0,001), Grupo IV x Grupo I (p < 0,001), Grupo II x Grupo III (p < 0,001), Grupo III x Grupo I (p < 0,001); ^c Hemoglobina Grupo IV x Grupo III (p < 0,05); Grupo IV x Grupo II (p < 0,001), Grupo IV x Grupo I (p < 0,001), Grupo II x Grupo III (p < 0,001), Grupo III x Grupo I (p < 0,001).

Tabela 2: Parâmetros bioquímicos de animais controle tratados com placebo (Grupo I), animais controle tratados com *A. sylvaticus* (Grupo II), animais inoculados com tumor de Walker tratados com placebo (Grupo III) e animais inoculados tratados com *A. sylvaticus* (Grupo IV).

	Grupos Controle		Animais inoculados com tumor de Walker	
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
PCR mg/dL ^a	0,23 ± 0,23	0,21 ± 0,19	0,46 ± 0,20	0,23±0,20
Creatinina mg/dL ^b	0,56 ± 0,08	0,55 ± 0,07	0,725 ± 0,725	0,635 ± 0,123
Uréia mg/dL ^c	59,10 ± 7,99	55,65 ± 8,49	104,5 ± 65,81	74,05 ± 40,09
Triglicerídeos mg/dL ^d	159,80 ± 50,56	145,10 ± 46,09	325,15 ± 76,64	276,35 ± 79,52
Glicose mg/dL ^e	215,20 ± 59,90	197,15 ± 26,63	110,65 ± 58,54	126,05 ± 44,67

Análise Univariada (ANOVA). Teste: Newman-Keuls. Os resultados representam a média ± desvio padrão. PCR = proteína C reativa. ^aPCR: Grupo I x Grupo III (p < 0,05), Grupo II x Grupo III (p < 0,05), Grupo III x Grupo IV (p < 0,05); ^bCreatinina: Grupo III x I (p < 0,01), Grupo II x III (p < 0,01); ^cUréia: Grupo I x III (p < 0,001), Grupo II x III (p < 0,01), Grupo IV x III (p < 0,05); ^dTriglicerídeos: Grupo I x III (p < 0,001), Grupo I x IV (p < 0,001), Grupo II x III (p < 0,001), Grupo II x Grupo IV (p < 0,001), Grupo IV x Grupo III (p < 0,05); ^eGlicose: Grupo III x II (p < 0,001), Grupo III x I (p < 0,001), Grupo IV x II (p < 0,001), Grupo IV x I (p < 0,001).

DISCUSSÃO

A anemia está presente em muitos pacientes com câncer no momento do diagnóstico ou como resultado da quimioterapia, estando também associada às doenças crônicas como infecções e inflamações sendo uma complicação que reduz a qualidade de vida do indivíduo. Mudanças na absorção e distribuição do ferro são características deste tipo de anemia [23, 24, 25, 26].

Os animais inoculados com tumor de Walker apresentaram valores similares ao controle para VCM, HGM e CHGM, no entanto o número de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina apresentaram uma redução comparada ao controle indicando anemia normocítica, sendo este um achado comum em animais com tumores experimentais [4]. Sugere-se que o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias tais como interleucinas 1 e 6, TNF- α e INF- δ estão associadas à inibição direta da proliferação dos progenitores eritrocíticos e ao aumento da produção de hepcidina que é um peptídeo produzido no fígado capaz de reduzir a absorção de ferro no intestino [1, 3, 27].

O fluxo de células vermelhas é maior no tumor que em tecidos normais e estas células apresentam exacerbada captação de poliaminas de origem tumoral que podem se ligar às proteínas da membrana do eritrócito formando ligações fracas com lipídios e proteínas negativamente carregadas fazendo com que a célula apresente características reológicas anormais e sejam destruídas por macrófagos esplênicos [4].

Substâncias biologicamente ativas com atividade imunomoduladora, antiinflamatória e estimuladoras da hematopoiese estão presentes em cogumelos medicinais [26]. Vários metabólitos produzidos por espécies de fungos, especialmente carboidratos, são capazes de estimular a hematopoiese [28]. As β -D-glucanas são responsáveis pela

atividade hematopoética de *Sparassis crispa*, um cogumelo recentemente cultivado no Japão. A β -D-glucana (1 \rightarrow 3) presente nesta espécie chamada SCG aumenta a atividade hematopoética em resposta à leucopenia induzida por ciclofosfamida em camundongos, do ponto de vista qualitativo e quantitativo [29, 30].

Um aumento significativo dos valores de hemoglobina e hematócrito foram observados em animais do grupo IV (tumor/agaricus) quando comparados aos animais do grupo III (tumor/placebo) sugerindo que substâncias presentes no cogumelo *A. sylvaticus* apresentam efeitos benéficos sobre a anemia dos animais com tumor experimental.

O aumento do número de leucócitos encontrado em animais com tumor de Walker é um fenômeno conhecido [4, 31]. Esta condição é uma consequência da produção autônoma de fatores estimuladores de colônia pelo tumor [32]. Estas citocinas aumentam a produção de granulócitos e sua liberação da medula óssea [33]. Aparentemente a administração de *A. sylvaticus* não teve efeito sobre o número de leucócitos no período de tratamento de 12 dias, pois não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos III e IV.

Foi observada linfocitopenia nos animais com tumor sendo esta uma condição não claramente explicada [23, 34, 35]. O impedimento da ativação dos linfócitos é um fenômeno comum em pacientes com câncer [36]. O aumento da apoptose destas células está associada à inibição da ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B). Este fator tem sido extensamente descrito como ubíquo e está implicado na regulação transcricional de vários inibidores da apoptose [37, 38]. Não foram observadas diferenças entre os números de linfócitos de animais com tumor de Walker tratados com *A. sylvaticus* e animais com tumor tratados com placebo.

Os animais que não foram inoculados com tumor de Walker e tratados com *A. sylvaticus* (grupo II) apresentaram número de eritrócitos, valores de hemoglobina,

hematócrito e índices hematimétricos (VGM, HGM e CHGM) normais quando comparados aos animais controle tratados com placebo. Foram encontrados valores similares aos valores de referência para a contagem de células brancas nos animais do grupo II quando comparados aos animais do grupo I sugerindo que o tratamento com *A. sylvaticus* não foi capaz de causar alterações ao sistema hematopoético como mostrado por Novaes *et al* (2005) em um estudo de toxicidade aguda [39].

Um grande número de fatores parece mediar o aumento da produção de proteína C reativa (PCR). Na presença de uma injúria as citocinas pró-inflamatórias estimulam a produção de PCR. Em paciente com câncer a PCR é estimulada para interleucina-6 (IL-6) e outros fatores [40, 11]. Elevados níveis de PCR estão associados a um mau prognóstico [13].

Os animais inoculados com tumor tratados com *A. sylvaticus* apresentaram menores níveis de PCR comparados com animais com tumor tratados com placebo. Este resultado indica que o *A. sylvaticus* pode reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias e fazer com que os animais apresentem um melhor prognóstico que os animais tratados com placebo.

A síndrome caquexia/ anorexia relacionada ao câncer é um achado comum e tem papel importante no prognóstico do paciente. Além da redução da ingestão, inúmeras alterações no metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídeos têm sido observados em pacientes com câncer. O catabolismo de proteínas e a oxidação dos aminoácidos liberados neste processo geram amônia que é predominantemente incorporada à uréia pelo fígado. O catabolismo de proteínas aumenta com a progressão do tumor, ocorre então um aumento da taxa de produção de uréia. Durante severos períodos de stress metabólico o catabolismo de proteínas e a produção de uréia aumentam significativamente [6, 7, 41].

Os animais inoculados com tumor de Walker apresentaram altos níveis de uréia comparados aos animais controle, porém os animais que receberam *A. sylvaticus* (grupo IV) apresentaram uma redução significativa da taxa de uréia comparados aos animais tratados com placebo (grupo III). O cogumelo *A. sylvaticus* é rico em proteínas e aminoácidos e a administração destes nutrientes como suplementos nutricionais reduzem a formação de uréia [42].

A ingestão diária de proteína impede a perda de massa muscular e das reservas nitrogenadas. Por esta razão a medida da taxa de creatinina tem se mostrado um marcador útil do status nutricional [43, 44]. Alterações nos níveis de creatinina foram observadas em animais com tumor de Walker comparados aos animais controle. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos III e IV.

As células tumorais apresentam um alto consumo de glicose e altas taxas de glicólise aeróbica [45]. Em modelos de tumores experimentais em animais a hipoglicemia é uma característica comum. Estudos *in vivo* com tumores de origem humana mostram um significativo consumo de glicose e produção de lactato [46].

Os animais com tumor de Walker apresentaram baixa glicemia comparados aos animais controle. O grupo inoculado tratado com *A. sylvaticus* (grupo IV) não apresentou diferença significativa comparado ao grupo inoculado tratado com placebo (grupo III).

Animais portadores de tumores experimentais apresentam decréscimo da atividade da enzima lipoproteína-lipase (LPL) que é a principal responsável pelo clearance de triglicerídeos. O mecanismo possível para explicar a redução da atividade da LPL seria a hipoglicemia induzida pelo tumor. A glicose estimula a tradução da LPL e os processos pós-traducionais em culturas de adipócitos de ratos [46].

Níveis anormais de triglicérides foram observados em animais com tumor de Walker, porém o grupo tratado com *A. sylvaticus* apresentou redução significativa comparado ao grupo tratado com placebo. Este achado indica os efeitos benéficos da terapia com *A. sylvaticus* porém o mecanismo exato deve ser elucidado.

Os animais não inoculados com tumor de Walker tratados com *A. sylvaticus* não apresentaram alterações bioquímicas comparados aos animais controle tratados com placebo cujos parâmetros bioquímicos foram utilizados como valores de referência.

A alimentação é o principal determinante da qualidade de vida do paciente com câncer. Algumas terapias baseiam-se na ingestão de determinados nutrientes [47]. O objetivo da terapia de suporte nutricional está relacionado à prevenção do declínio nutricional o que pode levar à caquexia [48]. Dessa forma os nutrientes presentes no *A. sylvaticus* podem contribuir para a redução do estado catabólico comum em pacientes com câncer, contribuindo também para a redução das anormalidades metabólicas e consequentemente podem ser observadas melhoras nos parâmetros bioquímicos.

CONCLUSÃO

No presente estudo, a melhora do quadro anêmico e dos parâmetros bioquímicos dos animais indica que a espécie *Agaricus sylvaticus* pode ser benéfica do tratamento adjuvante do câncer e a ausência de alterações hematológicas e bioquímicas durante o período de 12 dias em animais não inoculados com tumor e tratados com este mesmo fungo indica sua boa tolerabilidade. Os resultados sugerem que o *A. sylvaticus* possa ser aplicado à prática clínica, sendo utilizado como adjuvante no tratamento do câncer com o objetivo de melhorar a qualidade de vida do paciente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Varlotto J and Stevenson MA: Anemia, tumor hypoxemia and the cancer patient. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys* 2005; 63(1): 25 – 36.
2. Jin M, Jeon H, Jung HJ, Kim B, Shin SS, Choi JJ, Lee JK, Kang CY and Kim S: Enhancement of repopulation and hematopoiesis of bone marrow cells irradiated mice by oral administration of PG 101, a water soluble extract from *Lentinus lepideus*. *Experimental biology and medicine* 2003; 228: 759-766.
3. Flanagan JM, Truksa J, Peng H, Lee P, Beutler. In vivo imaging of hepcidin promoter stimulation by iron and inflammation. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 2007; 38: 253-257
4. Hamamoto T, Suzuki K, Sasaki H, Ichikawa M, Kodama S and Watanabe M.2005. Differences in effects of oncogenes on sensitivity to anticancer drugs: *J. Radiat. Res.*2005; 46: 197 – 203.
5. Quemener V, Bansard JY, Delamaire M, Roth S, Havouis R, Desury D and Moulinoux JP: Red blood cell polyamines, anemia and tumor growth in the rat. *European Journal of Cancer* 1996; 32A (2): 316-322.
6. Klein S, Lu K, Sakurai Y, Miller R, Larger M and Zhang XJ: Metabolic response to radiation therapy in patients with cancer. *Metabolism* 1996; 45(6): 767-773.
7. Lattermann R, Geisser W, Georgieff M, Wachter U, Goertz A, Gnann R and Schrincker T: Integrated analysis of glucose, lipid and urea metabolism in patients with bladder cancer: Impact of tumor stage. *Nutrition* 2003; 19: 589-592.
8. Wyss M and Kaddurah-Daouk R: Creatine and Creatinine Metabolism. *Physiological Reviews* 2000; 80(3): 1107 – 1213.
9. Kodama J, Myiagi Y, Seki N, Tokumo K, Youshinouchi M, Kobashi Y, Okuda H and Kudo T: Serum C-reactive protein as a prognostic factor in patients with epithelial ovarian cancer. *European Journal of Obstetrics & Gynecology* 1999; 82: 107-110.
10. Helzlsouer KJ, Erlinger TP and Platz EA: C-reactive protein levels and subsequent cancer outcomes: Results from as prospective cohort study. *European Journal of Cancer* 2006; 42: 704 – 707.

11. Deegan O, Walshe K, Kavanagh K and Doyle S: Quantitative detection of C-reactive protein using phosphocoline - labeled enzyme or microspheres. *Analytical Biochemistry* 2003; 312: 175 – 181.
12. Lehrer S, Diamond EJ, Mamkine B, Drolle MJ, Stone NN and Stock RG: C-reactive protein is significantly associated with prostate specific antigen and metastatic disease in prostate cancer. *Bju International* 2005; 95: 961 – 962.
13. Nikiteas NI, Tzanakis N, Gazouli M, Rallis J, Daniilidis K, Theodoropoulos G, Kostakis A and Peros G: Serum IL-6, TNF- α and CRP levels in Greek colorectal cancer patients: Prognostic implications. *World J. Gastroenterol.* 2005; 11(11): 1639-1643.
14. Barbisan LF, Spinardi-Barbisan ALT, Moreira ELT, Salvadori DMF, Ribeiro LG, Elra AF and Camargo JLV: *Agaricus blazei* (Himematsutake) does not alter the development of rat diethylnitrosamine-initiated hepatic preneoplastic foci. *Cancer sci* 2003; 94(2): 188-192.
15. Sullivan R, Smith JE and Rowan NJ: Medicinal mushrooms and cancer therapy: translating a traditional practice to Western medicine. *Perspectives in Biology and Medicine* 2006; 49(2): 159(12).
16. Veronesi, R: Os cogumelos medicinais e seus comprovados efeitos em inúmeras doenças humanas. *Revista Brasileira de Medicina* 2001; 11:836-837.
17. Novaes MRCG, Novaes LCG: Fármaco-nutrientes em cogumelos comestíveis Agaricales e outros basidiomicetos. *Rev. Bras. Nutr. Clin.* 2005; 20(3): 181-187.
18. Cao LZ and Lin ZB: Regulatory effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on cytotoxic T-lymphocytes induced by dendritic cells in vitro. *Acta Pharmacol.Sin.* 2003; 24(4): 312-326.
19. Brown GD and Gordon S: Fungal β -glucans and mammalian immunity. *Immunity* 2003; 19: 311-315.
20. Novaes M.R.C.G., Pantaleão C: Pharmacological effects of nutritional supplementation of arginine in gastrointestinal cancer patients. *Brazilian Journal of Clinical Nutrition* 2004; 19(1): 26-31.
21. Wang H, Ng TB: Isolation of a novel N-acetylglucosamine-specific lectin from fresh sclerotinia of the edible mushroom *Pleurotus tuber-regium*. Protein expression and purification 2003; 29: 156-160.

22. Novaes MRCG. Efeitos da suplementação nutricional com L-arginina no tumor de Walker 256. 1999. Tese de Doutorado – Universidade de Brasília
23. Ouden M, Ubachs JMH, Stoot JEGM and Wersch JWJ: Whole blood cell counts and leucocyte differentials in patients with benign or malignant ovarian tumors. *European journal of Obstetrics & Gynecology* 1997; 72: 73-77.
24. Vido AA, Cavalcanti TC, Guimarães F, Vieira-Matos AN and Retori O: Hemolytic component of cancer anemia: effects of osmotic and metabolic stress on the erythrocytes of rats bearing multifocal inoculations of Walker 256 tumor. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2000; 33: 815-822.
25. Rubin H: Systemic effects of cancer: Role of multiple proteases and their toxic peptide products. *Med. Sci. Monit.* 2005; 11 (7): 221 – 228.
26. Wasser SP: Review of medicinal mushrooms advances: Good news from old allies. *Herbal Gram* 2002; 56: 28 – 33.
27. Inamura J, Ikuta K, Jimbo J, Shindo M, Sato K, Torimoto Y, Kohgo Y. Upregulation of hepcidin by interleukin-1 β in human hepatoma cell lines. *Hepatology Research* 2005; 33: 198 – 205.
28. Lull C, Wichers HJ and Savelkoul FJ: Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators of inflammation*; 2005 (2): 63 – 80.
29. Harada T, Masuda S, Arii M, Adashi Y, Nakajima M, Yadomae T and Ohno N: Soy isoflavone aglycone modulates a hematopoietic response in combination with soluble β -glucan. *SCG. Biol. Pharm. Bull.* 2005; 28(12): 2342-2345.
30. Lindequist U, Niedermeyer THJ, and Jülich WD: Pharmacological potential of mushrooms. *eCAM* 2005; 2(3): 285-299.
31. Salven P, Orpana A and Joensuu H: Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor. *Clinical Cancer Research* 1999; 5: 487-491.
32. Georgilis K and Athanassiades P: Leukocytosis associated with and localized bladder cancer: resolution with radiation therapy. *The Journal of Urology* 1999; 161 may: 1567.
33. Guetz G, Mariani P, Freneaux P and Pouilart P: Leucocytosis associated with liposarcoma recurrence: original presentation of liposarcoma recurrence. *J. Clin.Oncol* 2004; 22: 2242-2243.

34. Czarnecki D, Meehan CJ, McColl I and Kulinskaya E. 1996: Lymphocyte counts of patients who have had skin cancer. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1996; 34 (5), part I: 772-775.
35. Carbonari M, Cibati M, Cherchi M, Sabarigia D, Pesce AM, Dell'Anna L, Modica A and Fiorilli M: Detection and characterization of apoptotic peripheral blood lymphocytes in Human Immunodeficiency Virus detection and cancer chemotherapy by a novel flow immunocytometric method. *Blood* 1994; 83(5) 1268-1277.
36. Shevde LA, Joshi NN, Shinde SR and Nadikarni J: Studies of functional status of circulating lymphocytes in unaffected members from cancer families. *Human Immunology* 1998; 59: 373-381.
37. Batra RK, Lin Y, Sharma S, Dohadwala M, Luo J, Pold M and Dubinett: Non-small cell lung cancer derived soluble mediators enhance apoptosis in activated T-lymphocytes through an I κ B Kinase-dependent mechanism. *Cancer research* 2003; 63: 642-646.
38. Kuss I, Hathaway B, Ferris RL, Gooding W and Whiteside TL: Decreased absolute counts of T-lymphocytes subsets and their relation to disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical cancer research* 2004; 10: 3755-3762.
39. Novaes MRCG, Novaes, LCG, Recova V. e Melo, A: Evaluation of acute toxicity of edible mushroom *Agaricus Sylvaticus*. *Clinical nutrition (Edinburgh, Lothian)* 2005: 672-672.
40. McArdle PA, McMillan DC, Wallace AM and Underwood MA: The relationship between interleukin-6 and C-reactive protein in patients with benign and malignant prostate disease. *British Journal of Cancer* 2004; 91: 1755 – 1757.
41. Lai HS, Lee JC, Lee PH, Whang ST and Chen WJ. Plasma free amino acid profile in cancer patients: *Seminars in Cancer Biology* 2005; 15: 267 – 276.
42. Soeters PB, Poll MCG, Gemert WG and Dejong CHC: Amino acid adequacy and pathophysiological states. *J. Nutr.* 2004; 134: 1575S – 1582S.
43. Desmeules S, Lévesque R, Jaussent I, Leray-Moragues H, Chalabi L and Canaud B: Creatinine index and lean body mass are excellent predictors of long-term survival in haemodiafiltration patients. *Nephrol. Dial. Transplant* 2004; 19 (5): 1182-1189.

44. Sarhill N, Mahmoud FA, Christie R and Tahir A: Assessment of nutritional status and fluid deficits in advanced cancer. *American Journal of Hospice & Paliative Care* 2003; 20 (6), november/ December: 465-473.
45. Fearon KCH, Borland W, Preston T, Tisdale MJ, Shenkin A and Calman KC: Cancer caquexia: Influence of systemic ketosis on substrate levels and nitrogen metabolism. *Am J of Clin Nutr* 1988; 47: 42-48.
46. Younes RN and Noguchi Y: Pathophysiology of cancer caquexia. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo* 2000; 55(5): 181-193.
47. Maritess C, Small S and Waltz-Hill M: Alternative nutrition therapies in cancer patients. *Seminars in Oncology Nursing* 2005; 21 (3): 173 – 176.
48. Schueren MAEB: Nutritional support strategies for malnourished cancer patients. *European Journal of Oncology Nursing* 2005; 9: S78 – S89.

4.2 ARTIGO 2: Formatado de acordo com as normas de publicação da revista Cancer Science, da Associação Japonesa de Câncer, indexada nas bases de dados: Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases, AgBiotech News and Information, BIOBASE, Biological Abstracts, BIOSIS Previews, Chemical Abstracts, CSA Oncogenes and Growth Factors Abstracts, Current Awareness in Biological Sciences, Current Contents, EMBASE / Excerpta Medica. Abstract Journals, INIS Atomindex (Online Edition), Inpharma Weekly, Maize Abstracts Online, MEDLINE, Nutrition Abstracts and Reviews Nutrition Research Newsletter, Pharmacoeconomics and outcomes News, Pig News & Information, Reactions Weekly, Reference Update, Review of Aromatic and Medicinal Plants, Review of Medical and Veterinary Mycology, Rural Development Abstracts, Science Citation Index, SCOPUS, Soybean Abstracts (Online Edition), Tropical Diseases Bulletin, Veterinary Bulletin e Weed Abstracts.

EFEITOS FARMACOLÓGICOS DO COGUMELO COMESTÍVEL *AGARICUS SYLVATICUS* SOBRE O TUMOR SÓLIDO DE WALKER 256

PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF THE EDIBLE MUSHROOM *AGARICUS SYLVATICUS* ON THE WALKER 256 SOLID TUMOR.

Vanessa Cunha Taveira¹, Maria Rita Carvalho Garbi Novaes², Marcelo dos Anjos Reis³

Monique Fernandez Silva³ e Édelyn Cristina Nunes Silva⁴.

1- Mestranda em Nutrição Humana – Universidade de Brasília- DF, Brasil.

2- Professora de Medicina (ESCS/FEPECS) / Professora de Pós-Graduação em Nutrição Humana, Universidade de Brasília – DF, Brasil.

3- Graduandos em Medicina (ESCS/FEPECS/GDF).

4- Pesquisadora – Laboratório de Cirurgia Experimental- Universidade de Brasília – DF, Brasil

RESUMO:

INTRODUÇÃO/ OBJETIVOS: Algumas espécies de cogumelos podem atuar como adjuvantes no tratamento do câncer devido às suas propriedades nutricionais e farmacológicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos farmacológicos do cogumelo *Agaricus sylvaticus* sobre os aspectos clínicos, crescimento tumoral, ocorrência de metástases e sobrevida de animais inoculados com tumor sólido de Walker 256.

MATERIAIS E MÉTODOS: Foram utilizados 120 ratos machos adultos separados em 6 grupos sendo 2 grupos controle: Grupo I – tratado com placebo por gavagem a cada 12 horas por 12 dias e Grupo II- tratado com *A. sylvaticus* por gavagem a cada 12 horas por 12 dias. Quatro grupos foram inoculados com tumor de Walker e divididos em: Grupo III – tratado com placebo por gavagem a cada 12 horas por 12 dias; grupo IIIS – tratado com placebo por gavagem a cada 12 horas até o dia do óbito para avaliação do tempo de sobrevida; grupo IV tratado com *A. sylvaticus* a cada 12 horas por 12 dias e grupo IVS – tratado com *A. sylvaticus* a cada 12 horas até a data do óbito. **RESULTADOS:** Os animais inoculados com tumor tratados com *A. sylvaticus* apresentaram menor volume tumoral, menor ocorrência de metástases e melhora do quadro clínico comparados ao grupo placebo ($p < 0,01$). Não houve diferenças significativas no tempo de sobrevida de animais tratados com *A. sylvaticus* e placebo. Os animais não inoculados não apresentaram alterações clínicas.

CONCLUSÃO: A espécie *A. sylvaticus* atua de forma benéfica como adjuvante no tratamento do câncer.

PALAVRAS CHAVE: *Agaricus sylvaticus*, câncer, metástases, aspectos clínicos

ABSTRACT:

INTRODUCTION / AIMS: Some species of mushrooms can act in the adjuvant treatment of cancer due to their pharmacological and nutritional properties. The aim of the present study was to evaluate the properties of the mushroom *Agaricus sylvaticus* on the clinical aspects, tumoral growth, the occurrence of metastasis and the surviving time of animals inoculated with Walker 256 solid tumor.

MATERIAL AND METHODS: It was used 120 male, adult rats divided in 6 groups. Two control groups: Group I – was treated with placebo solution by gavage each 12 hours for 12 days and Group II- was treated with *A. sylvaticus* by gavage each 12 hours for 12 days. Four groups were inoculated with Walker tumor and divided in: Group III – treated with placebo by gavage every 12 hours for 12 days for clinical evaluation, tumoral growth and occurrence of metastasis; group IIIS – treated with placebo every 12 hours until death for evaluation of surviving time; group IV – treated with *A. sylvaticus* every 12 hours for 12 days; group IVS – treated with *A. sylvaticus* every 12 hours until death to evaluate surviving time.

RESULTS: The cancer animals treated with *A. sylvaticus* presented smaller tumoral volume, less incidence of metastasis and better clinical aspects ($p < 0,01$). No statistic differences were obtained for time of surviving comparing the animals treated with *A. sylvaticus* and placebo. The animals of control groups presented no clinical alterations.

CONCLUSION: The specie *A. sylvaticus* can be a beneficial adjuvant in the treatment of cancer.

KEY WORDS: *Agaricus sylvaticus*, cancer, metastasis, clinical aspects

INTRODUÇÃO:

O câncer é uma doença altamente prevalente associada a altas taxas de mortalidade mesmo com o crescente avanço da terapêutica ¹. Mais de 10 mil novos casos de câncer são diagnosticados em todo o mundo ². Um grande número de efeitos sistêmicos é encontrado freqüentemente em pacientes que se encontram em estágios avançados da doença. Estes efeitos incluem a caquexia, a supressão da imunidade celular mediada, dor severa relacionada ao câncer dentre outros sinais e sintomas que estão associados à redução da sobrevida do paciente ^{3,4,5}.

Algumas terapias adjuvantes vêm sendo testadas nos últimos anos com o objetivo de melhorar a qualidade de vida do paciente com câncer. A experiência de países orientais mostra que cogumelos comestíveis podem ter um papel importante na prevenção e tratamento de tumores malignos. Os efeitos antitumorais de diversos extratos e compostos isolados foram demonstrados em células tumorais e em ensaios *in vivo*. Na China e no Japão os cogumelos tornaram-se importantes ingredientes da medicina tradicional ^{6,7}.

No Japão aproximadamente 500.000 pessoas utilizam os cogumelos na prevenção do câncer e/ou como adjuvante da quimioterapia ⁸. O efeito antitumoral da espécie *Agaricus blazei* parece ser devido à restauração e incremento da imunidade celular ⁹.

Os cogumelos apresentam em sua composição uma quantidade bem balanceada de aminoácidos. Fibras também são encontradas em quantidades apreciáveis em todos os tecidos dos cogumelos, estas são capazes de absorver compostos tóxicos que se presentes no intestino podem aumentar o risco da carcinogênese ¹⁰.

Agaricus sylvaticus é um cogumelo pertencente à classe dos Himenomicetos e tem sido utilizado em ensaios clínicos, em estudos com pacientes portadores do vírus HIV e pacientes com câncer. Esta espécie atualmente tem atraído a atenção de pesquisadores devido à sua composição nutricional e à presença de substâncias farmacologicamente ativas.

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do *A. sylvaticus* sobre o crescimento tumoral, a ocorrência de metástases, os aspectos clínicos e o tempo de sobrevivência de animais tratados inoculados com tumor sólido de Walker 256.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparação dos Animais

Foram utilizados 120 ratos machos, adultos jovens, isogênicos, com pequeno desvio padrão de peso. Todos foram distribuídos em gaiolas contendo cinco ratos e mantidos para ambientação durante os cinco dias que antecedem o início do tratamento, sob idênticas condições, com ciclos de luz de 12h/dia, água e ração *ad libitum*.

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília datado de 12 de abril de 2004.

Dieta dos Animais e Posologia do *Agaricus sylvaticus* (Agaricaceae)

A ração utilizada no estudo foi Labina (Agribands Purina do Brasil, LTDA), que contém proteína (23,0%), minerais (8,0%), fibras (5,0%) e vitaminas (traços). A solução contendo *Agaricus sylvaticus* foi administrada na concentração de 50mg/kg/dia mediante procedimentos de gavagem orogástrica.

Forma de preparo da solução contendo extrato de *Agaricus sylvaticus* e solução placebo

O extrato aquoso foi preparado a partir de uma infusão do cogumelo desidratado em água filtrada inicialmente a 100° C por 30 minutos, liquidificado, peneirado e seco em dissegador. A solução final contendo extrato de *A. sylvaticus* apresenta a seguinte formulação: Extrato de *A. sylvaticus*, sorbato de potássio, extrato de cravo da índia, extrato de canela, açúcar e xarope de glicose. A solução placebo apresenta em sua formulação: Sorbato de potássio, extrato de cravo da índia, extrato de canela, açúcar refinado e xarope de glicose.

Ambas as soluções foram obtidas de produtor credenciado pela Empresa Brasileira de Agropecuária (Empraba), da região de Tapiraí, interior do Estado de São Paulo.

Composição Química da Solução Contendo *Agaricus sylvaticus*

A composição final da solução do extrato de *A. sylvaticus* foi analisada pelo Japan Food Research Laboratories Center e revelou a presença de carboidratos (18.51g/100g) lipídeos (0.04g/100g), ergosterol (624 mg/100g), proteínas (4.99g/100g), aminoácidos (arginina:1.14%; lisina:1.23%; histidina:0.51%; fenilalanina:0.92%; tirosina:0.67%; leucina:1.43%; metionina:0.32%; valina:1.03%; alanina:1.28%; glicina:0.94%; prolina:0.95%; ácido glutâmico:3.93%; serina:0.96%; treonina:0.96%; ácido aspártico:1.81%; triptofano: 0.32%; cisteína:0.25%) e micronutrientes em quantidades traço.

Procedência, Manutenção e Inoculação do Tumor Sólido de Walker 256

A linhagem A do tumor de Walker 256 (origem :The Crist Hospital Line, National Cancer Institute Bank, Cambridge, Mass., USA), foi obtida junto à Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e foi conservada em freezer -80°C. A técnica de inoculação utilizada nos animais foi dilobular e subcutânea, na região dorso-lombar, totalizando 2 inoculações por animal, com aproximadamente 4 milhões de células por inoculação.

Amostragem e Grupos de Estudo

O número total de animais do experimento foi de 120 ratos machos que foram separados nos seguintes grupos:

Grupo I (n = 20): Controle/ placebo. Os animais não foram inoculados com tumor sólido Walker 256 e receberam solução placebo por gavagem a cada 12 horas por 12 dias e no 13º dia foi realizada eutanásia sob anestesia com halotano e a necropsia foi realizada imediatamente após o óbito do animal.

Grupo II (n = 20): Controle/agaricus. Os animais não foram inoculados com tumor sólido de Walker 256 e receberam suplementação com *A. sylvaticus* na dose de 50mg/kg de peso corporal por gavagem a cada 12 horas por 12 dias. No 13º dia foi realizada a eutanásia sob anestesia com halotano e logo após o óbito do animal foi realizada necropsia.

Grupo III (n = 20): Tumor/placebo. Os animais foram inoculados com tumor sólido de Walker 256. A administração da solução placebo foi iniciada 12 horas após a inoculação das células tumorais e mantida de 12 em 12 horas por 12 dias. No 13º dia foi realizada eutanásia dos animais e imediatamente após o óbito foi realizada necropsia.

Grupo IIIS (n = 20): Tumor/placebo-sobrevida. Os animais foram inoculados com tumor sólido de Walker 256. A administração da solução placebo foi iniciada 12 horas após a inoculação das células tumorais e mantida de 12 em 12 horas até a data do óbito do animal para avaliação do tempo de sobrevida.

Grupo IV (n = 20): Tumor/agaricus. Os animais foram inoculados com tumor sólido de Walker 256. Foi administrada solução contendo o extrato de *A. sylvaticus* na dose de 50mg/kg de peso corporal por gavagem, sendo iniciada 12 horas após a inoculação das

células tumorais e mantida de 12 em 12 horas por 12 dias. No 13º dia foi realizada eutanásia dos animais sob anestesia com halotano e imediatamente após o óbito do animal foi realizada a necrópsia.

Grupo IVS (n = 20): Tumor/agaricus-sobrevida. Os animais foram inoculados com tumor sólido de Walker 256. Foi administrada solução contendo extrato de *A. sylvaticus* na dose de 50mg/kg de peso corporal, por gavagem sendo iniciada 12 horas após a inoculação das células tumorais e mantida de 12 em 12 horas até a data do óbito do animal, para avaliação do tempo de sobrevida.

Avaliação do Quadro Clínico dos Animais

Fichas individuais de avaliação clínica foram utilizadas. Para cada parâmetro clínico foi dada uma pontuação de acordo com as reações apresentadas pelo animal, segundo com o sistema desenvolvido por Morton & Griffiths (1985) ¹¹ que foi adaptado para este trabalho (Tabela 1). Para a avaliação da perda de peso corporal os animais foram pesados em dias alternados em balança semi-analítica.

Tabela 1: Avaliação de dor, sofrimento e desconforto em animais experimentais:

Parâmetro	ID do animal	data	data
<i>Alterações ponderais</i>	Normal (0)		
	Incerto: < 5% de perda (1)		
	10 – 15% de perda; alterações nas fezes (2)		
	> 20% de perda; redução da ingestão de água e alimento (3)		
<i>Aparência física</i>	Normal (pelagem normal, olhos claros e brilhantes) (0)		
	Pelagem áspera (1)		
	Piloereção, secreção nasal e ocular (2)		
	Piloereção, postura anormal, olhos pálidos e pupilas dilatadas (3)		
<i>Sinais clínicos mensuráveis</i>	Normal (0)		
	Pequenas mudanças com significado importante (1)		
	Alteração da temperatura, alterações do ritmo cardíaco e respiratório > 30% (2)		
	Alteração da temperatura, alterações do ritmo cardíaco e respiratório > 50% (3)		
<i>Comportamento</i>	Normal (0)		
	Pequenas mudanças (1)		
	Redução da mobilidade, do estado de alerta, inatividade e separação do grupo (2)		
	Vocalizações espontâneas, auto-mutilação e imobilidade (3)		
<i>Respostas comportamentais aos estímulos externos</i>	Normal (0)		
	Depressão ou respostas exageradas (1)		
	Respostas moderadamente anormais, mudanças moderadas de comportamento (2)		
	Reações violentas a estímulos externos ou resposta muscular muito fraca (3)		

Medição dos Tumores, Cálculo do Volume Final e Avaliação da Ocorrência de Metástases

Os animais foram sacrificados no 13º dia do experimento e os tumores foram retirados e na medição do comprimento, largura e espessura dos mesmos foi utilizado paquímetro aferido pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Cálculo do volume dos tumores foi realizado de acordo com o protocolo de Novaes, 1999¹². Em todos os animais foi realizada necropsia para a avaliação da ocorrência de metástases.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada no software Prisma versão 3.0. Os dados foram analisados utilizando-se procedimentos de análise de variância (ANOVA). A significância estatística aceita foi de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Todos os animais inoculados desenvolveram tumores (Figuras 1 e 2). Os animais com tumor de Walker tratados com *A. sylvaticus* apresentaram volume tumoral menor comparado aos animais com câncer que foram tratados com placebo (Tabela 2). Metástases distais foram observadas nos animais inoculados com tumor de Walker (Figura 3). Pequenos tumores distantes dos sítios de inoculação foram encontrados em tecidos conjuntivo e adiposo em membros posteriores, linfonodos inguinais, axilares e mesentéricos, raiz do mesentério e mediastino. Não foram observadas alterações em órgãos. Dos animais tratados com *A. sylvaticus*, 2 apresentaram metástases enquanto dos animais do grupo placebo 10 apresentaram metástases ($p < 0,01$). Os animais com tumor tratados com *A. sylvaticus* pertencentes ao grupo cujo objetivo era avaliar o tempo de sobrevivência (grupo IVS) não apresentaram diferenças significativas comparados aos animais do grupo tratado com placebo (grupo IIIS) (Tabela 3). Animais apresentando pontuação a partir de 10, de acordo com o sistema utilizado para avaliação clínica, foram sacrificados. Nos animais com tumor de Walker foram observados sinais clínicos importantes como presença de secreção abundante nos olhos e nariz, olhos pálidos, piloereção (figura 4), imobilidade, tremores e dispnéia. No grupo IV (tumor/agaricus) foi observada uma pontuação média de 6,7 e no grupo III (tumor/placebo) a média foi de 10,6 ($p < 0,001$). Os animais saudáveis tratados com *A. sylvaticus* (grupo II) não apresentaram qualquer alteração seja no aspecto físico ou comportamental quando comparados aos animais do grupo I (controle/placebo). Nestes dois grupos os animais apresentaram pelagem de aspecto normal, olhos normocorados, ausência de secreção nos olhos ou nariz, comportamento exploratório característico, estado de alerta e movimentação normais (Figura 5), tendo obtido pontuação igual a zero pelo método adotado.

Tabela 2: Volume dos tumores de animais inoculados com tumor de Walker e tratados com placebo (grupo III) e inoculados com tumor de Walker e tratados com solução de *A. sylvaticus* (grupo IV).

Animais inoculados com tumor de Walker			
	Grupo III	Grupo IV	Significância estatística
Volume dos tumores (cm ³)	17,88 ± 6,27	12,64 ± 5,25	P < 0,001*

Análise univariada (ANOVA). Teste: Bonferroni. Resultados representam a média ± desvio padrão, n = 20 em cada grupo. * Estatisticamente significativo.

Tabela 3: Tempo de sobrevida de animais inoculados com tumor de Walker e tratados com placebo (grupo IIIS) e animais inoculados com tumor de Walker tratados com *A. sylvaticus* (grupo IVS).

Animais inoculados com tumor de Walker			
	Grupo IIIS	Grupo IVS	Significancia estatística
Tempo de sobrevida (dias)	14,95 ± 2,77	15 ± 3,9	P > 0,05

Análise univariada (ANOVA). Teste: Bonferroni. Valores representam a média ± desvio padrão



Figura 1: Animal com tumor sólido de Walker 256 no 13º após a inoculação dilobular na região dorso-lombar.



Figura 2: Aspectos macroscópicos do tumor sólido de Walker 256, extraído durante a necropsia de um animal no 13º dia após a inoculação.

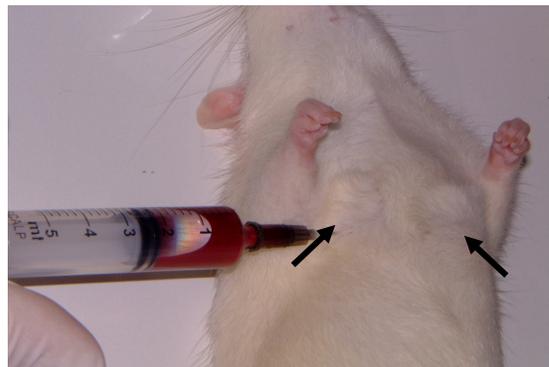


Figura 3: Pequenas massas palpáveis na região torácica identificadas como metástases distais.



Figura 4: Animais com câncer apresentando olhos pálidos (seta) e piloereção.



Figura 5: Animal sadio apresentando comportamento exploratório característico, pelagem com aspecto normal e olhos normocorados.

DISCUSSÃO

O Tumor de Walker 256 tem sido extensamente utilizado em estudos da fisiopatologia do câncer ¹³. Esta linhagem de células de carcinoma mamário de rata descoberta e isolada por George Walker em 1928 é facilmente cultivada *in vivo* e falhas na inoculação e remissões espontâneas são raras, porém este tumor é bastante agressivo, tem rápido crescimento e pequeno período de latência o que pode representar certa dificuldade principalmente em experimentos onde estão sendo avaliadas novas estratégias terapêuticas¹⁴.

No presente trabalho, foram observadas metástases em linfonodos inguinais, mesentéricos e axilares. Pequenos tumores foram também encontrados em tecido conjuntivo na coxa, raiz do mesentério e no mediastino dos animais inoculados. As informações sobre as metástases do tumor de Walker são controversas, sendo que em 1973, Buck descreveu a disseminação metastática abdominal, associada à invasão visceral quando as células foram introduzidas na cavidade peritoneal de ratos. Linfonodos são também atingidos o que enfatiza a hipótese de que a disseminação deste tumor ocorra por via linfática ^{15, 16}.

Os animais inoculados com tumor de Walker, tratados com *A. sylvaticus* (grupo IV) apresentaram menor volume tumoral e menor ocorrência de metástases comparados aos animais com inoculados tumor tratados com placebo (grupo III). Experimentos com membros da família Agaricaceae mostraram que as β -D-glucanas são as substâncias responsáveis pelo efeito anti-tumoral dos cogumelos. Sugere-se que estes polissacarídeos estejam envolvidos na ativação das células do sistema imunológico tais como macrófagos, neutrófilos, células T e células natural killer ^{9, 17}.

As β -D-glucanas são polímeros de glucose que consistem em uma cadeia principal formada por unidades glucopiranosila unidas por ligações β (1 \rightarrow 3), β (1 \rightarrow 4) ou β (1 \rightarrow 6). As cadeias podem variar de comprimento, distribuição das cadeias laterais e estrutura secundária. Estes polissacarídeos constituem a parede celular de fungos, algas e bactérias^{18,19}.

Estas substâncias imunomoduladoras estimulam a produção de mediadores inflamatórios como as citocinas IL-8, IL-1 β e TNF- α . Ensaios *in vitro* sugerem que as β -D-glucanas podem ativar diretamente os leucócitos estimulando suas atividades fagocíticas e citotóxicas incluindo a produção de espécies reativas de oxigênio e intermediários nitrogenados²⁰.

As propriedades farmacológicas de substâncias encontradas em fungos medicinais não se restringem aos efeitos sobre o sistema imunológico. O ergosterol e seus metabólitos extraídos de cogumelos medicinais podem estar envolvidos na inibição da neovascularização induzida pelo tumor⁸. Peróxidos de ergosterol foram encontrados em espécies de cogumelos e estes são também capazes de induzir apoptose em células HL60 de leucemia humana²⁰.

O *A. sylvaticus* é também fonte de nutrientes que funcionam como adjuvantes no tratamento do câncer, como o aminoácido arginina que tem sido descrito como benéfico devido à sua atividade imunomoduladora. A arginina estimula a atividade das células natural killer e células T-helper, estando também relacionado com a produção das citocinas IL-1, IL-2, IL-6 e TNF- α ^{21, 22}.

Os efeitos sistêmicos do câncer são observados também em animais portadores de tumores experimentais³. Mudanças paraneoplásicas representam uma evidência de que os tumores podem afetar quase todos os órgãos e tecidos. As manifestações clínicas mais

freqüentes são: caquexia, anorexia, retinopatia, náusea, neuropatias, mal-estar generalizado e mau funcionamento dos órgãos^{23, 24}.

Segundo Dawkins (2003)²⁵ a utilização da medida do bem estar animal é um processo bastante complexo. A medida da dor e sofrimento em animais experimentais é baseada em mudanças de comportamento e respostas fisiológicas. Um animal sadio normalmente explora seu ambiente, se move normalmente, estabelece contato com os outros animais, se alimenta e ingere água, apresenta pelagem lisa e brilhante, cresce e ganha peso. Quaisquer mudanças nestes aspectos pode ser um indício de dor, sofrimento ou desconforto²⁶.

Os animais com câncer apresentaram sinais clínicos característicos de dor, sofrimento e desconforto como: perda de peso, secreções nasal e ocular abundantes, piloereção, dispnéia, tremores e alterações de comportamento como imobilidade e separação do grupo²⁷. O aumento da liberação de interleucinas pode ser responsável por anormalidades em sítios distantes do tumor. Blay *et al* (1998)²⁸ mostrou que a interleucina IL-6 está envolvida na fisiopatologia das síndromes paraneoplásicas. A perda de peso nestes animais pode constituir um quadro clínico típico chamado síndrome caquexia/anorexia relacionada ao câncer²⁹. A caquexia é devida ao aumento do consumo energético pelo tumor, liberação de citocinas e anormalidades metabólicas³⁰.

Os animais inoculados com tumor de Walker e tratados com *A. sylvaticus* apresentaram melhora do quadro clínico comparado aos animais inoculados com tumor e tratados com placebo o que indica a atuação benéfica deste fungo, podendo estar relacionada com a redução da liberação de mediadores inflamatórios além das propriedades nutricionais desta espécie poder influenciar na redução da perda ponderal observada nos animais. Os fungos de uso medicinal têm sido estudados no tratamento de doenças

inflamatórias. Alguns estudos indicam que metabólitos extraídos de espécies de fungos podem estimular ou suprimir componentes do sistema imunológico ³¹.

Melhoras clínicas observadas nos animais tratados com *A. sylvaticus* foram observadas no presente estudo, porém esta espécie não foi capaz de aumentar o tempo de sobrevivência dos animais tratados comparados aos animais que receberam solução placebo.

Relatos sobre efeitos adversos causados por cogumelos comestíveis são limitados. Casos de hipersensibilidade foram encontrados ³². Kuroiwa *et al* (2005) ³³, mostrou em um ensaio sub-crônico que o cogumelo *Agaricus blazei* é bem tolerado mesmo em doses altas. Em um estudo de toxicidade aguda a espécie *A. sylvaticus* não causou alterações clínicas, histopatológicas ou hematológicas em animais ³⁴.

Os animais controle tratados com *A. sylvaticus* (grupo II) não apresentaram alterações físicas ou comportamentais comparados aos animais controle tratados com placebo (grupo I), confirmando a boa tolerabilidade deste fungo.

CONCLUSÃO:

Os resultados obtidos indicam que a administração do fungo *Agaricus sylvaticus*, aos animais inoculados com tumor sólido de Walker 256, atua de forma benéfica ao melhorar os parâmetros clínicos e anátomopatológicos destes animais. Dessa forma, a espécie estudada pode futuramente contribuir como complemento à terapia do câncer trazendo ao paciente um maior bem estar físico que traduz-se no aumento da qualidade de vida. No entanto o *A. sylvaticus* necessita de estudos toxicológicos que provem que o mesmo é seguro para o uso humano e que determine o período de tempo no qual o mesmo possa ser usado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Burton AW, Cleeland CS. Cancer pain: Progress since the WHO guidelines. *Pain Practice*. 2001;1 (3): 236 – 242
2. Jones LW, Demark-Wahnefried W. Diet, exercise and complementary therapies after primary treatment for cancer. *The Lancet Oncology*. 2006; 7: 1017 - 26
3. Rubin H. Systemic effects of cancer: Role of multiple proteases and their toxic peptide products. *Med Sci Monit*. 2005; 11 (7): 221 – 228
4. Bongaerts GPA, van Halteren HK, Verhagen CAM, Wagener DJT. Cancer cachexia demonstrates the energetic impact of gluconeogenesis in human metabolism. *Medical Hypotheses*. 2006; 67 (5): 1213 – 22
5. Fukshansky M, Are M, Burton AW. The role of opioides in cancer pain management. *Pain Practice*. 2005; 5 (1): 43 – 54
6. Lindequist U, Niedermeyer THJ, Julich WD. The pharmacological potential of mushrooms. *eCAM*. 2005; 2(3): 285 – 99
7. Sullivan R, Smith JE, Rowan NJ: Medicinal mushrooms and cancer therapy: translating a traditional practice to Western medicine. *Perspectives in Biology and Medicine*. 2006; 49(2): 159(12)
8. Takaku T, Kimura Y, Okuda H. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murril and its mechanism of action. *J Nutr*. 2001; 131: 1409 – 13

9. Lee YL, Kim HJ, Lee MS *et al.* Oral administration of *Agaricus blazei* (H1 strain) inhibited tumor growth in a sarcoma 180 inoculation model. *Exp. Anim.* 52 (5); 371 – 375. 2003
10. Wasser SP. Review of medicinal mushrooms advances: good news from old allies. *HerbalGram.* 2002; 56: 28 – 33
11. Morton DB, Griffiths PHM. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec* 1985; 116: 431
12. Novaes MRCG. Efeitos da suplementação nutricional com L-arginina no tumor de Walker 256. Tese de Doutorado, 1999. Universidade de Brasília
13. Cavalcanti TC, Gregorini CC, Guimarães F, Retori O e Vieira Matos AN. Changes in red blood cell osmotic fragility induced by total plasma and plasma fractions obtained from rats bearing progressive and regressive variants of the Walker 256 tumor. *Braz Journ Med Biol Res.* 2003; 36: 887 – 95
14. Moraes SP, Cunha A, Reis JA, Barbosa H, Roncolato CAP e Duarte RF. Modelo experimental de tumor de Walker. *Acta Cir Bras.* 2000; 15 (4): doi 10.1590/S0102-86502000000400008
15. Silva LFG, Soares FSD, Anselmo JNN *et al.* Tumor experimental em rim de ratos. *Acta Cir Bras.* 2002; 17 (1): doi 10.1590/ S0102-86502002000100009
16. Buck, R. Walker 256 Tumor Implantation in Normal and Injured Peritoneum Studied by Electron Microscopy, Scanning Electron Microscopy and Autoradiography. *Cancer Research.* 1973; 33: 3181-8

17. Novaes, MRCG, Fortes RC. Efeitos da suplementação dietética com cogumelos agaricales e outros fungos medicinais na terapia contra o câncer. *Rev Bras Cancerol.* 2006; 52 (4): 363 – 371
18. Brown GD e Gordon S. Fungal β -glucans and mammalian immunity. *Immunity.* 2003; 19: 311 – 5
19. Fortes RC, Taveira VC, Novaes MRCG. The immunomodulator role of β -D-glucans as co-adjuvant for cancer therapy. *Rev Bras Nutr Clin.* 2006; 21(2): 163-8
20. Takei T, Yoshida M, Ohnishi-Kameyama M, Kobori M. Ergosterol peroxide, an apoptosis inducing component isolated from *Sarcodon aspratus* (Berk) S. Ito. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2005; 69(1): 212 – 215
21. Novaes MRCG, Lima LAM, Novaes LCG, MV Souza. Metabolic and hematologic effects of dietary supplementation with arginine on rats bearing ascitic Walker 256 tumor. *Ann Nutr and Metab.* 2004; 48: 404-8
22. Novaes MRCG, Lima LAM, Ribeiro JEG, Magalhães AV, Souza MV, Morhy L. Efeitos farmacológicos da suplementação dietética com arginina em ratos com tumor sólido de Walker 256. *Arch Latinoam Nutr* 2000; 50 (3): 230 - 6
23. Lichtenstein AV. On evolutionary origin of cancer. *Cancer Cell International.* 2005; 5 (5) : doi 10.1186/ 1475-2867-5-5
24. Finoras K. Common paraneoplastic syndromes. *Clin Tech Small Anim Pract.* 2003; 18 (2): 123 – 6
25. Dawkins MS. Behaviour as a tool in the assessment of animals welfare. *Zoolog.* 2003; 106: 383 – 7
26. Spinelli JS, Markowitz H. Clinical recognition and anticipation of situations likely to induce suffering in animals. *Journ Americ Veter Assoc.* 1987; 191: 1216 – 18

27. Charmaine JF, Ullman-Cullere M. Guidelines for accessing the health and condition of mice. *Lab Anim.* 1999; 28 (4): 28 – 32
28. Blay JY, Rossi JF, Wijdenes J *et al.* Role of interleukin-6 in the paraneoplastic syndrome associated with renal-cell carcinoma. *Internacional Journal of Cancer.* 1998; 72 (3): 424 – 30
29. Mantovani G, Madeddu C, Macció A *et al.* Cancer-related anorexia/ cachexia syndrome and oxidative stress: an inovative approach beyond current treatment. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004; 13 (10): 1651 – 59
30. Silva MPN. Síndrome da anorexia-caquexia em portadores de câncer. *Revista Brasileira de Cancerologia.* 2006; 52 (1): 59 -77
31. Lull C, Wichers HJ, Savelkoul FJ: Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators of inflammation.* 2005; (2): 63 – 80
32. Ho MHK e Hill DJ. White button mushroom food hypersensitivity in a child. *Journ Paediatr Child Heal.* 2006; 42: 555 – 6
33. Kuroiwa Y, Nishikawa A, Imazawa T *et al.* Lack of subchronic toxicity of an aqueous extract of *Agaricus blazei* Murril in F344 rats. *Food Chem Toxicol.* Jul. 2005; 7: 1047-53.
34. Novaes MRCG, Novaes, LCG, Recova V. e Melo, A: Evaluation of acute toxicity of edible mushroom *Agaricus Sylvaticus*. *Clinical nutrition (Edinburgh, Lothian)* 2005: 672-672.

CONCLUSÃO

A utilização de cogumelos medicinais como adjuvantes na terapêutica do câncer tem como principais benefícios a melhora do bem estar e o aumento da sobrevida do paciente, pois algumas espécies funcionam como aporte de nutrientes essenciais e fonte de substâncias farmacologicamente ativas. No presente estudo o cogumelo *Agaricus sylvaticus* apresentou efeitos benéficos em animais com tumor de Walker 256 como mostrado por meio da melhora de parâmetros diagnósticos, clínicos e anátomopatológicos tendo sido bem tolerado dentro do período no qual foi utilizado. Portanto, os resultados obtidos indicam que a espécie estudada possa posteriormente ser utilizada como complemento à terapia convencional do câncer, após a comprovação da segurança da mesma por meio de futuros estudos toxicológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Gadelha MIP, Costa MR, Almeida RT. Estadiamento de tumores malignos – análise e sugestões a partir de dados da APAC. Rev Bras Cancerol. 2005; 51 (3): 193 – 9
- 2- Meng X, Riordan NH. Cancer is a functional repair tissue. Med Hypotheses. 2006; 66: 486 – 490
- 3- Lichtenstein AV. Cancer as a programmed death of an organism. Biochemistry (Moscow). 2005; 70 (9): 1277-88
- 4- Burton AW, Cleeland CS. Cancer pain: Progress since the WHO guidelines. Pain Practice. 2001; 1 (3): 236 – 42
- 5- Instituto Nacional de Cancer (INCA). Estimativa 2006 - Incidência de Câncer no Brasil.
- 6- Hamamoto T, Suzuki K, Sasaki H, Ichikawa M, Kodama S, Watanabe M. Differences in effects on oncogenes on sensitivity to anticancer drugs. J Radiat Res. 2005; 46: 197 – 203
- 7- Elias AC, Alves E. Medicina não-convencional: prevalência em pacientes oncológicos. Rev Bras Cancerol. 2002; 48 (4): 523 – 32
- 8- Takaku T, Kimura Y e Okuda H. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Muril and its mechanism of action. J Nutr. 2001; 131: 1409 – 13
- 9- Borchers AT, Stern JS, Hackman RM, Keen CL, Gershwin ME. Mushrooms, tumors and immunity. Proc Soc Exp Biol Med 1999 Set; 221(4): 281-293
- 10- Lee LY, Kin HJ, Lee MS, Kin JM, Han JS, Hong EK *et al.* Oral administration of *Agaricus blazei* (H1 Stain) inhibited tumor growth in a sarcoma 180 inoculation model. Exp Anim 2003; 52(5): 371-5

- 11- Borchers AT, Keen CL, Gershwin E. Mushrooms, tumors and immunity: an update. *Exp Biol and Medicine*. 2004; 229: 393 – 406
- 12- Lull C, Wichers HJ, Savelkoul HFJ. Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators of Inflammation*. 2005; 2005 (2): 63 – 80
- 13- Sadler M. Nutritional properties of edible fungi. *Brit Nutrit Found Bull*. 2003; 28: 305 - 8
- 14- Schueren MAEB. Nutritional support strategies for malnourished cancer patients. *Europ Journ Oncol Nurs*. 2005; 9: S78 – S89
- 15- Novaes MRCG, Fortes R Melo A, Recova V. Alterations on the metabolism of lipids in post-surgery patients with colorectal cancer supplemented with fungus *Agaricus sylvaticus*. *Clin Nutr*. 2005; 24(4): 672-672
- 16- Novaes MRCG, Fortes RC. Efeitos antitumorais de cogumelos comestíveis da família *agaricaceae*. *Revi Nutr Brasil*. 2005; 4 (4): 207-17
- 17- Novaes MRCG, Novaes LCG, Recova V, Melo A. Evaluation of acute toxicity of edible mushroom *Agaricus sylvaticus*. *Clin Nutrit*. 2005; 24(4): 672-672
- 18- Kopnin BP. Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry (Moscow)*. 2000; 65 (1): 05 – 33
- 19- Radic S, Stanojevik V, Dindic B. The pathogenesis of neoplasia, *Arch Oncol*. 2004; 12 (1): 35 – 7
- 20- Strahm B, Capra M. Insights into the molecular basis of cancer development. *Current Paediatrics*. 2005; 15: 333 – 8
- 21- Weinberg RA. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cancer J Clin*. 1994; 44: 160 – 70
- 22- Gottlieb TM, Oren M. p53 and apoptosis. *Semin Cancer Biol*. 1998; 8: 359 – 68

- 23- Velculescu VE, El-Deiry WS. Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. *Clin Bioch.* 1996; 42 (6): 858 – 68
- 24- Alfano FD. A stochastic model of oncogene expression and the relevance of this model to cancer therapy. *Theoret Biol Med Model.* 2006; 3 (5): 1 – 7
- 25- Loureiro APM, Mascio P, Medeiros MHG. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. *Quim Nova.* 2002; 25 (5) doi 101590/S0100-40422002000500014
- 26- Almeida VL, Leitão A, Reina LCB, Montanari CA, Donnici CL. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quim Nova.* 2005; 28 (1): 118 – 29
- 27- Oppenheimer SB. Cellular basis of cancer metastasis: a review of fundamentals and new advances. *Acta Histochem.* 2006; 108: 327 – 34
- 28- Meohas W, Probstner D, Vasconcelos RDT, Lopes ACS, Resende JFN, Fiod NJ. Metástase óssea: revisão da literatura. *Rev Bras Cancerol.* 2005; 51 (1): 43 – 7
- 29- Lu DY, Chen XL, Ding J. Treatment of solid tumors and metastasis by fibrinogen-targeted anticancer drug therapy. *Medical Hypothesis.* 2007; 68: 188 - 93
- 30- Thomas I, Schwartz RA. Cutaneous paraneoplastic syndromes: uncommon presentations. *Curr Sci.* 2005; 23: 593 – 600
- 31- Rubin H. Systemic effects of cancer: role of multiple proteases and their toxic peptide products. *Med Sci Monit.* 2005; 11 (7): 221 – 8
- 32- Lattermann R, Geisser W, Georgieff M, Wachter U, Goertz A, Gnann R, Schrincker T. Integrated analysis of glucose, lipid and urea metabolism in patients with bladder cancer: Impact of tumor stage. *Nutrition.* 2003; 19: 589-92

- 33- Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and Creatinine Metabolism. *Physiological Reviews* 2000; 80(3): 1107 – 1213
- 34- Lehrer S, Diamond EJ, Mamkine B, Drolle MJ, Stone NN, Stock RG. C-reactive protein is significantly associated with prostate specific antigen and metastatic disease in prostate cancer. *Bju International*. 2005; 95: 961 – 2
- 35- Silva MPN. Síndrome da anorexia-caquexia em portadores de câncer. *Rev Bras Cancerol*. 2006; 52 (1): 59 – 77
- 36- Instituto Nacional de Câncer (INCA). Estimativas da incidência de mortalidade por câncer no Brasil. 2003
- 37- Ahamad A, Jhingran A. New radiation technique in gynecological cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2004; 14: 569 – 79
- 38- Makluf ASD, Dias RC, Barra AA. Avaliação da qualidade de vida em mulheres com câncer de mama. *Rev Bras Cancerol*. 2006; 52 (1): 49 – 58
- 39- Cavalcanti TC, Gregorini CC, Guimarães F, Rettori O, Vieira-Matos, AN. Changes in red blood cell osmotic fragility induced by total plasma and plasma fractions obtained from rats bearing progressive and regressive variants of the Walker 256 tumor. *Braz Journ Med Biol Res*. 2003; 36: 887 – 95
- 40- Oba-Shinjo SM, Berto AGA, Passeroti CC, Barbosa CD, Sampaio LO. Decorin is one of the proteoglycans expressed in Walker 256 rat mammary carcinoma. *Braz J Med Biol Res*. 2003; 36 (8): 1079 – 89
- 41- Moraes SP, Cunha A, Neto JAR, Barbosa H, Roncolato H, Duarte RF. Modelo experimental de tumor de Walker. *Act Cir Bras*. 2000; 15 (4): doi 10.1590/S0102-86502000000400008

- 42- Gameiro PH. Efeito antimutagênico do extrato aquoso *Agaricus brasiliensis* em cultura de linfócitos humanos [Monografia de conclusão de curso]. Universidade Federal de Pelotas; 2005
- 43- Ramirez L, Larraya RM, Pisabarro AG. Molecular tools for breeding basidiomycetes. Internatl Microbiol. 2000; 3: 147 - 52
- 44- Walde SG, Velu V, Jyothirmayi T, Math RG. Effects of the pretreatments and drying methods on dehydration of mushrooms. Journ Food Engen. 2006; 74: 108-15
- 45- Souza HQ, Aguiar IJA. Diversidade de agaricales (basidiomicota) na reserva biológica Walker Egler, Amazonas, Brasil. Acta Amazônica. 2004; 34(1): 43-51
- 46- Lindahl BD. Nutrients cycling in boreal forests – a mycological perspective. Studies on phosphorus translocation within and between mycelia of saprotrophic and mycorrhizal fungi. 2001; Tese de Doutorado. Suécia
- 47- Ruegger MJS, Tornisielo SMT, Bononi VLR, Capelari M. Cultivation of edible mushroom *Oudemansiella canarii* (Jung) Honh in lignocelulosic substrates. Brazilian Journal of Microbiology. 2001; 32: 211 – 4
- 48- Manzi P, Marconi S, Aguzzi A, Pizzoferrato L. Comercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking. Food chemistry. 2004 ; 84: 201 – 6
- 49- Okamura T, Ogata T, Minamimoto N, Takeno T, Noda H, Fukuda S, Ohsugi M. Characteristic of wine produced by mushrooms fermentation. Biosci Biotechnol Biochem. 2001; 65 (7): 1596 – 1600
- 50- Bonzom PM, Nicolaou A, Zloh M, Baldeo W, Gibbons WA. NMR lipid profile of *Agaricus bisporus*. Phytochem. 1999; 50 (8): 1311 - 21
- 51- Braaksma A, Shaap DJ. Protein analyses of the common mushroom *Agaricus bisporus*. Postharv Biol Technol. 1996; 7: 119-27

- 52- Mdachi SJM, Nkunya MHH, Nyigo VA, Urasa IT. Amino acids composition of some Tanzanian wild mushrooms. *Food Chemistry*. 2004; 86 (2): 179 - 82
- 53- Dias ES, Abe C, Schwan RF. Truths and myths about the mushroom *Agaricus blazei*. *Sci Agric (Piracicaba, Brasil)*. 2004; 61(5): 545-9
- 54- Brown GD e Gordon S. Fungal β -glucans and mammalian immunity. *Immunity*. 2003; 19: 311 – 5
- 55- Sorimachi K, Akimoto K, Ikehara Y, Inafuku K, Okubo A, Yamazaki S. Secretion of TNF- α , IL-8 and Nitric Oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei* Murril fractions *in vitro*. *Cell Struct Funct*. 2001; 26: 103 – 8.
- 56- Fortes RC, Taveira VC, Novaes MRCG. The immunomodulator role of β -D-glucans as co-adjuvant for cancer therapy. *Rev Bras Nutr Clin*. 2006; 21 (2): 163-8
- 57- Novaes MRCG, Lima LAM, Souza MV. Effects of the suplement using arginine 6% into experimental tumor. *J Metabol Nutr*. 2003; 7(2) : 52-6
- 58- Mizuno M, Morimoto M, Minato K, Tsuchida H. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1998; 62(3) : 434-7
- 59- Ebina T., Fujimiya Y. Antitumor effect of a peptide-glucan extracted of *Agaricus blazei* in a double grafted tumor system in mice. *Biotherapy*. 1998; 11(4): 259-65
- 60- Takei T, Yoshida M, Ohnishi-Kameyama M, Kobori M. Ergosterol peroxide, an apoptosis inducing component isolated from *Sarcodon aspratus* (Berk) S. Ito. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2005; 69(1): 212 – 15
- 61- Koyama Y, Katsuno Y, Miyoshi N, Hayakawa S, Mita T *et al*. Apoptosis induction by lectin isolated from the mushroom *Boletopsis leucomelas* in U937 cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2002; 66 (4): 784-9

- 61- Lin SB, Li CH, Lee SS, Kan LS. Triterpene-enriched extracts from *Ganoderma lucidum* inhibit growth of hepatoma cells via suppressing protein kinase C, activating mitogen-activated protein kinases and G2-phase cell cycle arrest. *Life Sci.* 2003; 72: 2381 – 90
- 62- Yu LG, Fernig DG, White MRH, Spiller DG, Appleton P, Evans RC *et al.* Edible Mushroom (*Agaricus bisporus*) Lectin, Which Reversibly Inhibits Epithelial Cell Proliferation, Blocks Nuclear Localization Sequence-dependent Nuclear Protein Import. *The Journ Biol Chem.* 1999; 274(8): 4890-9
- 63- Novaes MRCG. Efeitos da suplementação nutricional com L-arginina no tumor de Walker 256. 1999. Tese de Doutorado – Universidade de Brasília
- 64- Morton DB, Griffiths PHM. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec* 1985; 116: 431

ANEXO A

FICHA DE COLETA DE DADOS DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS:

Fichas dos ratos da Pesquisa com *Agaricus sylvaticus* :

No. do animal : _____ Cor: _____ Sexo: _____ Caixa: _____

Idade: _____

Data da Inoculação : ___/___/____.

Gavagens:

	1°. dia	2°. dia	3°. dia	4°. dia	5°. dia	6°. dia
Manhã						
Tarde						

Peso:

	1°. dia	2°. dia	3°. dia	4°. dia	5°. dia	6°. Dia
Peso (g)						
Alteração na alimentação						

Evolução da Doença:

Exames:

- Bioquímica:

Data do Óbito:

Óbito: () inoculação () sacrifício () tempo de sobrevida

ANEXO B

ARTIGO DE REVISÃO PUBLICADO NA REVISTA BRASILEIRA DE NUTRIÇÃO
CLÍNICA

ANEXO C

APRESENTAÇÃO DE TRABALHO NA REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL-FESBE

XXI Reunião Anual da

FSBE

Federação de Sociedades de
Biologia Experimental

Certificamos que:

o resumo 44.099 NÍVEIS DE PROTEÍNA C REATIVA EM ANIMAIS INOCULADOS COM TUMOR SÓLIDO DE WALKER 256 TRATADOS COM O FUNGO AGARICUS SYLVATICUS. ¹Taveira, V. C. ^{1,4}Faculdade de Medicina, UnB; ²Nutrição, UnB; ³Facultad de Medicina, UnB; ⁵Faculdade Medicina, UnB foi apresentado sob a forma de painel na

**XXI Reunião Anual da
Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FESBE, realizada
na cidade de Águas de Lindóia - São Paulo, de 23 a 26 de agosto de 2006**

Juliana Malusci

Comissão Organizadora

2006

XXI Reunião Anual da

FSBE

Federação de Sociedades de
Biologia Experimental

Certificamos que:

o resumo 44.080 EFEITOS DO TRATAMENTO COM O FUNGO AGARICUS SYLVATICUS SOBRE A ANEMIA EM ANIMAIS COM TUMOR SÓLIDO DE WALKER 256. ¹Taveira, V. C.; ² Novaes, MRCG; ³ Reis, MA* ; ⁴ Silva, MF* ; ⁵ Sala, BHA* ; ^{1,3,4,5}Faculdade de Medicina, UnB; ²Nutrição, UnB foi apresentado sob a forma de painel na

XXI Reunião Anual da
Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FESBE, realizada
na cidade de Águas de Lindóia - São Paulo, de 23 a 26 de agosto de 2006

Gerhard Maltesc

Comissão Organizadora

2006