



Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ
Centro Biomédico – Faculdade de Ciências Médicas
Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia
e Ciências Cirúrgicas – PG-FISIOCIRURGIA

Efeito da dieta à base de biomassa de cogumelo do sol (*Agaricus blazei*, Murrill) no parênquima pulmonar de ratos *wistar* submetidos a estímulo carcinogênico pela nitrosamina 4-metilnitrosamina-1-3pyridil-1butanona (NNK).

CAROLINA CROCCIA

Tese de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, PG-Fisiocirurgia, UERJ, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo Acatauassú Nunes

Co-orientadores: Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto e Prof. Dr. Armando U. O. Sabaa Srur

Rio de Janeiro, RJ – Brasil 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C937 Croccia, Carolina.
Efeito da dieta à base de biomassa de Cogumelo do Sol
(Agaricus blazei, Murrill) no parênquima pulmonar de ratos wistar
submetidos a estímulo carcinogênico pela nitrosamina 4-
metilnitrosamina-1-3pyridil-1 butanona (NNK) / Carolina Croccia. -
2010.

112 f. : il.

Orientador: Rodolfo Acatauassú Nunes.

Coorientadores: Luiz Felipe Ribeiro Pinto, Armando U.O.

Sabaa Srur.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Agaricus Blazei - Teses. 2. Cogumelos medicinais - Teses. 3.
Nitrosaminas - Teses. 4. Glucanas - Teses. 5. Carcinogênese -

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial
desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data



Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ
Centro Biomédico – Faculdade de Ciências Médicas
Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia
e Ciências Cirúrgicas – PG-FISIOCIRURGIA

CAROLINA CROCCIA

Efeito da dieta à base de biomassa de cogumelo do sol (*Agaricus blazei*, Murrill) no parênquima pulmonar de ratos *wistar* submetidos a estímulo carcinogênico pela nitrosamina 4-metilnitrosamina-1-3pyridil-1butanona (NNK).

**Rio de Janeiro
2010**

ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 - INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 – Cogumelo do Sol	3
2.1.1- β -glucana	4
2.2 – Dados Epidemiológicos do Câncer	7
2.3 – Câncer de Pulmão	9
2.4 – Nitrosaminas	11
2.4.1 – 4-(metilnitrosamina)-1-(3-pyridil)-1 butanona (NNK)	11
3- OBJETIVOS	15
3.1 – Objetivo Geral	15
3.2 – Objetivos Específicos	15
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1- Matéria-Prima	16
4.2- Animais Experimentais e Biotério	17
4.3- Manuseio das Amostras	17
4.4- Determinações na Farinha	18
4.4.1 - Umidade	18
4.4.2 – Proteínas Totais	18
4.4.3 – Lipídeos Totais	19
4.4.4 – Cinzas	19
4.4.5 - Minerais	19
4.4.6 – Fibra Insolúvel	20
4.4.7 – Carboidratos	20
4.4.8 – Calorias	20
4.5 – Extrato do <i>Agaricus blazei</i> Murrill	20
4.6 - Preparo e Diluição da 4-(metilnitrosamina)-1-(3-pyridil)-1 butanona (NNK)	21

4.7- Composição dos Grupos	22
4.8 – Aquisição e Análise de Imagens pulmonares	23
4.9 – Rações Utilizadas	24
4.10 – Nitrosamina	24
4.11 – Administração de Cogumelo do Sol e Nitrosamina	
4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1 butanona (NNK)	26
4.12 – Modificações no Protocolo Experimental	27
4.13 – Métodos de Avaliação Corporal	27
4.14 – Tomografias	27
4.15 – Segmentação semi-automática e curtose	31
4.16 – Métodos de Avaliação Laboratorial	32
4.17 – Métodos de Avaliação Morfológica	33
4.17.1 – Avaliação Histomorfológica Pulmonar	34
4.18 – Metodologia Estatística	34
5 – RESULTADOS	36
5.1 - Gráficos de Evolução de Peso Corporal de Cada Grupo Experimental	38
5.2 - Gráficos de Consumo de Ração de Cada Grupo Experimental	43
5.3 – Parâmetros Laboratoriais: Hemograma	48
5.4 – Parâmetros Laboratoriais: Hepatograma	56
5.5 – Parâmetros Laboratoriais: Colesterol e Triglicerídeo	60
5.6 – Macroscopia Pulmonar	62
5.7 – Microscopia	63
5.8 - Análise da Curtose na Curva do Histograma	76
5.9 – Ilustração dos Resultados	80
6 - DISCUSSÃO	88
7 – CONCLUSÕES	102
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
9 - ANEXOS	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A. blazei - *Agaricus blazei* Murrill

NNK – 4-(metilnitrosamina)-1-(3-pyridil)-1 butanona.

NK – Células natural killer

IL 12 – Interleucina 12.

GC – Grupo Controle.

CSOL 14,3 – Grupo Controle com Cogumelo do Sol na dose de 14,3 mg.

CSOL 42,9 – Grupo Controle com Cogumelo do Sol na dose de 42,9 mg.

GN – Grupo Nitrosamina.

NSOL 14,3 – Grupo Nitrosamina com Cogumelo do Sol na dose de 14,3 mg.

NSOL 42,9 – Grupo Nitrosamina com Cogumelo do Sol na dose de 42,9 mg.

TGO – Aspartato aminotransferase.

TGP – Alanina aminotransferase.

GGT – Gama glutamiltransferase.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da β -glucana.	4
Figura 2 – Estrutura da 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1 butanona (NNK).	11
Tabela 1: Organoespecificidade da 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1 butanona (NNK) no pulmão de roedores.	13
Figura 3 - Mecanismo de atuação da nicotina e NNK nas células.	14
Figura 4 - Ilustração do Cogumelo do Sol desidratado.	16
Figura 5 – Diagrama dos Grupos Experimentais	23
Figura 6 - NNK diluída em óleo de milho em seringa descartável para aplicação nos animais experimentais.	25
Figura 7 - Manuseio do animal para receber a injeção do cancerígeno NNK.	25
Figura 8 - Rato Wistar recebendo o cancerígeno NNK via subcutânea.	26
Figura 9: Animais anestesiados e dispostos na mesa do tomógrafo.	28
Figura 10 - Dados presentes no histograma global do nódulo fornecido pelo BEBÚI.	29
Figura 11 - Imagem de tomografia computadorizada de animal do grupo nitrosamina série 24.	29
Figura 12 – Imagem de tomografia computadorizada de animal do grupo nitrosamina série 21.	30
Figura 13 - Condensação em ápice direito de animal do grupo NNK + cogumelo do sol na dose de 14,3 mg (GNSOL 14,3).	30
Figura 14 - Página inicial do <i>software</i> BEBÚI.	31
Tabela 2 - Comparação da Composição centesimal e composição de minerais do Cogumelo do Sol.	36
Figura 15 - Gráfico de evolução de peso corporal do grupo controle (CG).	38
Figura 16 - Gráfico de evolução de peso corporal do grupo controle com Cogumelo do Sol na dose de 14,3 mg (CSOL 14,3).	39
Figura 17 - Gráfico de evolução do grupo controle com Cogumelo do Sol na dose de 42,9 mg (CSOL 42,9).	39
Figura 18 - Gráfico de evolução de peso corporal do grupo nitrosamina (GN).	40
Figura 19 - Gráfico de evolução de peso corporal do grupo	

nitrosamina + cogumelo do sol por gavagem na dose de 14,3 mg (NSOL 14,3).	41
Figura 20 - Gráfico de evolução de peso corporal do grupo nitrosamina + cogumelo do sol por gavagem na dose de 14,3 mg (NSOL 14,3).	41
nitrosamina + cogumelo do sol por gavagem na dose de 42,9 mg (NSOL 42,9).	41
Figura 21 - Gráfico de evolução de peso corporal de todos os grupos estudados.	42
Figura 22 - Gráfico do consumo de ração do grupo controle (GC).	44
Figura 23 - Gráfico de consumo de ração do grupo controle com cogumelo do sol por gavagem na dose de 14,3 mg (CSOL 14,3).	44
Figura 24 - Gráfico de consumo de ração do grupo controle com cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (CSOL 42,9).	45
Figura 25 - Gráfico do consumo de ração do grupo nitrosamina (GN).	45
Figura 26 - Gráfico do consumo de ração do grupo nitrosamina + cogumelo do sol por gavagem na dose de 14,3 mg (NSOL 14,3).	46
Figura 27 - Gráfico do consumo de ração do grupo nitrosamina + cogumelo do sol por gavagem na dose de 42,9 mg (NSOL 42,9).	46
Figura 28 - Gráfico do consumo de ração de todos os grupos estudados.	47
Figura 29 - Gráfico do hematócrito de todos os grupos estudados.	48
Figura 30 - Gráfico de hemoglobina de todos os grupos estudados.	49
Figura 31 - Gráfico da contagem de hemácias dos grupos estudados.	50
Figura 32 - Gráfico da contagem das plaquetas de todos os grupos estudados.	51
Figura 33 - Gráfico da contagem dos linfócitos de todos os grupos estudados.	52
Figura 34 - Gráfico da contagem de neutrófilos de todos os grupos estudados.	53
Figura 35 - Gráfico da contagem de monócitos de todos os grupos estudados.	53
Figura 36 - Gráfico da contagem de leucócitos de todos os grupos estudados.	54
Figura 37 - Gráfico da contagem de eosinófilos de todos os grupos estudados.	55
Figura 38 - Gráfico da fosfatase alcalina de todos os grupos estudados.	56
Figura 39 - Gráfico da aspartato aminotransferase (TGO) dos grupos estudados.	57
Figura 40 - Gráfico da alanina aminotransferase (TGP) dos grupos estudados.	58
Figura 41 - Gráfico da gama glutamil transferase (GGT) dos grupos estudados.	59
Figura 42 - Gráfico da análise de colesterol dos grupos estudados.	60
Figura 43 - Gráfico de triglicérideo dos grupos estudados.	61
Tabela 3 - Alterações macroscópicas do grupo nitrosamina e grupo	

nitrosamina + cogumelo do sol nas doses de 14,3 mg e 42,9 mg.	62
Tabela 4 - Alterações macroscópicas do grupo controle e grupo controle mais cogumelo do sol nas doses de 14,3 mg e 42,9 mg.	63
Tabela 5 – Achados microscópicos de todos os grupos estudados.	64
Figura 44 - Gráfico da diferença de exsudato alveolar encontrado nas análises microscópicas dos grupos: GC x GN e GCSOL 42,9 x GNSOL 42,9.	65
Figura 45 - Gráfico da diferença de exsudato bronquiolar encontrado nas análises microscópicas dos grupos: GC x GN e GCSOL 42,9 x GNSOL 42,9.	65
Figura 46 - Gráfico de exsudato alveolar e exsudato bronquiolar entre os grupos: GCSOL 14,3 e GNSOL 14,3.	66
Figura 47 – Microscopia óptica de pulmão de rato sem alteração.	67
Figura 48 – Microscopia óptica de pulmão de rato com congestão e edema.	68
Figura 49 – Microscopia óptica de pulmão de rato com broncopneumonia.	69
Figura 50 – Microscopia óptica de pulmão de rato com pneumonia.	70
Figura 51 – Microscopia óptica de pulmão de rato com bronquiectasia.	71
Figura 52 – Microscopia óptica de pulmão de rato com abscesso.	
Tricômico de Masson.	72
Figura 53 – Microscopia óptica de pulmão de rato com metaplasia escamosa do epitélio brônquico.	73
Figura 54 – Microscopia óptica de pulmão de rato com fibrose.	
Tricômico de Masson .	74
Figura 55 – Microscopia óptica de pulmão de rato. Perls.	75
Figura 56 – Gráfico da curtose de ambos os pulmões dos grupos: GC x GN.	76
Figura 57 - Exemplo da curva do histograma demonstrando a curtose típica dos grupos controle (GC; CSOL 14,3 e CSOL 42,9).	77
Figura 58 – Gráfico da curtose de ambos os pulmões dos grupos: CSOL 14,3 x NSOL 14,3.	78
Figura 59 – Gráfico da curtose de ambos os pulmões dos grupos: CSOL 42,9 x NSOL 42,9.	79
Figura 60 - Exemplo da curva do histograma representativa da curtose do grupo nitrosamina (GN) e do grupo nitrosamina com cogumelo do sol	

na dose de 42,9 mg (GNSOL 42.9).	80
Figura 61 - Imagens pulmonares de animal do grupo controle (GC) originada pelo <i>software</i> BEBÚI.	81
Figura 62 - Imagens pulmonares de animal do grupo nitrosamina (GN) originada pelo <i>software</i> BEBÚI ao início do experimento.	82
Figura 63 - Imagens pulmonares de animal do grupo nitrosamina (GN) originada pelo <i>software</i> BEBÚI ao final do experimento.	83
Figura 64 - Imagens pulmonares de animal do grupo controle com cogumelo do sol na dose de 14,3 mg (GCSOL 14.3).	84
Figura 65 – Imagens pulmonares de animal do grupo nitrosamina com cogumelo do sol na dose de 14,3 mg (NSOL14,3).	85
Figura 66 - Imagens pulmonares de animal do grupo controle com cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (GCSOL 42.9).	86
Figura 67 - Imagens pulmonares de animal do grupo nitrosamina com cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (GNSOL 42,9).	87

RESUMO

Os cogumelos há muitos anos vêm sendo utilizados na alimentação por seus valores nutricionais e/ou como agente terapêutico. Um dos fungos mais estudados atualmente é o *Agaricus blazei* Murrill, popularmente conhecido como “Cogumelo do Sol”, em função dos efeitos benéficos que lhe é creditado na prevenção de câncer.

O estudo analisou os efeitos da ingestão do *A. blazei*, no parênquima pulmonar de ratos *Wistar* submetidos a estímulo carcinógeno induzido pela nitrosamina 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1 butanona NNK, potente carcinogênico pulmonar sistêmico em roedores. Foi preparado extrato aquoso de *A. blazei* nas doses de 14,3 mg e 42,9 mg administrado por gavagem durante 22 semanas juntamente com a NNK administrada via subcutânea na dose de 1,5 mg de NNK/Kg de peso corporal do animal durante 20 semanas. Foram formados seis grupos experimentais: Grupo Controle (GC); Grupo Cogumelo do Sol nas doses de 14,3 mg e 42,9 mg por gavagem e injeção de óleo de milho subcutânea (CSOL 14,3 e CSOL 42,9); Grupo Nitrosamina (GN) com injeção de NNK subcutânea e salina por gavagem; Grupo Nitrosamina com Cogumelo do Sol nas doses de 14,3 e 42,9 mg (NSOL 14,3 e NSOL 42,9).

Os animais foram submetidos à tomografia computadorizada (TC) para monitoramento do surgimento de possíveis tumores, foi analisado também peso corporal, consumo de ração ao longo de todo o experimento e realizada a composição centesimal do *A. blazei* Murrill. Ao final do experimento os animais foram sacrificados e foram analisados: hemograma completo, hepatograma, colesterol, triglicerídeo, análise macroscópica e microscópica do pulmão e a análise de curtose da curva do histograma fornecido pelo software BEBÚI utilizado no estudo através da imagem pulmonar da TC.

Como conclusão foi verificado que a substância NNK na dose utilizada neste experimento não foi capaz de desenvolver uma neoplasia pulmonar nos animais estudados no período do experimento; no presente modelo experimental as diferenças encontradas nas análises histopatológicas e na análise da curtose mostram que a dose de cogumelo do sol de 14,3 mg se mostrou mais eficaz contra as inflamações e surgimento de opacidades se comparada à dose de 42,9 mg.

Palavras-Chave: *Agaricus blazei* Murrill, nitrosamina, beta-glucana, carcinogênese, inflamação pulmonar.

ABSTRACT

The mushrooms have been used for many years as food for its nutritional value and/or as a therapeutic agent. One of the most studied fungus is currently the *Agaricus blazei* Murrill, popularly Known as “Cogumelo do Sol”, for its beneficial credited in the prevention of cancer.

This study examined the effects of ingestion of *A. blazei* in the lung parenchyma of wistar rats subjected to stimulus-induced carcinogen 4 - (metilnitrosamina) -1 - (3-pyridyl) -1 butanone NNK, a potent systemic lung carcinogen in rodents. Was prepared aqueous extract of *A. blazei* in doses of 14,3 mg and 42,9 mg administered by gavage during 22 weeks together with NNK administered subcutaneously at a dose of 1,5 mg NNK/Kg body weight of the animal during 20 weeks. Were formed six groups: Control Group (CG); Mushroom Group at doses of 14,3 mg and 42,9 mg by gavage and injection of corn oil subcutaneously (CSOL 14.3 and 42.9); Group Nitrosamine (GN) with subcutaneous injection of NNK and saline by gavage; Group Nitrosamine + Mushroom at doses of 14,3 mg and 42,9 mg (NSOL 14.3 and NSOL 42.9).

The animals were submitted to Computed Tomography (CT) to monitor the possibility of development of lung tumors. Was also examined body weight and food intake throughout the experiment. At the end of 22 weeks, the experiment lasted for over four months for observation of development or growth of tumors via CT. After this period the animals were sacrificed and analyzed: complete blood count, hepatogram, cholesterol, triglycerides, macroscopic and microscopic analysis of lung and kurtosis of the histogram curve supplied by the *software* used in the study called BEBÚI through the lung CT image.

In conclusion it was found that NNK dose used on this study was not able to development a lung cancer in animals studied during the experiment.

On this experimental model the differences found in histological analysis and the analysis of kurtosis shows that the dose of *A. blazei* of 14,3 mg was more effective against inflammation and the appearance of opacities compared to the dose of 42,9 mg.

Key-words: *Agaricus blazei* Murrill, nitrosamine, beta-glucans, carcinogenesis, lung inflammation.

1- INTRODUÇÃO

Os cogumelos há muitos anos vêm sendo utilizados na alimentação por seus valores nutricionais e/ou como agente terapêutico [1,2]. Eles fazem parte de um grupo de substâncias consideradas “remédios complementares alternativos”, ou *complimentary alternative medicine* (CAM), usados por muitos pacientes como um tratamento complementar na luta contra o câncer [3-5]. Muitos tratamentos convencionais contra o câncer como cirurgia, radioterapia e quimioterapia, os agentes utilizados atingem não só o tumor como outros órgãos saudáveis comprometendo a qualidade de vida do paciente durante e após o tratamento. Neste contexto, muitos pacientes fazem uso de CAMs para amenizar ou até mesmo diminuir os efeitos colaterais indesejáveis da terapia anti-câncer [3, 6-8].

Um dos fungos mais estudados atualmente é o Cogumelo do Sol (*A.blazei* Murrill) em função dos efeitos benéficos que lhe é creditado na prevenção de câncer e/ou como adjuvante no tratamento de quimioterapia após a remoção de um tumor maligno [2]. O Cogumelo do Sol foi descoberto pelo pesquisador Takatoshi Furumoto em 1960, que enviou amostras do cogumelo ao Japão em 1965 para maiores investigações. Então o cogumelo foi identificado como *Agaricus blazei* Murrill (ABM) pelo botânico belga Heinemann em 1967 [9].

O Cogumelo do Sol, além de ser creditado como benéfico no tratamento do câncer, tem sido tradicionalmente aceito no combate ao estresse físico e mental, estimulação do sistema imune, melhora da diabetes, redução do colesterol, melhora de problemas circulatórios e digestivos [9]. Muitas destas tradições e créditos ao seu benefício são

geralmente divulgadas em veículos da mídia com fins comerciais que, no entanto, não foram clinicamente provados cientificamente para serem usadas em pacientes [10].

O uso de extrato de Cogumelo do Sol com o propósito de ajudar na terapia do câncer e outras doenças é considerado um tratamento medicinal alternativo que não deve ser utilizado isoladamente ou substituir os tratamentos convencionais.

Depois das doenças cardiovasculares, o câncer é a segunda principal causa de morte nos países desenvolvidos e também no Brasil [12, 13]. Dentre as diversas localizações do câncer, excluindo-se o de pele, a pulmonar é uma das mais comuns [11]. O tabaco constitui-se na principal causa de morte possível de prevenção para o câncer de pulmão. Estima-se mundialmente que 500 milhões de óbitos ocorrerão, pelo uso do tabaco, com o câncer sendo uma das principais causas de morte [14, 15].

Por outro lado, o extrato do Cogumelo do Sol tem sido também referido como benéfico em doenças inflamatórias induzidas por diferentes agentes [112], mas a sua atuação ao nível pulmonar permanece ainda pouco estudada.

A justificativa deste trabalho deve-se à necessidade de aprimorar os conhecimentos científicos acerca das características do Cogumelo do Sol, observando, em especial, a sua influência nas alterações pulmonares relacionadas ao uso do carcinógeno químico 4-(metilnitrosamina)-1-(3-pyridil)-1 butanona (NNK).

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Cogumelo do Sol

O cogumelo *Agaricus blazei* Murrill, conhecido como “Cogumelo do Sol”, é nativo do Brasil, especialmente em regiões do sul do estado de São Paulo. Ele é tradicionalmente utilizado como alimento para prevenção de câncer, diabetes, hiperlipidemia, arteriosclerose e hepatite crônica [16].

O *Agaricus blazei* é utilizado por aproximadamente 300 a 500 mil pessoas para prevenção de câncer e/ou como adjuvante no tratamento quimioterápico após a remoção de um tumor maligno. A ingestão de seu extrato aquoso é recomendado, aproximadamente, na quantidade de 3 a 5 gramas três vezes ao dia [16]. O extrato aquoso quente do *Agaricus blazei*, demonstrou potente atividade antitumoral em camundongos inoculados com sarcoma 180; e a substância responsável pela propriedade antitumoral foi identificada como a β (1-6) glucana [17, 18]. O mecanismo do efeito antitumor parece estar envolvido com o aumento da resposta imunológica [16, 19].

Kasai *et al* em 2004, demonstraram que concentrações ótimas do extrato de *Agaricus blazei* para indução de IL-12 varia de 170 a 510 ng/ml, enquanto concentrações mais altas demonstraram baixos níveis de indução da IL-12 [20]. A IL-12 é uma citocina inflamatória conhecida por ativar a citotoxicidade de macrófagos alveolares, linfócitos e células *natural killer* e é um fator crítico na resposta imune contra patógenos e tumores assim como potente promotor de respostas tipo 1 (respostas Th 1) [21, 22, 23]. As respostas Th1 regulam a proliferação, produção de interferon gama e a atividade citotóxica de células T e células *natural killer* (NK) [24]. Desta

maneira, a IL-12 exerce uma resposta biológica múltipla que inclui a ativação de células CD8+, diferenciação de linfócitos T CD4, indução de respostas tipo 1 por linfócitos T helper e ativação de células *natural killer* (NK). A IL-12 também demonstrou potente atividade antitumoral em uma variedade de modelos tumorais murínicos. Um estudo realizado por Smyth *et al*, 2000, demonstrou *in vivo* que a capacidade antitumor da IL-12 é mediada via células NK e/ou células NKT [25]. Camundongos tratados com extrato de cogumelo do sol, na dose de 300 mg/dia/animal em um volume de 0,5 ml/dia/animal durante cinco dias consecutivos mostraram altos níveis de atividade das células natural killer (NK) do baço comparados com o grupo controle do estudo [26].

2.1.1- β -glucana

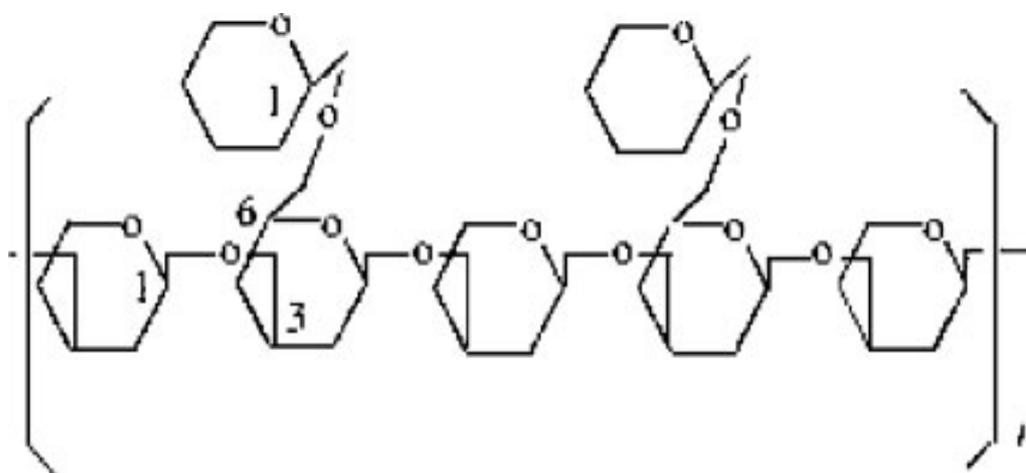


Figura 1: Estrutura ou “centro funcional” da 1-6 β glucana com as cadeias 1-3.

Adaptado de Firenzuolli, 2008 [27].

A β -glucana faz parte de um grupo heterogêneo de polímeros de glicose e é uma das substâncias mais importantes do conteúdo dessa biomassa. Este polissacarídeo faz parte da estrutura de paredes celulares de fungos, cogumelos, plantas e algumas bactérias [28]. Ela consiste de uma

estrutura de β (1,3) ligada a unidades β - D - glucopiranosil ligadas a cadeias laterais β (1,6) [29]. Essas diferenças estruturais da molécula exercem uma série de atividades diferentes. Por exemplo, diferenças no tamanho do polissacarídeo, no tamanho de suas cadeias e nas ramificações, podem resultar em diferentes materiais extraídos de seus extratos. In vitro, estudos sugerem que moléculas de β -glucana de grande peso molecular atuam diretamente sobre a atividade de leucócitos, estimulando a fagocitose e a atividade antimicrobiana. β -glucanas de baixo peso molecular ou intermediários possuem atividade biológica in vivo, mas seus efeitos celulares não são completamente claros. E β -glucanas de muito baixo peso molecular são geralmente consideradas inativas [29-32].

A β -glucana já foi identificada como sendo um carboidrato de alto peso molecular que está presente na fase de formação do corpo do cogumelo, também denominado de frutificação desse fungo [33, 34]. Também é conhecida como um poderoso antagonista de tumores benignos e malignos, redutor de colesterol e triglicérido e normalizador dos níveis de glicose sanguíneos [29].

A β -glucana é um típico modificador de resposta biológica com atividade imunomoduladora. Geralmente, imunomoduladores podem agir positiva ou negativamente. Há alguns polissacarídeos que agem somente como imunoestimulantes, mas o mais efetivo e estudado são as glucanas [35, 36].

Em vertebrados, o reconhecimento da β -glucana parece ocorrer exclusivamente através de receptores celulares de superfície [37]. Atividade de receptores para β -glucana tem sido relatada em uma variedade de leucócitos, incluindo macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e células *natural killer* (NK), assim como células não-imunes incluindo células endoteliais, células epiteliais alveolares e fibroblastos [38].

O mais conhecido efeito da β -glucana é o aumento da fagocitose pelos fagócitos: granulócitos, monócitos, macrófagos e células dendríticas [36, 39]. Os macrófagos, considerados as células básicas de defesa efetivas contra bactérias, vírus, parasitas e tumores celulares, promovem as respostas mais importantes. Os macrófagos são constituintes não específicos da resposta inata e não adaptativa do sistema imunológico. Essa imunidade inata é baseada em receptores não clonais que reconhecem certas moléculas de superfície que são invadidas por microrganismos [36].

O primeiro passo da interação β -glucana – macrófagos é a ligação à receptores de superfície presentes na superfície celular dos macrófagos. Para o reconhecimento da β -glucana, os macrófagos mantêm uma série de receptores à disposição como receptores *tolllike 2*, dectina-1, receptor do complemento 3 (CR3), lactosilceramida entre outros. Entretanto, a interação entre a β -glucana e o receptor do complemento 3 (CR3) é a que demonstra ser mais efetiva [36]. O CR3 é altamente expresso em neutrófilos, monócitos e células NK. A lactosilceramida está presente na membrana plasmática de várias células e foi identificada como um receptor de β -glucana em análises bioquímicas de interação entre a β -glucana e leucócitos humanos isolados de componentes de membrana [40, 29]. Foi sugerido que a interação da β -glucana com este receptor pode induzir aumento de neutrófilos oxidativos e funções antimicrobianas, embora essas atividades ainda não são totalmente esclarecidas [29]. A dectina-1 é expressa em linhagens celulares de monócitos, macrófagos e neutrófilos. Células dendríticas e uma subpopulação de células T também expressam a dectina-1, mas em níveis mais baixos [36, 41].

A secreção de citocinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α) e mediadores inflamatórios como óxido nítrico, peróxido de hidrogênio são outros efeitos dos macrófagos. Entretanto, o polissacarídeo β -glucana

estimula uma dose-dependente no aumento de óxido nítrico e TNF- α , mas não na produção dos intermediários de oxigênio reativo de macrófagos peritoneais [42]. Isso sugere a habilidade da β -glucana na regulação de moléculas de superfície nos processos envolvendo antígenos, atuando na atividade de células T contra células malignas *in vivo*. Esses resultados indicam que a β -glucana atua com efeito imunomodulador e aumento da atividade antitumoral de macrófagos peritoneais [29].

In vitro, estudos já demonstraram atividade antimicrobiana por monócitos e neutrófilos em voluntários sadios onde a β -glucana foi ofertada.

Apesar de ser utilizada como substância imunomoduladora presente na natureza e usada como medicamento e/ou alimento, o desenvolvimento de pesquisas envolvendo a β -glucana precisa ser conduzido para aferir mais profundamente as respostas bioterápicas e o entendimento de seus mecanismos moleculares [33, 34, 38, 43-45].

2.2- Dados Epidemiológicos do Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo humano ou animal, dividindo-se rapidamente. Essas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação das chamadas neoplasias malignas [11].

Existem variadas causas para o desenvolvimento de câncer, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios do ambiente social e cultural. As causas internas são na

maioria geneticamente pré-determinadas e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas [11].

Em 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representou 13% de todas as mortes. Do total de óbitos por câncer ocorridos em 2005, mais de 70% ocorreram em países de média e baixa renda [46]. Estima-se que, em 2020, o número de casos novos anuais seja da ordem de 15 milhões, sendo que cerca de 60% desses novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento [47].

Segundo recente relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS (*World Cancer Report 2008*), o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. Estimou-se que, no ano de 2008, ocorreriam cerca de 12 milhões de casos novos de câncer e 7 milhões de óbitos. O contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento, afetará de forma significativa o impacto do câncer no mundo. Esse impacto recairá principalmente sobre os países de médio e baixo desenvolvimento. A IARC/OMS estimou que, em 2008, metade dos casos novos e cerca de dois terços dos óbitos por câncer ocorrerão nessas localidades [48].

No Brasil, as estimativas para o ano de 2008, válidas também para o ano de 2009, tinham apontado a ocorrência de 466.730 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes presentes foram e continuam sendo os cânceres de próstata e de pulmão, no sexo masculino, e os cânceres de mama e de colo do útero, no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo [47]. Para o ano de 2010, válidas também para o ano de 2011, apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada

para a América Latina. Em 2010, são esperados 236.240 casos novos para o sexo masculino e 253.030 para sexo feminino. Estima-se que o câncer de pele do tipo não-melanoma (114 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (52 mil), mama feminina (49 mil), cólon e reto (28 mil), pulmão (28 mil), estômago (21 mil) e colo do útero (18 mil) [48].

2.3- Câncer de Pulmão

O câncer de pulmão é um dos mais comuns de todos os tumores malignos. Ele permanece como uma doença altamente letal, sendo sua sobrevida média cumulativa total em cinco anos entre 13 e 21% em países desenvolvidos e entre 7 e 10% nos países em desenvolvimento [47].

O câncer de pulmão em homens é o segundo mais freqüente nas regiões Sul (36/100.000), Sudeste (22/100.000) e Centro-Oeste (16/100.000) [47]. O número de casos novos de câncer de pulmão estimados para o Brasil, no ano de 2010, é de 17.800 entre homens e de 9.830 nas mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 18 casos novos a cada 100 mil homens e de 10 para cada 100 mil mulheres [48].

O tabagismo é o principal fator de risco de câncer pulmonar, sendo responsável por 90% dos casos. Quanto à prevenção do câncer pulmonar, a forma mais eficaz é a primária, ou seja, o combate ao tabagismo, onde é possível conseguir redução do número de casos (incidência) e de mortalidade [11].

Dentro da terapêutica do câncer de pulmão é possível observar muitos trabalhos relacionados à prevenção do crescimento tumoral pulmonar utilizando determinados agentes terapêuticos [2, 4, 9]. Tem havido grande preocupação para desenvolver tratamentos quimiopreventivos que possam atuar inibindo a progressão de iniciação de

células e lesões pré-malignas no câncer de pulmão [49]. Embora o principal foco das pesquisas com quimiopreventivos seja direcionado a agentes inibidores da ativação metabólica genotóxica de produtos derivados do tabaco, alguns desses agentes podem modular sinais de regulação de crescimento celular. A função desses mecanismos sinalizadores é altamente relacionada ao tipo celular específico, com mecanismos de inibição de crescimento de um tipo particular de células, enquanto estimulam o crescimento de outros tipos celulares [50, 51]. Ou seja, agentes que podem prevenir o crescimento de um tipo de câncer, também poderiam, em tese, promover o desenvolvimento de outro.

Estudos relacionados a quimiopreventivos de câncer de pulmão são contraditórios, com relatos positivos para animais de laboratórios e negativos para humanos [52-55]. Uma razão para essa disparidade pode ser que em humanos o câncer de pulmão geralmente inclui quatro tipos diferentes de linhagens celulares: carcinoma de pequenas células, adenocarcinoma, carcinoma de grandes células e epidermóide; enquanto que tumores pulmonares em ratos e camundongos geralmente são representados por adenomas e/ou adenocarcinomas derivados de células alveolares tipo II [56, 57].

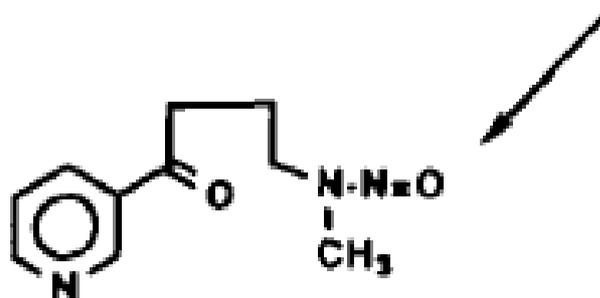
O efeito quimiopreventivo das substâncias testadas (chá verde, chá preto, cafeína, antocianinas) ocorrido no tumor desses modelos animais pode representar um efeito seletivo do câncer pulmonar nas linhagens alveolares de células tipo II. Outra possibilidade seria a existência de múltiplas vias moleculares para o desenvolvimento neoplásico, devido ao grande número de carcinógenos presentes na fumaça do tabaco, o que poderia resultar em uma grande diversidade de mutações. Desta forma, um agente quimiopreventivo teria alta probabilidade de ser ineficaz a menos que tenha influência em todos os mecanismos de carcinogênese. Sem

dúvida alguma, a melhor forma de prevenir o câncer de pulmão continua sendo a abolição do tabagismo, ou seja, a fonte carcinogênica.

2.4- Nitrosaminas

As nitrosaminas específicas do tabaco são um grupo de compostos carcinogênicos encontrados nos produtos do tabaco. As nitrosaminas são consideradas carcinogênicos fortes, ou seja, que causam tumores em animais de laboratório em pequenas doses (geralmente microgramas ou miligramas) [58].

2.4.1- 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1 butanona (NNK)



4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone
(NNK)

Figura 2: Estrutura da 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1 butanona (NNK).

A 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1 butanona (NNK), é um composto carcinogênico pulmonar sistêmico em roedores, que induz tumores pulmonares independente de sua via de administração [59].

O potencial da NNK como carcinógeno é particularmente grande no rato, onde doses totais abaixo de 6 mg/kg^{-1} (e $1,8 \text{ mg/kg}^{-1}$ quando considerado como parte de uma dose-resposta) induziu a incidência de tumores de pulmão significativamente [60]. Isto é comparado a uma dose estimada de NNK de $1,1 \text{ mg/kg}^{-1}$ em quarenta anos de fumo [59].

Metabólitos de DNA derivados da NNK estão presentes em níveis altos no tecido pulmonar de pacientes com câncer de pulmão se comparados a pacientes controle [61], e metabólitos da NNK estão presentes na urina de pessoas que fazem uso de produtos do tabaco ou que são expostas a ambientes onde estão presentes a fumaça do tabaco [62].

A NNK produz primariamente adenocarcinomas em roedores [59, 63]. Em hamsters da raça Syrian golden, uma única dose de 1 mg de NNK foi suficiente para induzir tumores do trato respiratório em 6 de 20 animais [64]. Um estudo comparativo sobre a NNK e outro carcinógeno conhecido como N-nitrosodimetilamina (NDMA) em ratos demonstrou que a NNK foi mais potente do que a NDMA [65]. Cada carcinógeno foi administrado com injeção subcutânea em ratos da raça F344, totalizando uma dosagem de $0,33 \text{ mmol/kg}$. Ambas nitrosaminas induziram tumores no fígado, mas somente a NNK originou uma incidência significativa de tumores de pulmão (13/27 ratos ou 48%) [65].

Hecht e colaboradores, 1984 [66], padronizaram uma metodologia e dosagem para administração da NNK, que é muito utilizada por outros autores [67, 5, 68] comprovando o surgimento de tumor pulmonar nos animais estudados. A dose preconizada é de $1,5 \text{ mg}$ de NNK/kg de peso corporal do animal, três vezes por semana, via subcutânea, durante 20 semanas.

A tabela a seguir mostra a organoespecificidade da NNK no pulmão de diferentes roedores.

Tabela 1: Organoespecificidade da NNK no pulmão de roedores. Adaptado de Hecht e Hoffmann, 1988 [69].

Espécie/raça	Via de administração	Dose total (mmol/kg)	Percentual de animais com tumores pulmonares
Rato F344	Subcutânea	9	77
		3	67
		1	57
		0.3	48
Hamster Syrian Golden	Subcutânea	8	80
		0.04	20
	Swab oral	13	87
Camundongo SENCAR	Tópico	1	63
Camundongo A/J	Intraperitoneal	4	100

Estudos recentes indicam, que efeitos deletérios adicionais da nicotina e nitrosaminas específicas do tabaco como a NNK são mediadas por receptores celulares de superfície (fig. 3). A nicotina e a NNK se ligam a receptores nicotínicos-acetilcolínicos e outros receptores, promovendo a ativação da proteína quinase B, proteína quinase A e outros fatores [70, 71]. A consequência disso é a diminuição da apoptose, aumento da formação de metabólitos do ácido araquidônico, aumento da proliferação e transformação celular.

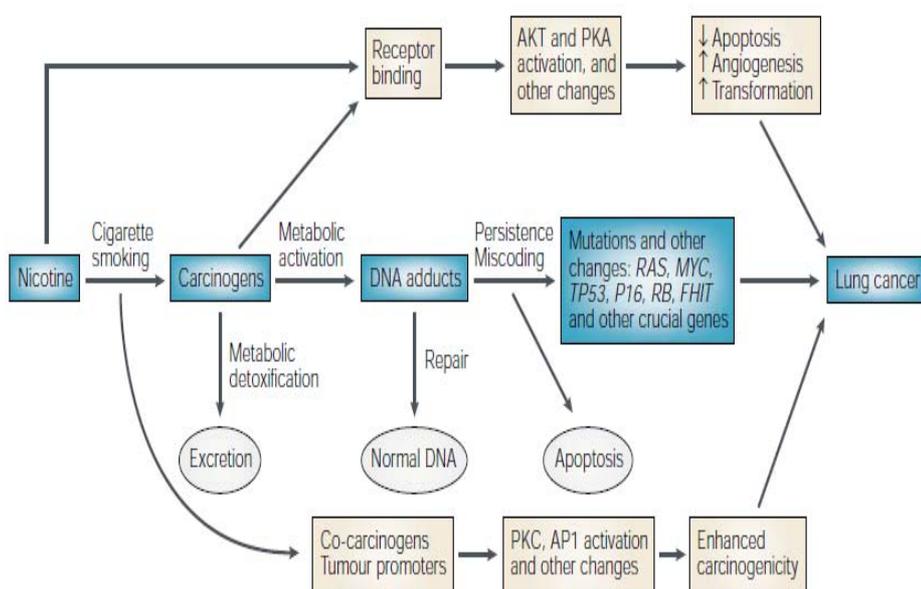


Figura 3: Mecanismos de atuação da nicotina e NNK nas células: A nicotina e outros carcinógenos presentes na fumaça do cigarro são metabolicamente ativados em seus intermediários que irão reagir com o DNA formando produtos conhecidos como metabólitos de DNA (*DNA adducts*). Parte deste DNA pode ser reparado e parte persiste como metabólitos gerando mutações em alguns genes de DNA que se persistirem poderão se transformar em câncer de pulmão ou a célula reage promovendo a apoptose. Os carcinógenos também se ligam a receptores de membrana reagindo com a proteína quinase B, proteína quinase A e outros fatores gerando diminuição da apoptose, aumento da angiogênese e aumento da transformação celular. A fumaça do cigarro contendo milhares de carcinógenos atuam como co-carcinógenos promotores de tumor, reagindo com a proteína quinase C, ativador de proteína 1 e outros fatores

umentando a carcinogênese e promovendo o desenvolvimento de câncer de pulmão. Adaptado de Hecth SS, 2003 [58].

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo é analisar os efeitos da ingestão do cogumelo do sol (*Agaricus blazei*, Murill) no parênquima pulmonar de ratos submetidos a estímulo carcinogênico induzido pela nitrosamina NNK.

3.2- Objetivos Específicos

- Determinar o conteúdo de macro e micronutrientes da biomassa de cogumelo do sol.
- Avaliar as alterações no parênquima pulmonar de ratos Wistar submetidos às injeções subcutâneas de NNK.
- Avaliar comparativamente os efeitos gerados pelo consumo de extrato de cogumelo do sol no parênquima pulmonar dos animais que receberam cogumelo do sol, cogumelo do sol com nitrosamina e animais controle.
- Avaliar comparativamente os efeitos gerados pela administração do carcinogênico NNK com ou sem cogumelo do sol nas imagens obtidas pela tomografia computadorizada e nas imagens diretas visualizadas pela macroscopia e microscopia.

4.0- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Matéria-prima

O cogumelo do sol foi adquirido previamente desidratado diretamente de produtores localizados no estado de São Paulo e imediatamente transportado por via aérea em caixas térmicas para o Laboratório de Bromatologia e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), onde foi moído para transformar-se em farinha e iniciar o preparo do extrato hidrossolúvel e as determinações de macro e micronutrientes.



Figura 4: Ilustração do Cogumelo do Sol desidratado

4.2- Animais experimentais e biotério

Foram usados *Rattus norvegicus*, variedade *Albinus Rodentia mammalia* da raça *Wistar*, machos, para cada grupo experimental com idade média entre 21-25 dias (recém desmamados), provenientes do Laboratório de Cirurgia Experimental (LCE) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Os animais pertenciam à classificação sanitária convencional. O Biotério é dotado de sistema de exaustão e fotoperiodismo (ciclo claro e escuro de 12 em 12 horas), climatizado, sendo a temperatura constante de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, gaioleiros com gaiolas de polipropileno e bancadas para o manuseio de animais.

4.3- Manuseio das amostras

As amostras desidratadas foram transformadas em farinha com auxílio de um moinho de facas, acondicionadas em sacos de polietileno com alta proteção à umidade, fechadas à vácuo, armazenadas sob refrigeração à temperatura média entre 5 a 7°C até o momento de sua utilização para determinação do conteúdo orgânico e mineral e preparação do extrato aquoso.

As análises de composição de alimentos realizada na farinha de Cogumelo do Sol, assim como o preparo do extrato hidrossolúvel do

cogumelo foram realizadas no Laboratório de Bromatologia e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

4.4- Determinações na farinha

Foram realizadas as seguintes determinações:

4.4.1- Umidade

A umidade corresponde à perda de peso pelo alimento quando aquecido em condições na qual a água é removida. Essa fração engloba todos os componentes voláteis à temperatura de 105°C. É uma técnica gravimétrica que emprega calor e constou de pesagens de alíquotas com aproximadamente 5g em pesa-filtros tarados, aquecido em estufa a $105 \pm 5^\circ\text{C}$ até a obtenção de peso constante [72]. A determinação foi feita em triplicata.

4.4.2- Proteínas totais

A maioria dos métodos adotados para determinação da fração protéica em alimentos se baseia na dosagem quantitativa do nitrogênio total, já que todas as proteínas contêm na sua estrutura o elemento N. Portanto, é necessário que se faça a conversão do nitrogênio protéico em proteína, utilizando o fator de conversão que pode ser determinado em função do percentual de Nitrogênio protéico na amostra.

Para determinação do nitrogênio total (Nt), alíquotas com aproximadamente 50 mg foram submetidas às etapas de digestão,

destilação e titulação de acordo com os procedimentos sugeridos pelo método de Kjeldahl [73]. O teor de proteína foi calculado por meio da multiplicação do teor de nitrogênio total pelo fator de conversão universal no valor de 6,25. Os resultados foram expressos em g de proteína total ou bruta/100g de amostra.

4.4.3- Lipídeos totais

A fração lipídica inclui todas as substâncias solúveis em solventes orgânicos, principalmente os óleos e as gorduras. A extração deve ser realizada em extrator contínuo, sendo o mais comum, o extrator de Soxhlet utilizado nessa determinação. Cerca de 5g de amostra foi transferida para um cartucho de celulose e colocada no extrator, tendo como solvente o éter de petróleo [72], sendo a micela recolhida em balão de Soxhlet. Após separação total do solvente, o teor de lipídio foi quantificado por gravimetria. Os resultados foram expressos em g de lipídeos totais/100g de amostra e as determinações realizadas em duplicata.

4.4.4- Cinzas

A fração cinza ou resíduo mineral fixo corresponde o conteúdo minero da amostra, sendo obtido por aquecimento à temperatura de 500 a 550°C em mufla. Foi determinada com prévia carbonização de alíquotas com cerca de 2g até a formação de carvão e posterior incineração em mufla a 550°C até eliminação completa do carvão [72]. A análise foi feita em triplicata.

4.4.5- Minerais

A determinação do perfil de minerais foi realizada no laboratório de espectrofotometria do Instituto de Química da Pontifícia Universidade Católica (PUC) do Rio de Janeiro. As amostras secas, pesando cerca de 5g, foram calcinadas em mufla a 550°C, por período mínimo de 2 horas e as cinzas obtidas dissolvidas em HCL 2mol/L. Analisadas por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado no modo semiquantitativo, utilizando o equipamento ELAN 6000 da Perkin Elmer-Sciex [73] e os resultados convertidos para base úmida e expressos em mg do mineral correspondente/100g de amostra.

4.4.6- Fibra insolúvel

A concentração de fibra insolúvel foi determinada usando as amostras desengorduradas. Em refrigerante de refluxo, as amostras foram submetidas a tratamento com ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,255N e hidróxido de sódio ($NaOH$) 0,313 N, intercalados por lavagem com água quente e filtragem. Após atingir a neutralidade, o resíduo foi lavado com uma mistura de álcool etílico e éter etílico na proporção de 50:20 (álcool/éter), mantido em estufa a 105°C por uma hora e pesado. Os resultados foram expressos em g/100g de matéria integral [72].

4.4.7- Carboidratos

Esta fração corresponde o somatório dos mono, di e polissacarídeos, sendo excluída a porção de fibra alimentar. Foi calculada pela diferença entre 100 e o somatório da concentração de umidade, lipídios, proteínas, cinzas e fibra alimentar.

4.4.8- Calorias

Foram calculadas a partir dos valores de proteínas, carboidratos e lipídios e seus respectivos fatores de conversão, 4, 4 e 9, respectivamente, cujos resultados serão expressos Kcal (quilocaloria)/100g [74].

4.5- Extrato do *Agaricus blazei* Murrill

A dose do extrato de cogumelo do sol estabelecida foi baseada e adaptada ao rato através da dose comumente utilizada por um indivíduo pesando aproximadamente 70 kg que ingere 1 litro do extrato de cogumelo do sol por dia [75].

Para o preparo do extrato hidrossolúvel de cogumelo do sol na concentração de 14,3 mg/mL, eram pesados aproximadamente 10 g da farinha de cogumelo do sol e adicionava-se em 500 mL de água destilada previamente aquecida até próximo a ebulição, fazendo-se uma infusão por 30 minutos. O extrato obtido era filtrado e armazenado sob refrigeração a temperatura de 10°C. Para o extrato hidrossolúvel de cogumelo do sol na concentração de 42,9 mg, pesava-se 20 g da farinha de cogumelo do sol e procedia-se da mesma maneira.

4.6- Preparo e diluição da 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1 butanona (NNK)

A NNK, foi adquirida através da LabEx, Inc. sendo armazenada sob congelamento a -20°C. Para o procedimento todas as operações relacionadas as diluição eram realizadas dentro da capela e seguia-se o protocolo:

1. A capela de fluxo laminar era protegida com camada de jornal, seguida de papel alumínio e outra camada de jornal;
2. A balança era colocada dentro da capela e toda área em torno do prato era protegida com papel alumínio e o prato com filme plástico;

3. Isopor com gelo era disponibilizado para guardar a nitrosamina durante o manuseio;
4. Pesava-se 120 ml de óleo de milho;
5. Pesava-se 90 mg de NNK;
6. Diluíam-se os 90 mg de NNK em 120 ml de óleo de milho em agitador por aproximadamente 20 minutos;
7. Esta solução era guardada sob proteção contra luz e armazenada sob refrigeração.

4.7- Composição dos grupos

Foram formados dois blocos experimentais: um que recebia o cogumelo do sol (n= 40) e o outro que não recebia o referido cogumelo (n=40). Destes dois blocos originaram-se seis grupos experimentais, com animais, machos, sorteados aleatoriamente e constituídos de:

Grupo 1- grupo controle sem NNK (GC) - (com injeção subcutânea de óleo de milho com mesmo volume da solução de NNK do grupo 2 + solução salina por gavagem) n = 20.

Grupo 2- grupo nitrosamina – NNK (GN) - (com injeção subcutânea de NNK na dose de 1,5 mg do cancerígeno por kg de peso do animal + solução salina por gavagem) n= 20.

Grupo 3 – grupo controle com cogumelo do sol (CSOL 14,3) – (com injeção subcutânea de óleo de milho com mesmo volume da injeção de NNK do grupo 2 + gavagem com cogumelo do sol na dose de 14,3 mg) n = 10.

Grupo 4 – grupo controle com cogumelo do sol (CSOL 42,9) – (com injeção subcutânea de óleo de milho com mesmo volume da injeção de NNK do grupo 2 + gavagem com cogumelo do sol na dose de 42,9 mg) n = 10.

Grupo 5- grupo cogumelo do sol com NNK (NSOL 14,3) - (com injeção subcutânea de NNK na dose de 1,5 mg do cancerígeno por kg de peso do animal + gavagem com cogumelo do sol na dose de 14,3 mg) n = 10.

Grupo 6- grupo cogumelo do sol com NNK (NSOL 42,9) - (com injeção subcutânea de NNK na dose de 1,5 mg do cancerígeno por kg de peso do animal + gavagem com cogumelo do sol na dose de 42,9 mg) n = 10.

A água e ração foram oferecidos *ad libitum*, o peso dos animais foi registrado a cada sete dias e o consumo de ração registrados a cada dois dias.

O diagrama a seguir sumariza os grupos experimentais:

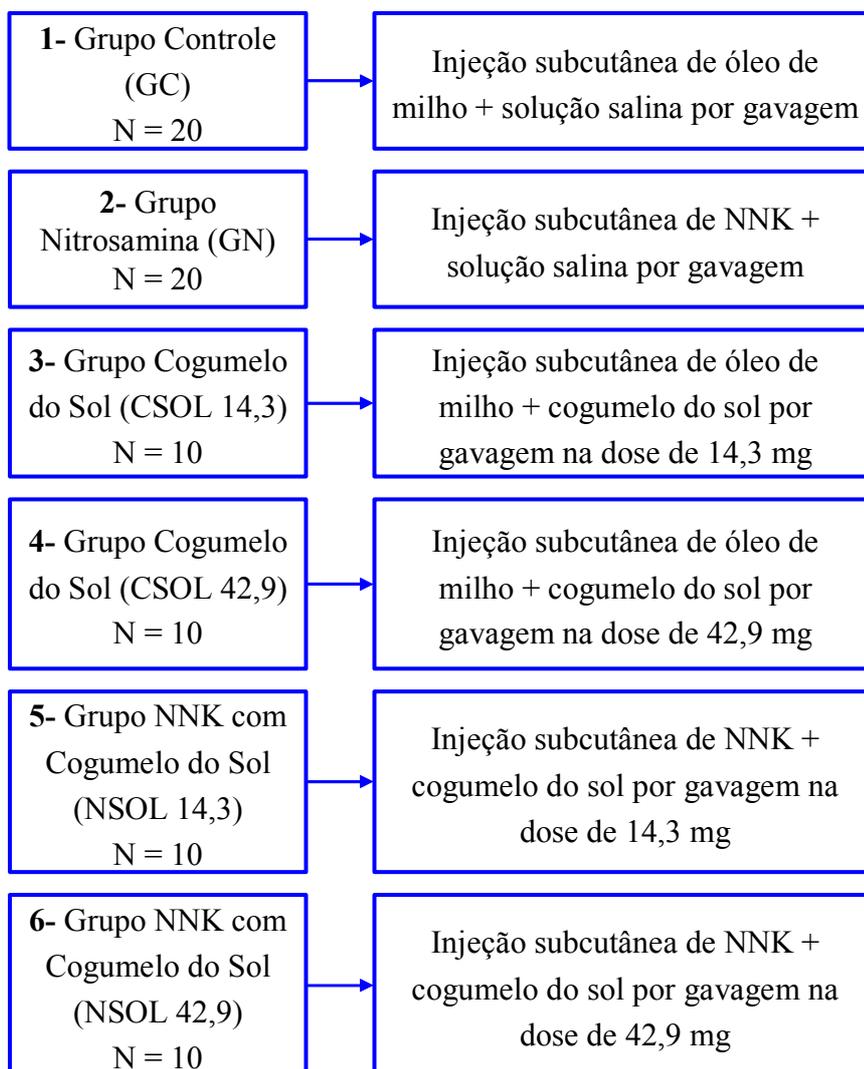


Figura 5: Diagrama dos grupos experimentais.

4.8- Aquisição e Análise de Imagens pulmonares

As imagens pulmonares foram obtidas e analisadas através da tomografia computadorizada, realizada em todos os grupos, com o auxílio do *software* BEBÚI [76-80]. O BEBÚI é um protótipo de um Sistema Computadorizado de Auxílio Diagnóstico (*Computer Aided Diagnosis - CAD*), que vem sendo desenvolvido a partir de uma parceria entre a Disciplina de Cirurgia Torácica da Faculdade de Ciências Médicas (UERJ), o Departamento de Engenharia Elétrica da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), o Instituto de Matemática Pura e Aplicada (IMPA) e o Laboratório Tecgraf da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-RJ). O sistema foi implementado em C++, utilizando as bibliotecas IUP e CD TECGRAF para interface e desenho, respectivamente, desenvolvidas pelo Laboratório Tecgraf e compilado com o visual C++, da Microsoft [81, 82]. Após a segmentação semi-automática das imagens do pulmão direito e esquerdo (excluindo-se a caixa torácica e mediastino) foram analisados os dados da curtose do histograma da imagem, disponibilizados automaticamente pelo *software*.

4.9- Rações utilizadas

Utilizou-se as rações comerciais Guabinutrilabor e Labina.

ANEXO 1.

4.10- Nitrosamina

O estímulo carcinogênico no parênquima pulmonar nos ratos foi realizado de acordo com a metodologia preconizada por Hetcht *et al*, 1984

[66]. A substância utilizada foi a 4- (metilnitrosamino)-1- (3 piridil) 1 butanona (NNK).

A droga foi injetada nos animais experimentais nas doses de 1,5mg/kg de peso corporal, três vezes por semana, via subcutânea, durante 20 semanas. As figuras a seguir demonstram o procedimento de aplicação da NNK via subcutânea nos animais experimentais.



Figura 6: NNK diluída em óleo de milho em seringa descartável para aplicação nos animais experimentais.



Figura 7: Manuseio do animal para receber a injeção do cancerígeno NNK.



Figura 8: Rato Wistar recebendo o cancerígeno NNK via subcutânea.

4.11- A administração de Cogumelo do sol e Nitrosamina 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1 butanona (NNK)

A administração do cogumelo do sol seguiu o seguinte protocolo: Durante uma semana foi oferecido o extrato hidrossolúvel preparado à base de biomassa de cogumelo do sol por gavagem. Após essa semana, iniciou-se a administração via subcutânea da NNK na dose de 1,5 mg/kg de peso corporal dos animais, três vezes por semana, juntamente com a oferta de extrato de cogumelo. Após 20 semanas, a administração da NNK foi interrompida e por mais uma semana ainda ofereceu-se o extrato de cogumelo do sol.

Ao final de 22 semanas, foi realizada coleta de sangue por punção cardíaca, eutanásia por câmara de gás e a retirada dos pulmões.

4.12- Modificações no protocolo experimental:

O protocolo experimental foi modificado, ou seja, seguiu-se o planejamento de prevenção e indução de tumor durante as 22 semanas. Após este período foi decidido estender o tempo de sobrevivência dos grupos por mais quatro meses para aumentar a probabilidade de encontrar lesões pulmonares nas tomografias realizadas mês a mês. O experimento era considerado encerrado (*end-point*) com a eutanásia do animal por câmara de gás na 42^a semana quando realizava-se a coleta de sangue por punção cardíaca e a retirada dos pulmões ou, alternativamente, com a morte espontânea do animal antes deste período.

4.13- Métodos de avaliação corporal

Foi analisada a evolução ponderal média de cada grupo para verificar se houve diferença de peso no grupo que recebeu o cancerígeno do grupo controle. Também foi feita a análise de consumo de ração de cada grupo

para verificar se houve diferença no consumo de ração no grupo que recebeu o cancerígeno do grupo controle.

4.14- Tomografias

As tomografias foram realizadas com intervalos de aproximadamente um mês. Todos os grupos foram submetidos ao exame no tomógrafo helicoidal modelo GE High Speed.

Os animais eram anestesiados e posicionados no tomógrafo, sobre uma prancha de isopor para evitar contato direto dos mesmos com a mesa do tomógrafo e presos com esparadrapo para evitar possível queda (figura 8). As imagens eram transferidas para um CD e analisadas quanto ao surgimento ou não de condensações utilizando o *software* BEBÚI. O diagnóstico das imagens pulmonares foi realizado pelo mesmo médico radiologista em todos os grupos sem que o profissional soubesse o tratamento ofertado aos animais para evitar diagnóstico falso positivo ou vício no resultado.

Foram analisados separadamente o pulmão direito e o pulmão esquerdo segmentados de forma semi-automática fatia a fatia. Uma vez realizada as segmentações de cada fatia, o *software* fornecia automaticamente o histograma da fatia e o histograma global (somatório de todas as fatias), com as respectivas médias, desvio padrão, coeficiente de variação, energia, contraste, simetria, mínimo e máximo coeficiente de variação, densidade, frequência, número de voxels e curtose (Figura 9 e 10).



Figura 9: Animais anestesiados e dispostos na mesa do tomógrafo.

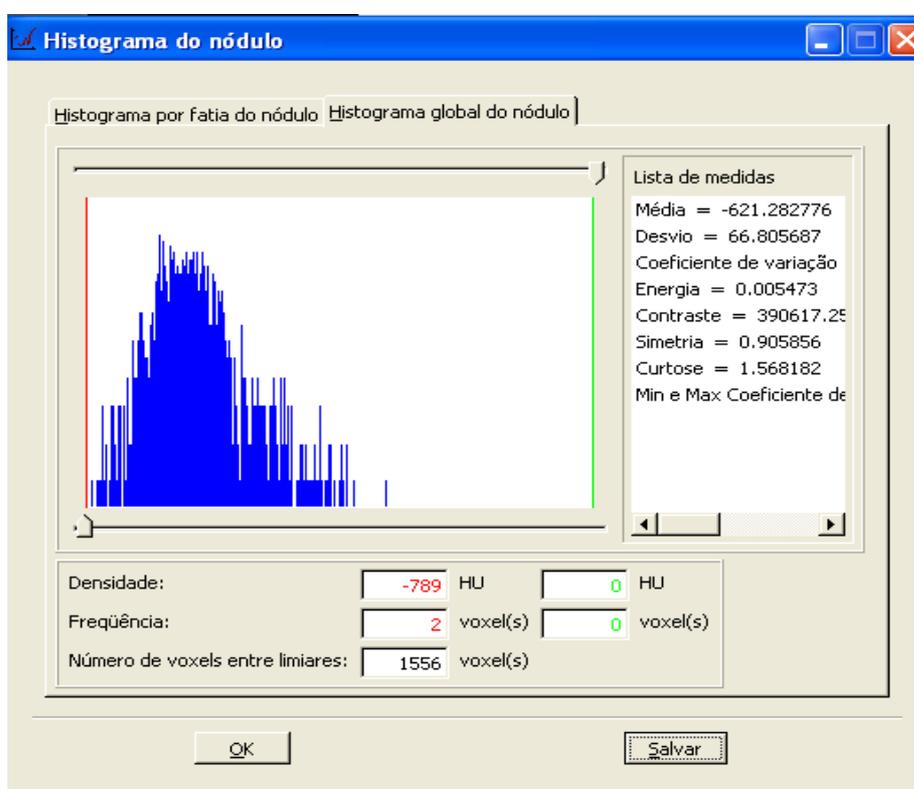


Figura 10: Dados presentes no histograma global do nódulo fornecido pelo BEBÚI.

A seguir são apresentadas algumas imagens das tomografias computadorizadas dos diferentes grupos, mostrando a condição experimental para obtenção do corte tomográfico na janela pulmonar e mediastinal para posterior diagnóstico.

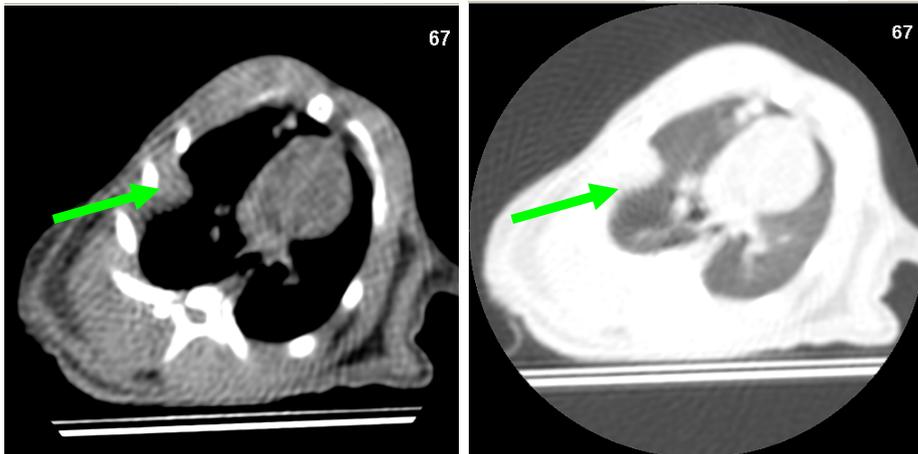


Figura 11: Imagem de tomografia computadorizada de animal do grupo nitrosamina (GN), série 24 (23/10/08) mostrando a consolidação periférica adjacente à parede torácica.

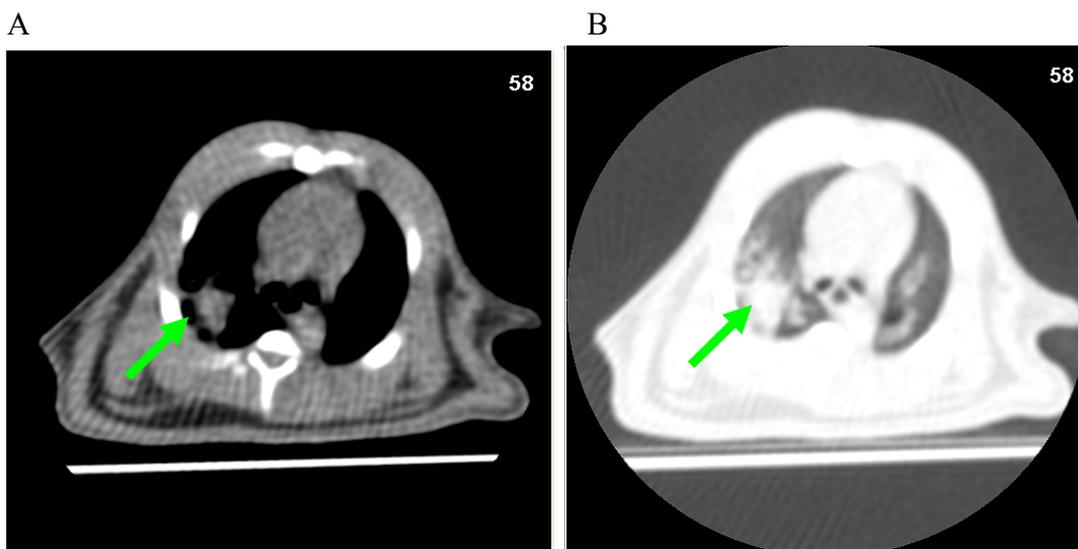


Figura 12: Imagem de tomografia computadorizada de animal do grupo nitrosamina (GN), série 21 (23/10/08) apresentando opacidade em base pulmonar direita na janela mediastinal (A) e pulmonar (B).

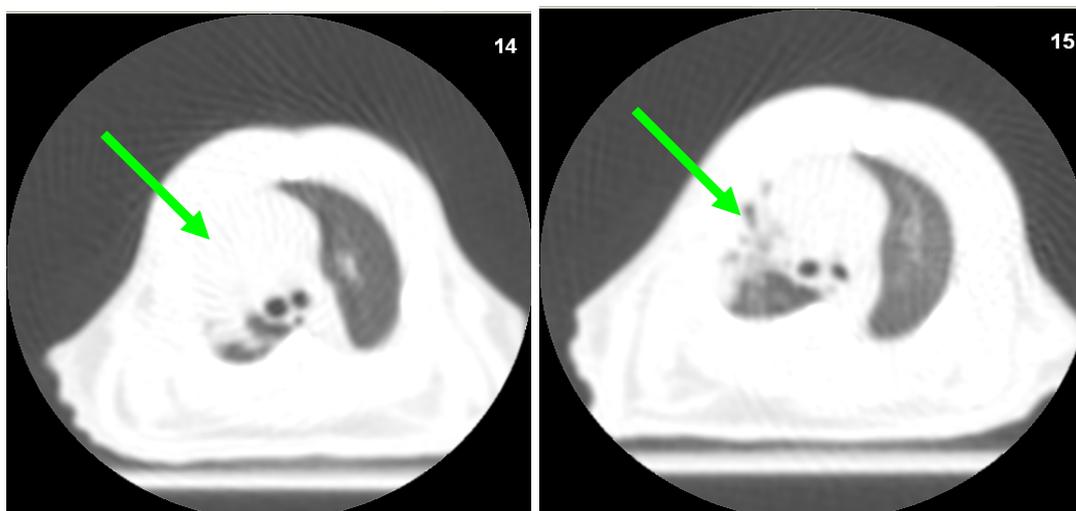


Figura 13: Condensação em ápice direito de animal do grupo NNK + cogumelo do sol na dose de 14,3 mg (GNSOL 14,3). Os cortes são subseqüentes.

4.15- Segmentação Semi-automática e Curtose.

A segmentação semi-automática pulmonar foi realizada através da ferramenta borracha do software BEBÚI com a qual eram delimitados, corte a corte, os limites pulmonares. A figura 14 ilustra o aspecto na interface da segmentação realizada e o histograma obtido.

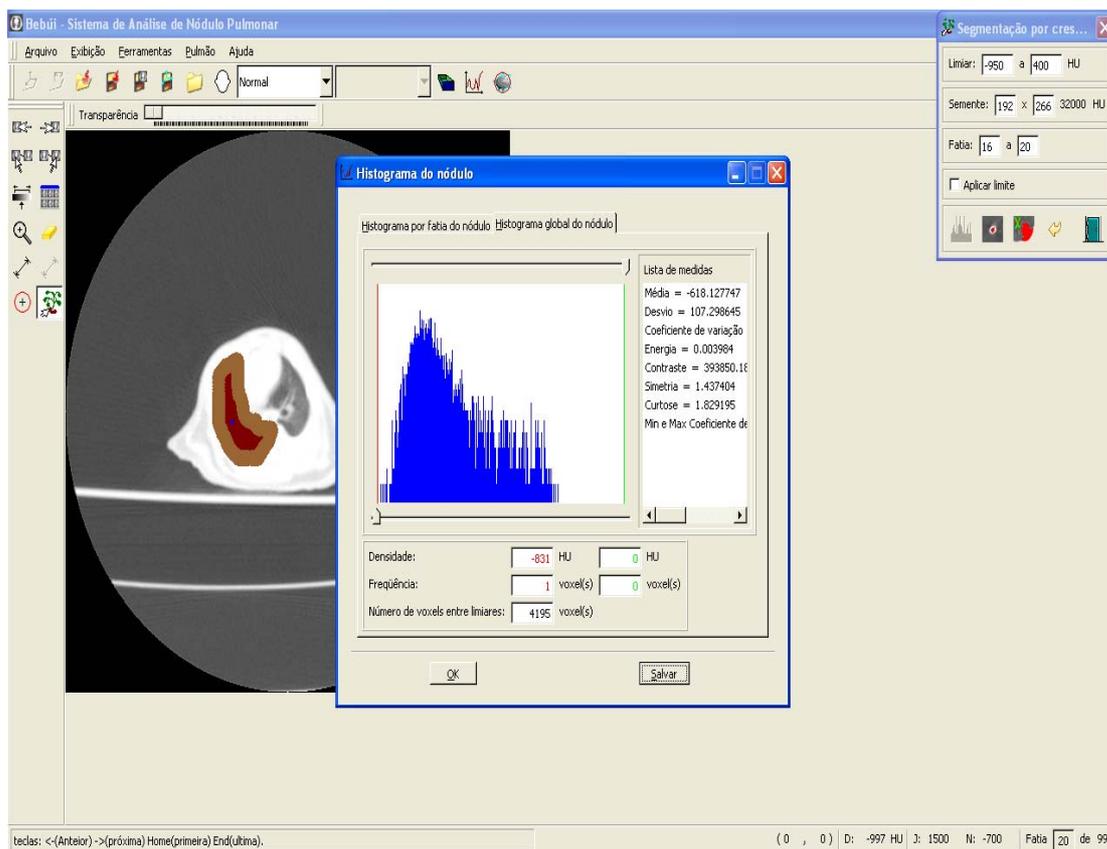


Figura 14: Página inicial do *software* BEBÚI. Histograma de animal do grupo controle (GC) de imagem pulmonar no início do experimento. Pulmão direito. Notar a distribuição unimodal com predomínio de densidades negativas características do parênquima pulmonar. A margem em marrom corresponde à ferramenta borracha do BEBÚI que delimita o tecido pulmonar, segmentado de forma semi-automática.

No presente trabalho optou-se por utilizar a curtose (*kurtosis*) [83, 84], uma medida de dispersão que caracteriza o “achatamento” da curva da função de distribuição. É definida matematicamente por:

$$kurtosis = \frac{\sum_{i=1}^N (Y_i - \bar{Y})^4}{(N-1)s^4} - 3$$

Sendo: “N” o total do número de voxels, “Y” a média aritmética das Unidades Hounsfield e “s” o desvio padrão da média.

A curtose é uma medida representada na curva do histograma para verificar se o gráfico apresenta um pico ou não de distribuição normal. Conjunto de dados com alta curtose tende a ter um pico distinto perto da média com diminuição bastante rápida e caudas pesadas. Conjunto de dados com curtose baixa tendem a ter uma curva de aparência achatada em vez de uma curva apiculada.

4.16- Métodos de Avaliação Laboratorial

As avaliações laboratoriais foram realizadas no Laboratório Central do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

- Coleta sanguínea [85]: As amostras sanguíneas (5 ml) foram coletadas da veia cava inferior dos animais com seringas de 5 ml, utilizando agulhas de calibre 25x7 mm. O sangue coletado (aproximadamente 2,5 ml) foi colocado em tubos de ensaio sem a presença de anticoagulantes e centrifugado a 2.500 rpm por 10 minutos em centrífuga (Konelab). Para as determinações bioquímicas específicas foi utilizada a centrífuga (Olympus modelo AV-400). Os outros 2,5 ml de sangue coletado foram colocados em tubos de ensaio com a presença do anticoagulante EDTA para análise de hemograma completo.

Foram realizados o hemograma completo e um hepatograma simplificado. A composição deste hepatograma foram as análises enzimáticas de fosfatase alcalina, gama glutamiltransferase (GGT), aspartato aminotransferase (APAT ou TGO) e alanina aminotransferase (ALAT ou TGP).

A avaliação do hemograma foi determinada pelo kit comercial (Sysmex), por meio do equipamento (Sysmex – modelo XT 1800). Todos os procedimentos adotados para análise de hemograma obedeceram às recomendações preconizadas pelos seus respectivos catálogos (Sysmex). A

avaliação bioquímica foi determinada pelos kits comerciais (Wiener), por meio de um Espectrofotômetro (Konelab), e por meio de um Espectrofotômetro (Olympus – modelo AV 400). Foram realizados testes para determinar as concentrações plasmáticas da Fosfatase Alcalina, Gama Glutamil Transferase, Alanina Aminotransferase (TGP), Aspartato aminotransferase (TGO).

4.17- Métodos de Avaliação Morfológica

Os métodos foram a avaliação macroscópica e histopatológica. Na avaliação macroscópica, foi feita análise do órgão logo após o sacrifício dos animais, onde as observações e características analisadas foram feitas a olho nu.

- Coleta tecidual [86]: Cada pulmão era removido e imediatamente limpo em salina 0,9% para melhor análise macroscópica e observação quanto à presença de abscessos, mudanças de coloração, aspecto e textura do órgão, áreas de hepatização, presença de pus e presença de nódulos. Após as observações das características descritas, era depositado em solução de formol a 10% para evitar a autólise tecidual. Foi coletado pelo menos um fragmento de cada lobo pulmonar para representar o órgão.

4.17.1- Avaliação Histomorfológica Pulmonar

Após as etapas de retirada dos fragmentos teciduais e fixação em formol a 10%, como descrito anteriormente, os fragmentos foram submetidos às técnicas habituais de inclusão em parafina, microtomia e coloração pelas técnicas de hematoxilina-eosina, tricrômico de Masson e Perls. As imagens analisadas foram fotografadas através de um sistema de microfotografia.

A intensidade das alterações observadas foram graduadas, por patologistas, de zero a quatro cruces ++++ definidas como: zero (sem alterações); uma cruz (alteração leve); duas cruces (alteração moderada); três cruces (alteração acentuada) e quatro cruces (alteração muito acentuada). De cada órgão coletado foram preparadas duas lâminas e ambas foram analisadas ao microscópio como um todo, ou seja, sem separação por campos. Todos os fragmentos do órgão na lâmina eram observados e classificados de acordo com as alterações em cruces e características obtidas. As características observadas foram: congestão; edema; exsudato alveolar; exsudato bronquiolar; bronquiectasia; abscesso; metaplasia do epitélio brônquico e fibrose.

Por ser a classificação em cruces uma análise subjetiva, o diagnóstico das alterações foi feito por dois patologistas separadamente. Ao final das análises, as informações eram cruzadas para a confirmação definitiva do diagnóstico histopatológico. Tanto os patologistas como o radiologista que analisou as imagens pulmonares faziam suas observações de forma cega.

4.18- Metodologia Estatística

Os resultados de macro e micronutrientes foram analisados através do programa Excel do *software da Microsoft Office 2000*.

Os resultados obtidos de evolução de peso corporal, consumo de ração, hemograma, hepatograma, colesterol e triglicérido, foram submetidos à Análise de Variância *One way - ANOVA* para avaliação múltipla das variáveis ao nível de $P \leq 0,05$. Quando detectada a significância estatística dessa variável, era aplicado o pós teste de Bonferroni para comparação dos múltiplos grupos. Para a comparação dos grupos controle com seus respectivos grupos experimentais foi aplicado o

teste de Mann-Whitney ao nível de $p < 0,05$. Para a análise microscópica foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal – Wallis (KW) com confirmação pelo teste de Mann - Whitney ao nível de $p \leq 0,05$ para todas as características observadas. Para a análise da curtose foi utilizado o teste de Mann-Whitney para comparação dos grupos controle com seus respectivos grupos experimentais ao nível de $p < 0,05$. Em todas as análises foi empregado o *software Graph Pad Prisma*, versão 4.0, ano 2008.

5- RESULTADOS

As análises de macro e micronutrientes realizadas do Cogumelo do sol, assim como a comparação dos resultados achados com o rótulo e com os resultados analisados por Ying Liu *et al*, 2008, [68] estão demonstrados na tabela abaixo.

Tabela 02: Comparação da Composição centesimal e composição de minerais do Cogumelo do Sol

Composição Nutricional (100 g)	Análises atuais	Rótulo do fornecedor	Ying Liu <i>et al</i> , 2008
Umidade	12,1378 ± 0,5864	5,86 g	-
Proteínas totais	29,7675 ± 0,3675	35 g	38,50 g
Lipídeos totais	0,8645 ± 0,6164	2 g	2,60 g
Cinzas	2,2952 ± 0,5581	-	-
Fibras insolúveis	8,0481 ± 0,0474	10 g	20,60 g
Carboidratos	46,8869	-	27,70 g
Ferro (mg/100g)	8,3 mg	8 mg	10,10 mg
Cálcio (mg/100g)	43,2 mg	96 mg	22,50 mg
fósforo (mg/100g)	1032,6 mg	3480 mg	952 mg
Valor calórico (kcal/100g)	314,39 Kcal	340 Kcal	288 Kcal

Em relação ao protocolo estabelecido, um animal do grupo CSOL 14,3 morreu no segundo mês do experimento com o diagnóstico clínico-veterinário de meningoencefalite, considerada uma causa não-relacionada à experimentação e foi excluído. Dez animais morreram durante o ato anestésico para a realização da Tomografia Computadorizada, sendo seis imediatamente antes do sacrifício programado. Nove ratos morreram espontaneamente antes de completar todo o protocolo experimental, sendo a necropsia realizada em sete. Em apenas um caso do grupo CSOL 42,9 o animal morreu sem diagnóstico no segundo mês do experimento e seus dados não puderam ser incluídos.

Das 19 mortes ocorridas antes da data prevista para o sacrifício, nove ocorreram no bloco experimental que não utilizou o cogumelo do sol e dez no bloco que utilizou o referido cogumelo. Das nove mortes espontâneas do bloco que não fez uso de Cogumelo do Sol, oito ocorreram no grupo que recebeu a NNK (88,8%) sendo quatro relacionadas ao ato anestésico para a TC do terceiro mês. O único animal que morreu sem ter recebido a NNK teve o óbito relacionado à execução da TC do último mês.

Das dez mortes ocorridas no bloco que fez uso do Cogumelo do Sol, quatro (40%) ocorreram nos grupos que receberam o Cogumelo do Sol na dose de 14,3 mg e seis (60%) no grupo da dose de 42,9 mg. Quando se considerou o uso concomitante de NNK neste último bloco, seis estavam recebendo o cancerígeno (60%) e quatro não estavam recebendo (40%). Dois dos seis animais que estavam recebendo a NNK faleceram na última TC e todos os quatro que não receberam a NNK morreram na realização da última tomografia computadorizada. Portanto, de um total de 19 mortes antes da data programada para o sacrifício, 14 ocorreram em animais que estavam recebendo NNK (73,6%).

Em 78/80 animais, foi possível analisar o parênquima pulmonar pela radiologia e/ou histopatologia e os dados foram incluídos nas tabelas.

A seguir estão descritas, por itens, as variáveis analisadas e o respectivo tratamento estatístico.

5.1- Gráficos de Evolução de Peso Corporal de Cada Grupo Experimental.

Nas figuras 15, 16 e 17 observa-se que houve uma evolução de peso corporal ao longo de todo o período de experimento nos grupos controle sem NNK, controle com cogumelo do sol na dose de 14,3 mg e controle

com cogumelo do sol na dose de 42,9 mg. Nas figuras 16 e 17 no período de aproximadamente 298º dia houve um aumento repentino no peso seguido da diminuição do peso na mesma proporção, mas os grupos mantiveram a evolução de peso corporal.

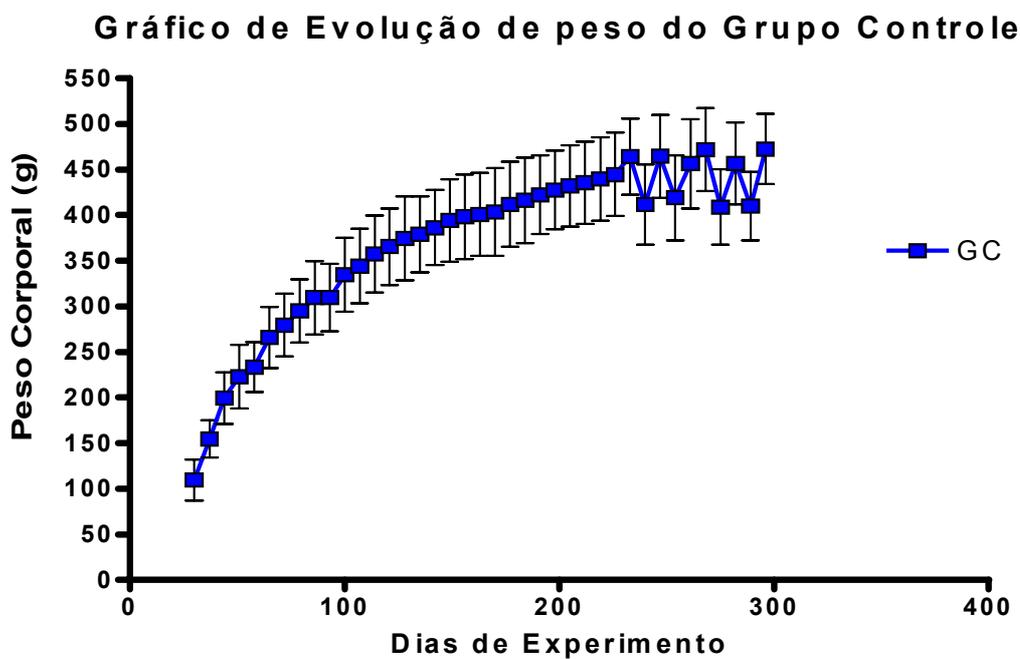


Figura 15: Gráfico de evolução de peso corporal do grupo controle (GC), mostrando a evolução ponderal ao longo de todo o experimento.

Gráfico de Evolução de Peso do Grupo Controle com Cogumelo do sol na dose de 14,3 mg

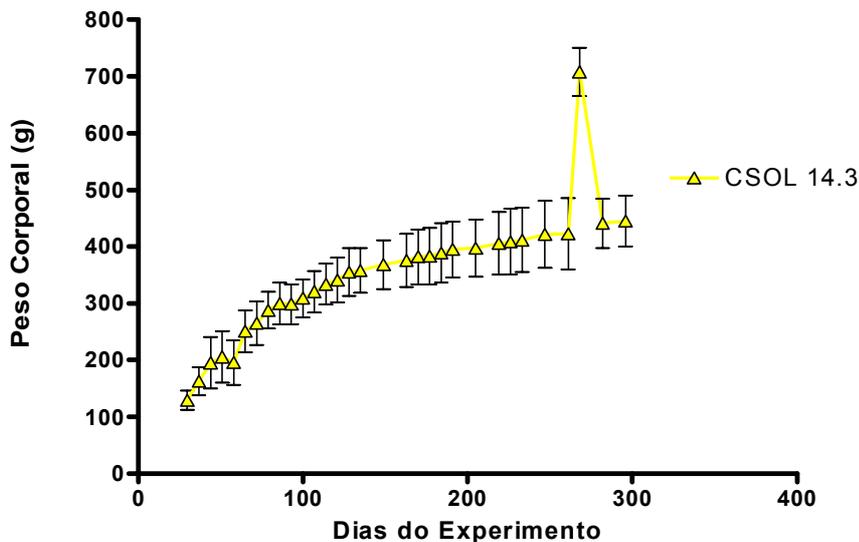


Figura 16: Gráfico de evolução de peso corporal do grupo controle que recebeu gavagem de Cogumelo do Sol na dose de 14,3 mg (CSOL 14,3). Notar pico de aumento de peso em aproximadamente o 290º dia seguido da perda ponderal, embora cursando continuamente com a evolução de peso corporal.

Gráfico de Evolução de Peso Corporal do Grupo Controle com Cogumelo do sol na dose de 42,9 mg

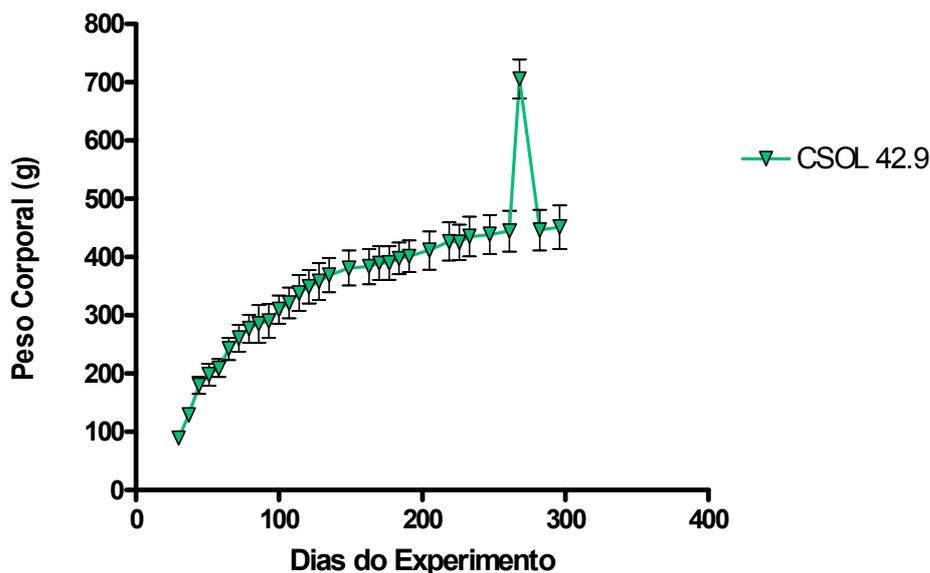


Figura 17: Gráfico de evolução do grupo controle que recebeu gavagem de cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (CSOL 42,9). Notar pico de aumento de peso em aproximadamente 290º seguido da perda ponderal na mesma proporção, embora cursando continuamente com a evolução de peso corporal.

Nas figuras 18, 19, e 20 observa-se que houve um aumento evolutivo de peso corporal ao longo de todo o experimento nos grupos NNK, NNK com cogumelo do sol na dose de 14,3 mg e NNK com cogumelo na dose de 42,9 mg.

Gráfico de Evolução de Peso Corporal do Grupo Nitrosamina - NNK

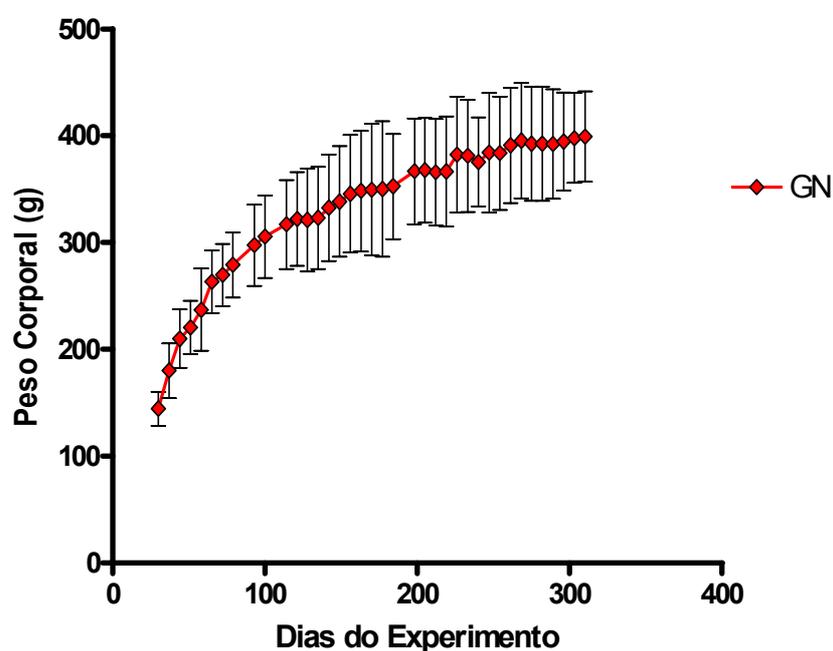


Figura 18: Gráfico de evolução de peso corporal do grupo que recebeu a nitrosamina NNK (GN), mostrando a evolução constante do peso corporal.

Gráfico de Evolução de Peso Corporal do Grupo NNK com Cogumelo do sol na dose de 14,3 mg

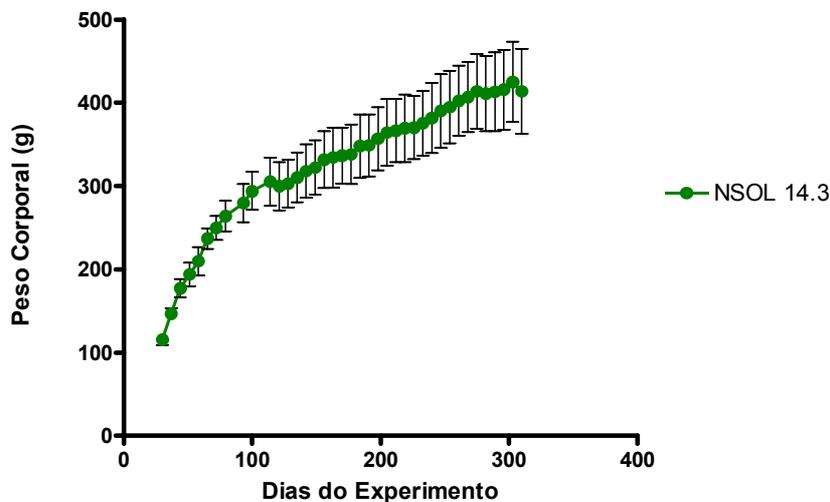


Figura 19: Gráfico de evolução de peso corporal do grupo que recebeu a nitrosamina NNK + cogumelo do sol por gavagem na dose de 14,3 mg (NSOL 14,3), mostrando a evolução constante do peso corporal.

Gráfico de Evolução de Peso Corporal do Grupo NNK com Cogumelo do sol na dose de 42,9 mg

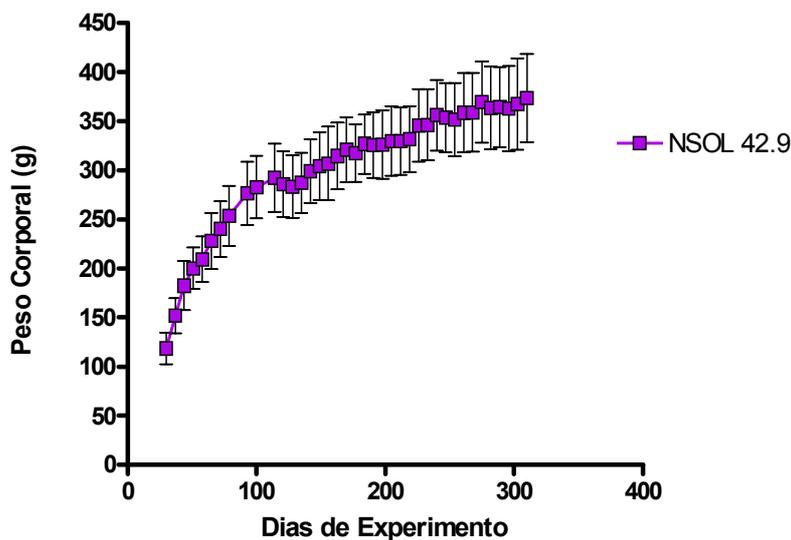


Figura 20: Gráfico de evolução de peso corporal do grupo que recebeu a nitrosamina NNK + cogumelo do sol por gavagem na dose de 42,9 mg (NSOL 42,9), mostrando a evolução constante do peso corporal.

A figura 21 mostra a evolução de peso corporal de todos os grupos do experimento. Verifica-se que os grupos controle tiveram uma evolução maior de peso corporal do que os grupos nitrosamina. Foi observada diferença significativa entre o grupo controle (GC) e o grupo nitrosamina que recebeu o chá de cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (GNSOL 42,9) pela análise de Bonferroni. Já pela análise de Mann Whitney, foi observada diferença significativa entre os grupos controle (GC) e nitrosamina (GN) e entre os grupos controle com cogumelo do sol por gavagem na dose de 42,9 mg (GCSOL 42,9) e o grupo nitrosamina + cogumelo do sol por gavagem na dose de 42,9 mg (NSOL 42,9).

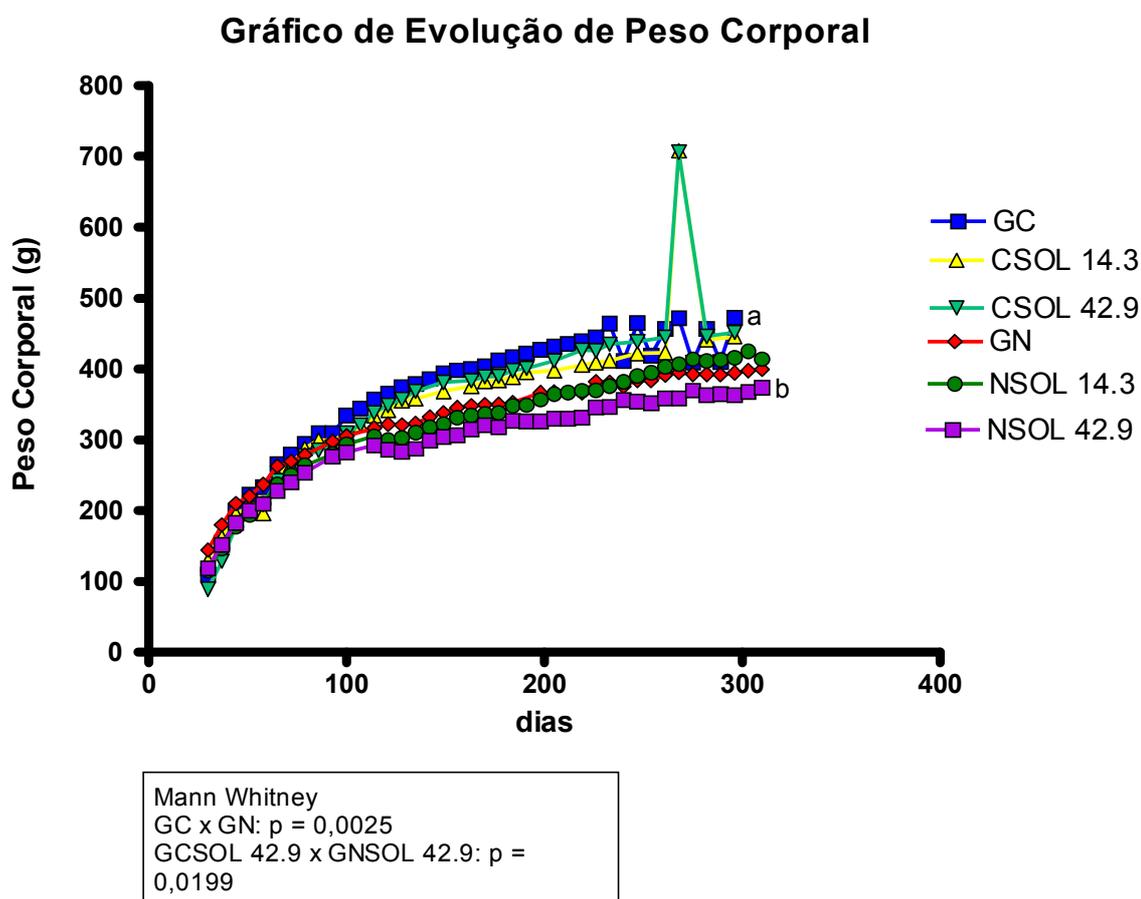


Figura 21: Gráfico de evolução de peso corporal de todos os grupos estudados: Grupo controle (CG); grupo controle com cogumelo do sol por gavagem na dose de 14,3 mg (CSOL 14,3); grupo controle com cogumelo do sol por gavagem na dose de 42,9 mg (CSOL 42,9); grupo nitrosamina (GN); grupo nitrosamina + cogumelo do sol por gavagem na dose de 14,3 mg (NSOL 14,3); grupo nitrosamina + cogumelo do sol por

gavagem na dose de 42,9 mg (NSOL 42,9). Notar pico de aumento e perda na mesma proporção de peso corporal dos grupos CSOL 14,3 e CSOL 42,9.

5.2- Gráficos de Consumo de Ração de Cada Grupo Experimental

Os gráficos de consumo de ração tanto dos grupos controle, como dos grupos nitrosamina apresentaram grande variação ao longo do experimento. Observou-se um comportamento dos animais caracterizado por um grande aumento do consumo de ração, seguido de uma diminuição do consumo na mesma proporção. Essa variação refletiu-se na evolução de peso corporal, pois com o aumento e a diminuição do consumo de ração na mesma proporção todos os grupos mantiveram o crescimento ponderal ao longo do experimento.

Essa variação no consumo de ração nos grupos controle (figuras 22, 23 e 24) refletiu-se mais no início do experimento, até aproximadamente o centésimo dia. Enquanto que nos grupos nitrosamina (figuras 25, 26 e 27), essa variação foi mais evidente a partir do 200º dia.

Gráfico de Consumo de Ração do Grupo Controle

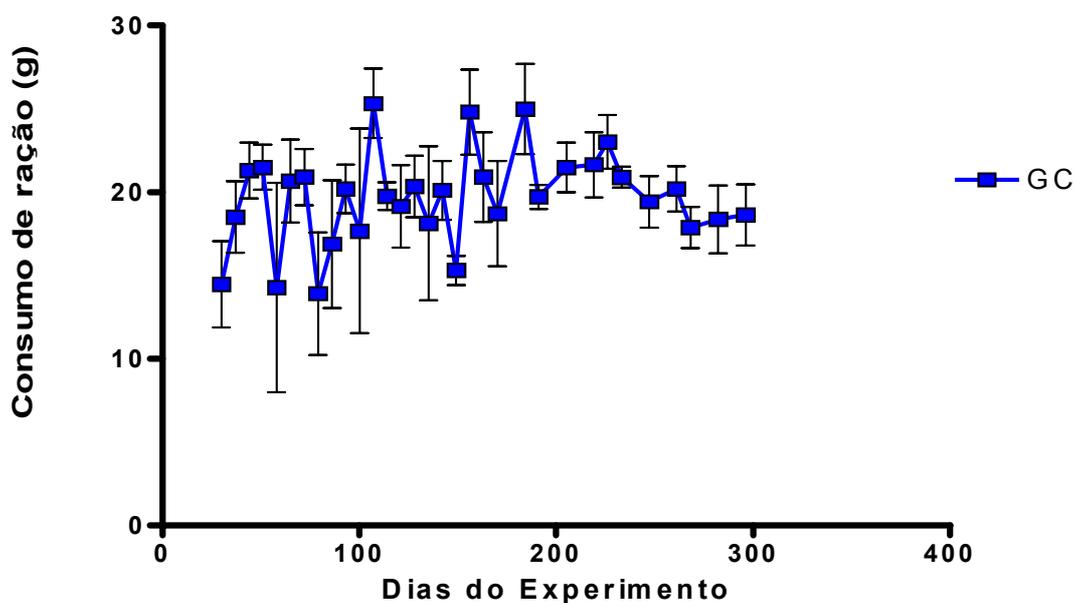


Figura 22: Gráfico do consumo de ração do grupo controle (GC) mostrando a variação no consumo de ração com aumento e diminuição da ingesta na mesma proporção ao longo de todo o experimento.

Gráfico de Consumo de Ração do Grupo Controle com Cogumelo do Sol na dose de 14.3 mg

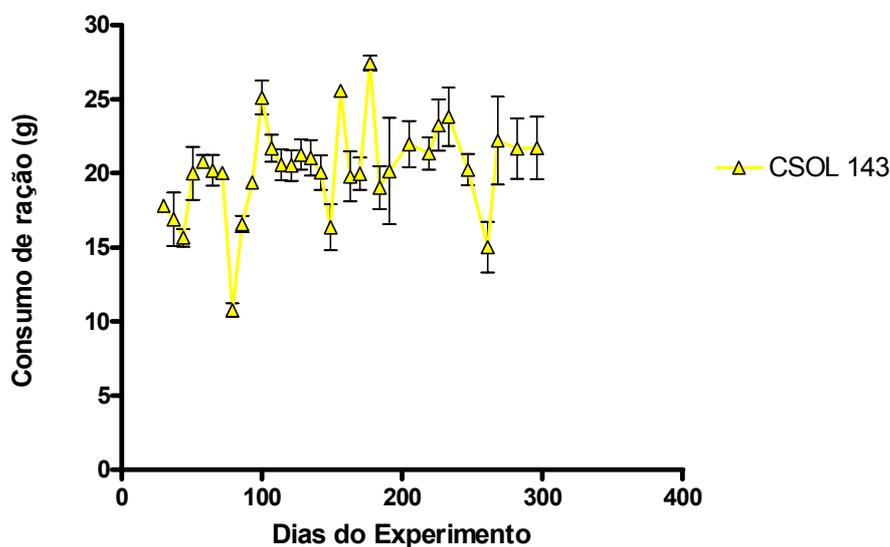


Figura 23: Gráfico de consumo de ração do grupo controle que recebeu cogumelo do sol por gavagem na dose de 14,3 mg (CSOL 14,3), mostrando a variação no consumo de ração com aumento e diminuição da ingesta na mesma proporção ao longo de todo o experimento.

Gráfico de Consumo de Ração do Grupo Controle com Cogumelo do Sol na dose de 42.9 mg

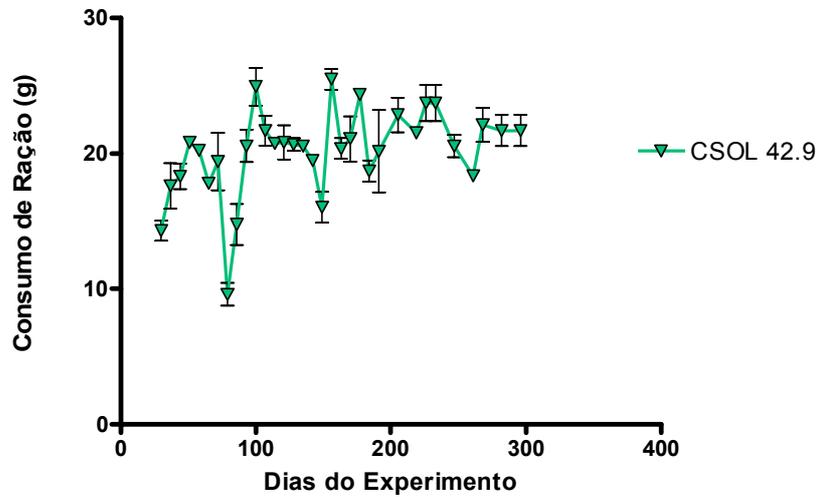


Figura 24: Gráfico de consumo de ração do grupo controle que recebeu cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (CSOL 42,9), notar a variação no consumo de ração com aumento e diminuição da ingesta na mesma proporção ao longo de todo o experimento.

Gráfico de Consumo de Ração do Grupo Nitrosamino - NNK

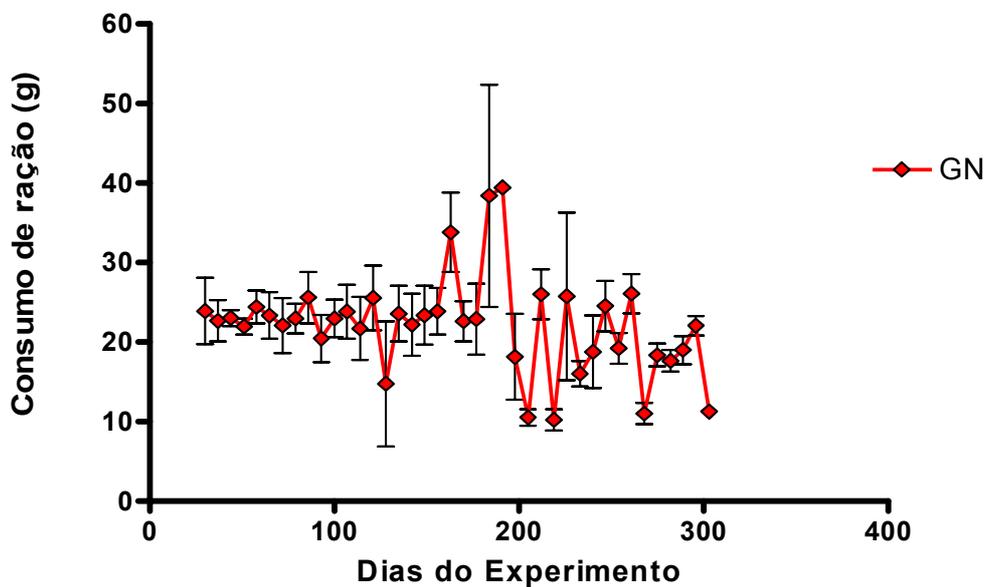


Figura 25: Gráfico do consumo de ração do grupo nitrosamina NNK (GN), mostrando a variação no consumo de ração com aumento e diminuição da ingesta na mesma proporção a partir do 110º dia do experimento.

Gráfico de Consumo de Ração do Grupo NNK com Cogumelo do Sol na dose de 14,3 mg

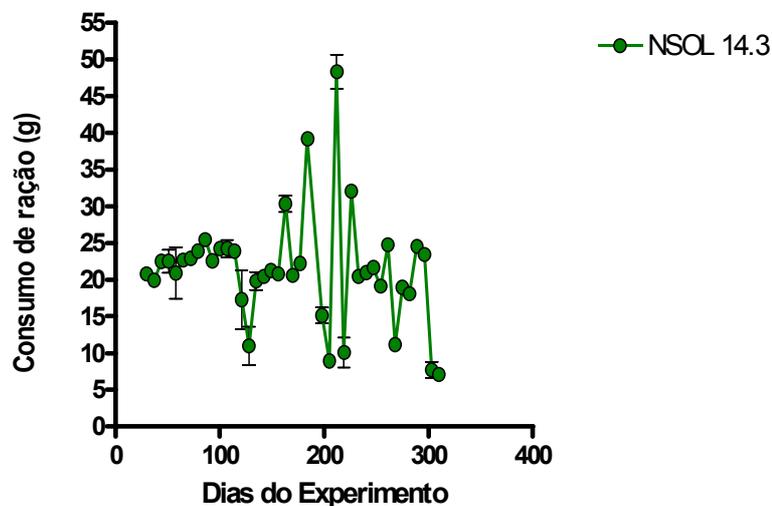


Figura 26: Gráfico do consumo de ração do grupo NNK + cogumelo do sol por gavagem na dose de 14,3 mg (NSOL 14,3), mostrando a variação no consumo de ração com aumento e diminuição da ingesta na mesma proporção a partir do 110º dia do experimento.

Gráfico de Consumo de Ração do Grupo NNK com Cogumelo do Sol na dose de 42,9 mg

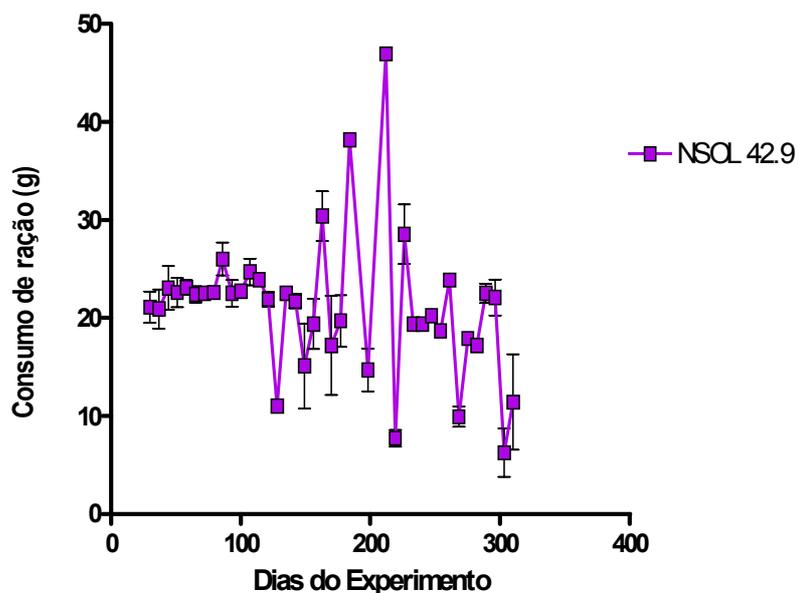


Figura 27: Gráfico do consumo de ração do grupo NNK + cogumelo do sol por gavagem na dose de 42,9 mg (NSOL 42,9), mostrando a variação no consumo de ração

com aumento e diminuição da ingesta na mesma proporção a partir do 110º dia do experimento.

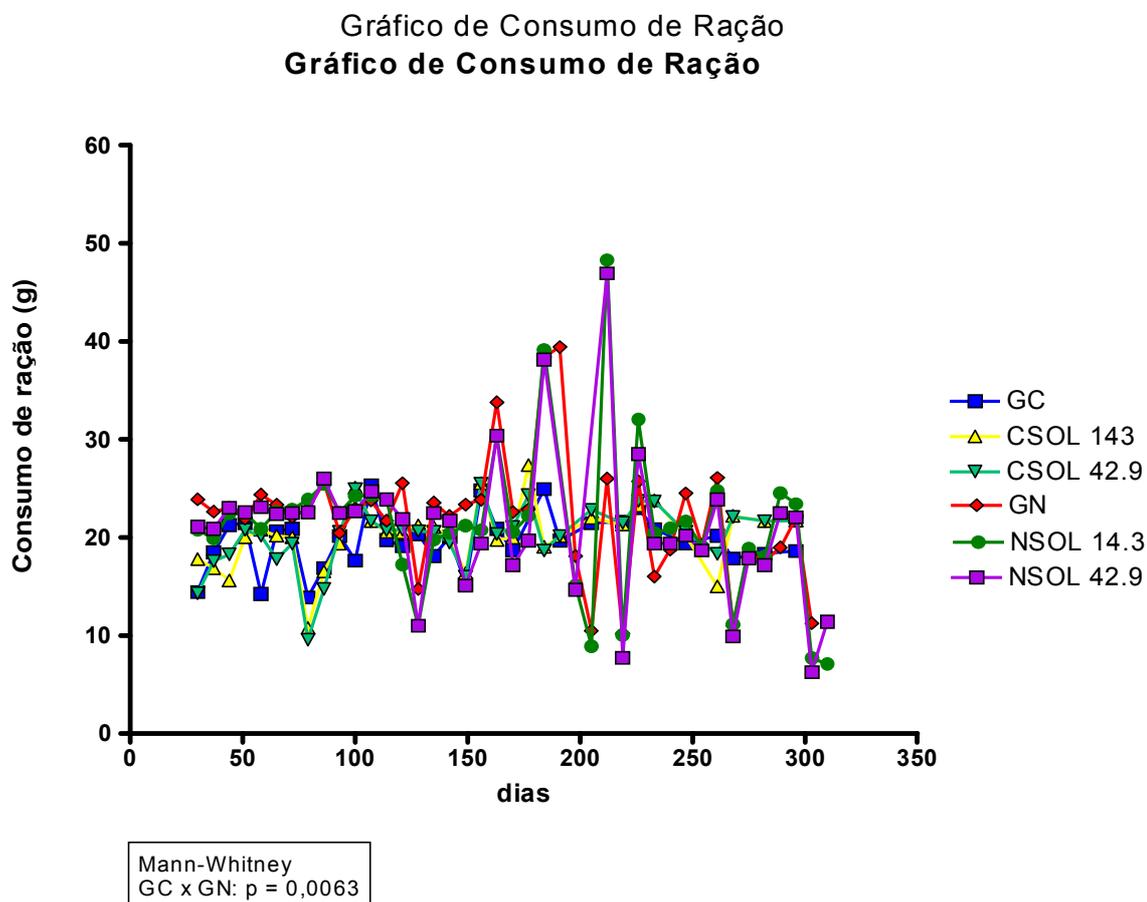


Figura 28: Gráfico do consumo de ração de todos os grupos estudados: Grupo controle (GC); grupo controle com cogumelo do sol por gavagem na dose de 14,3 mg (CSOL 14,3); grupo controle com cogumelo do sol por gavagem na dose de 42,9 mg (CSOL 42,9); grupo nitrosamina NNK (GN); grupo NNK + cogumelo do sol por gavagem na dose de 14,3 mg (NSOL14,3); grupo NNK + cogumelo do sol por gavagem na dose de 42,9 mg (NSOL 42,9). Notar a variação de consumo de ração com aumento e diminuição da ingesta na mesma proporção em todos os grupos estudados ao longo do experimento.

5.3- Parâmetros laboratoriais: Hemograma

5.3.1- Gráfico do hematócrito

A figura 29 referente ao gráfico do hematócrito mostra diferença significativa entre o grupo controle (GC) e os grupos nitrosamina (GN) e o grupo nitrosamina com cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (NSOL 42,9 mg) no momento do sacrifício pela análise de Bonferroni. Pela análise de Mann-Whitney foi observado diferença significativa entre o grupo controle (GC) e o grupo nitrosamina (GN) e entre o grupo controle com cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (CSOL 42,9) e o grupo nitrosamina + cogumelo do sol por gavagem na dose de 42,9 mg (NSOL 42,9).

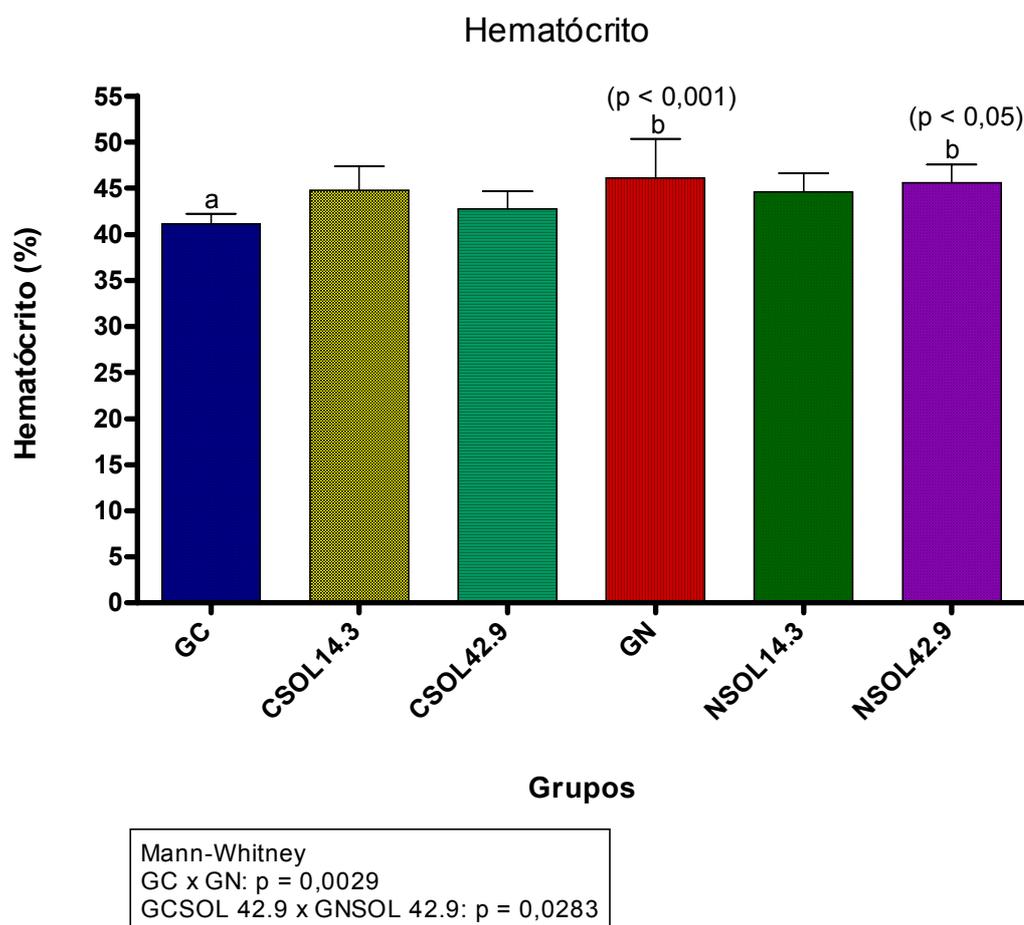


Figura 29: Gráfico do hematócrito de todos os grupos estudados.

5.3.2- Gráfico da hemoglobina

A figura 30 referente ao gráfico da hemoglobina, mostra diferença significativa entre o grupo controle e os grupos nitrosamina com cogumelo do sol nas duas dosagens (NSOL 14,3 mg e NSOL 42,9 mg) pela análise de Bonferroni e pela análise de Mann-Whitney foi observada diferença significativa entre o grupo controle com cogumelo do sol por gavagem na dose de 42,9 mg (CSOL 42,9) e o grupo nitrosamina + cogumelo do sol por gavagem na dose de 42,9 mg (NSOL 42,9).

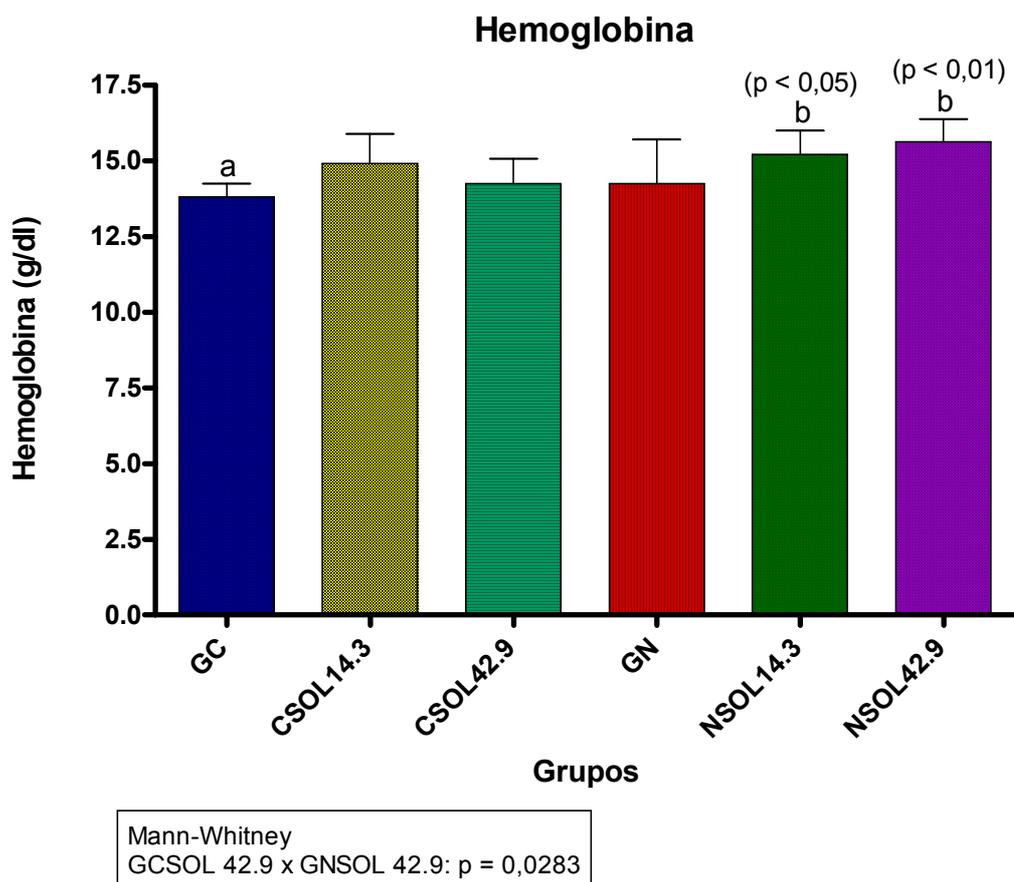


Figura 30: Gráfico de hemoglobina de todos os grupos estudados.

5.3.3- Gráfico da contagem de hemácias

A figura 31 referente ao gráfico da contagem de hemácias apresentou diferença estatística entre o grupo controle e os grupos nitrosamina com e sem dosagem de cogumelo do sol. E o grupo controle com cogumelo do sol na dose de 42,9 mg apresentou diferença estatística com o grupo nitrosamina com cogumelo do sol na mesma dosagem pela análise de Bonferroni. Quando feita a análise de Mann-Whitney, foi observada diferença significativa entre o grupo controle (GC) e o grupo nitrosamina (GN) e entre o grupo cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (CSOL 42,9) e o grupo nitrosamina + cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (NSOL 42,9).

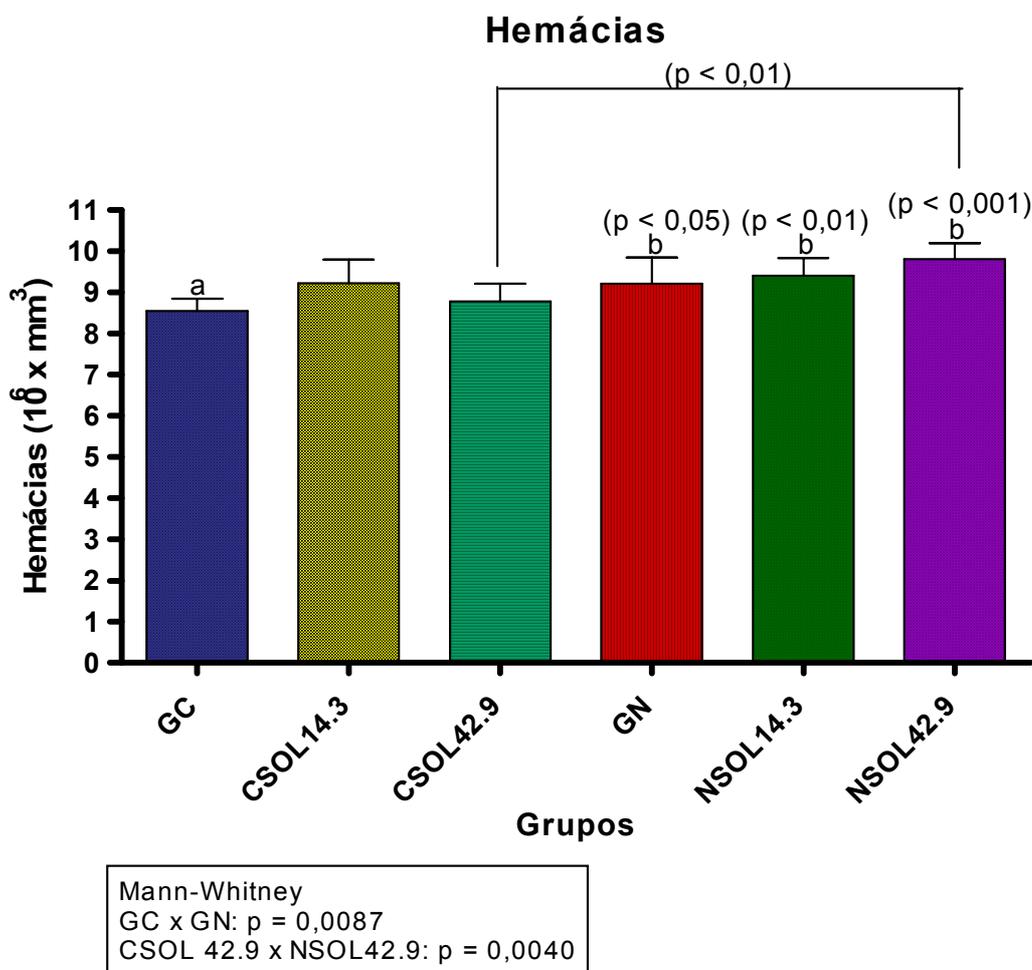


Figura 31: Gráfico da contagem de hemácias dos grupos estudados.

5.3.4- Gráfico da contagem de plaquetas

A figura 32 referente ao gráfico das plaquetas mostra diferença significativa na contagem plaquetária entre o grupo controle com cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (CSOL 42,9) e o grupo controle com cogumelo do sol na menor dose (CSOL 14,3) e o grupo nitrosamina (GN). Na análise de Mann-Whitney foi observada diferença significativa somente entre o grupo controle com cogumelo do sol na maior dosagem (CSOL 42,9) e o grupo nitrosamina + cogumelo do sol (NSOL 42,9) na maior dosagem também.

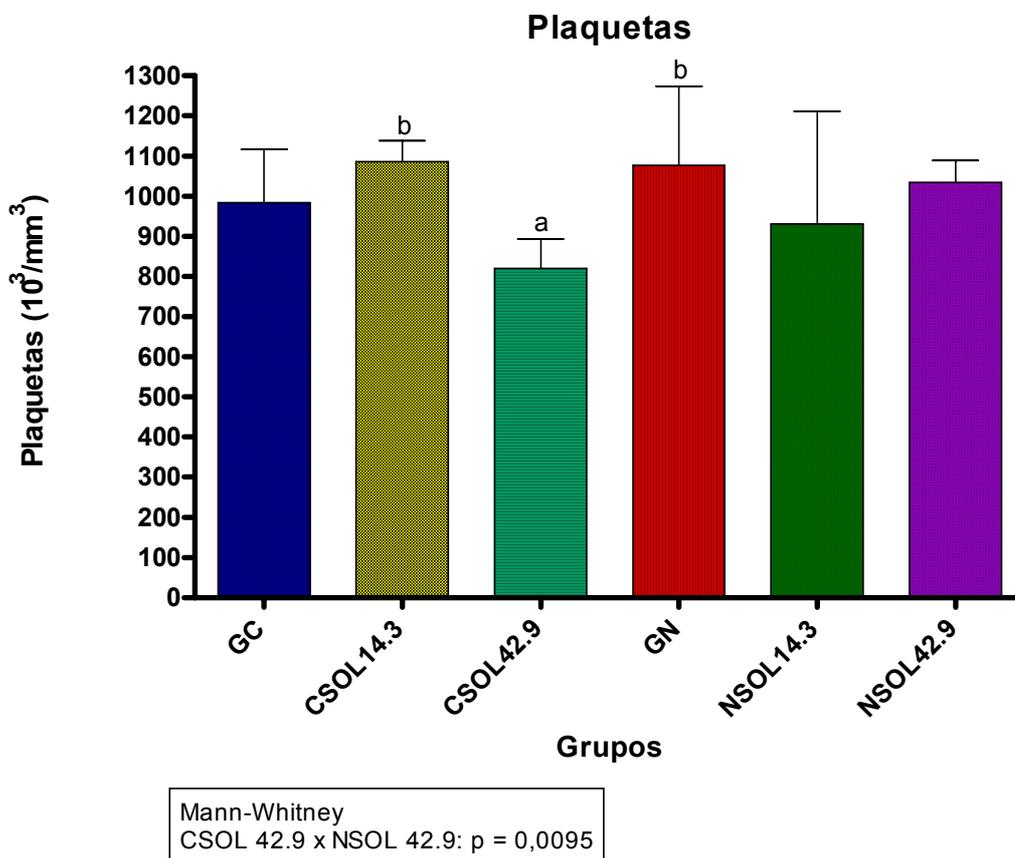


Figura 32: Gráfico da contagem das plaquetas de todos os grupos estudados.

As figuras 33, 34, 35 e 36 referente aos gráficos de linfócitos, neutrófilos, monócitos e leucócitos respectivamente, não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

5.3.5- Gráfico da contagem de linfócitos

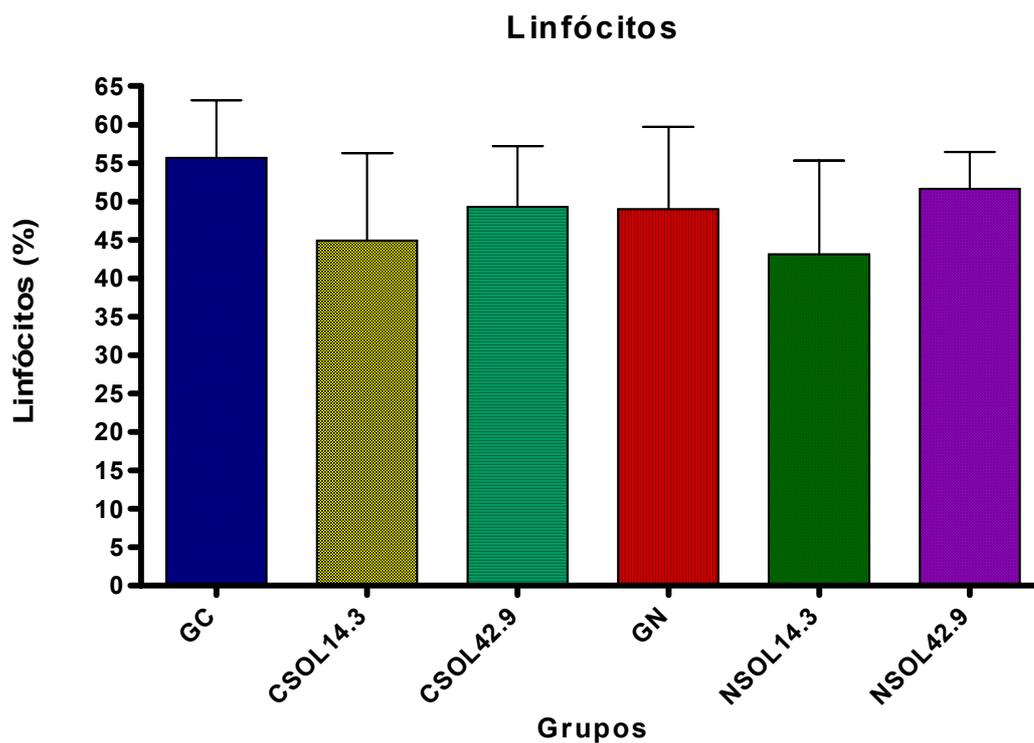


Figura 33: Gráfico da contagem dos linfócitos de todos os grupos estudados.

5.3.6- Gráfico da contagem de neutrófilos

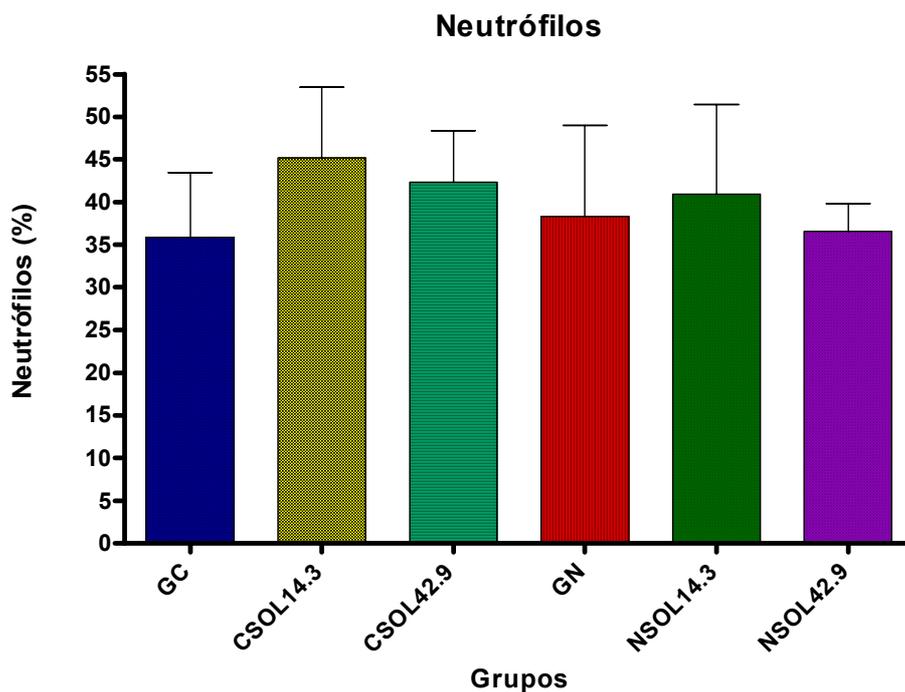


Figura 34: Gráfico da contagem de neutrófilos dos grupos estudados.

5.3.7- Gráfico da contagem de monócitos

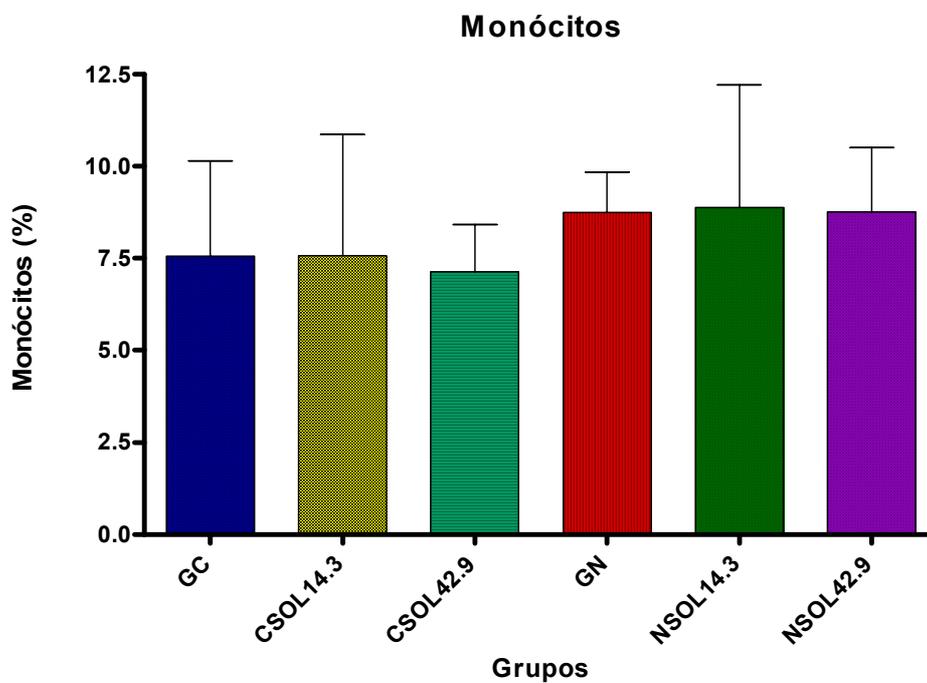


Figura 35: Gráfico da contagem de monócitos dos grupos estudados

5.3.8- Gráfico da contagem de leucócitos

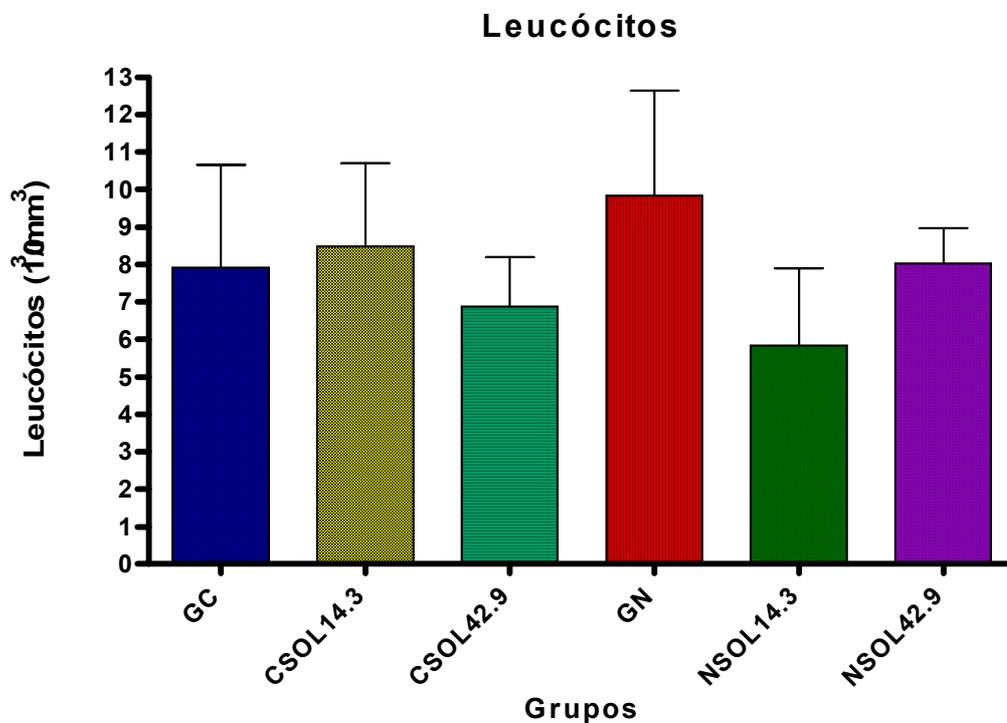


Figura 36: Gráfico da contagem de leucócitos dos grupos estudados.

A figura 37 referente ao gráfico da contagem de eosinófilos apresentou diferença estatística entre o grupo controle e os grupos nitrosamina com e sem cogumelo do sol, e o grupo cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (CSOL 42,9) apresentou diferença significativa com o grupo nitrosamina (GN) pela análise de Bonferroni. Pela análise de Mann-Whitney, foi observada diferença significativa somente entre o grupo controle (GC) e o grupo nitrosamina (GN).

5.3.9- Gráfico da contagem de eosinófilos

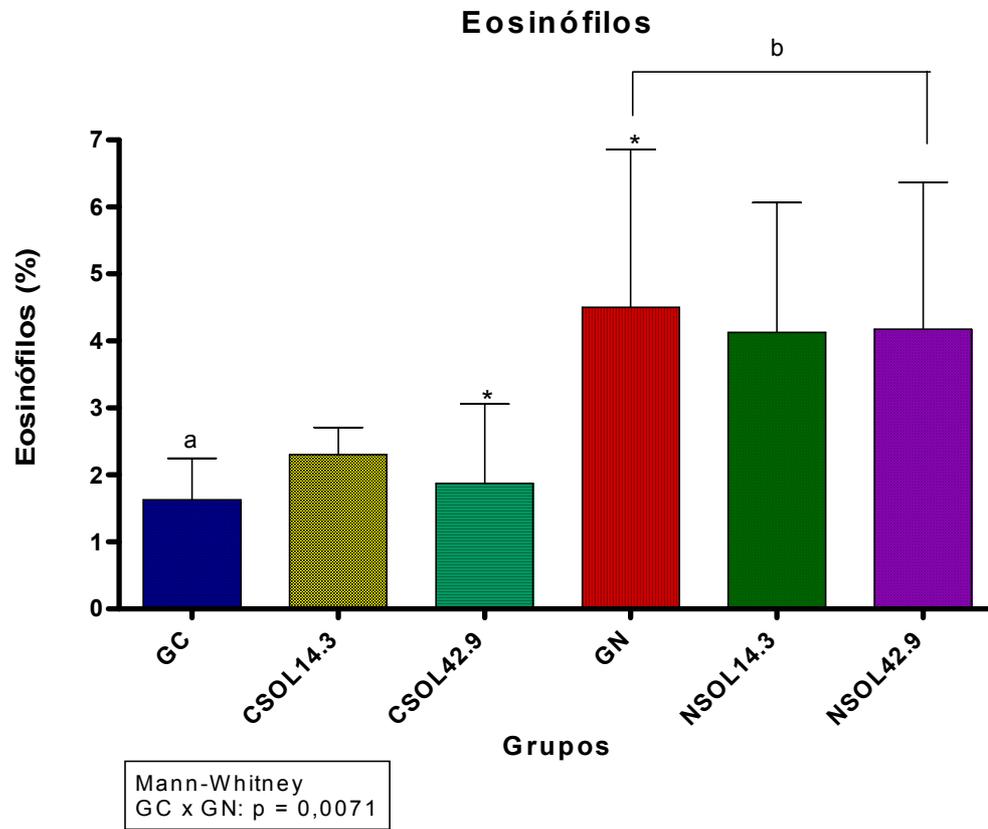


Figura 37: Gráfico da contagem de eosinófilos dos grupos estudados.

5.4- Parâmetros Laboratoriais: Hepatograma.

A figura 38 referente ao gráfico da fosfatase alcalina, mostra que houve diferença significativa entre os grupos controle, tanto com cogumelo do sol ou não e os grupos nitrosamina com e sem cogumelo do sol pela análise de Bonferroni e Mann-Whitney.

5.4.1- Gráfico da fosfatase alcalina:

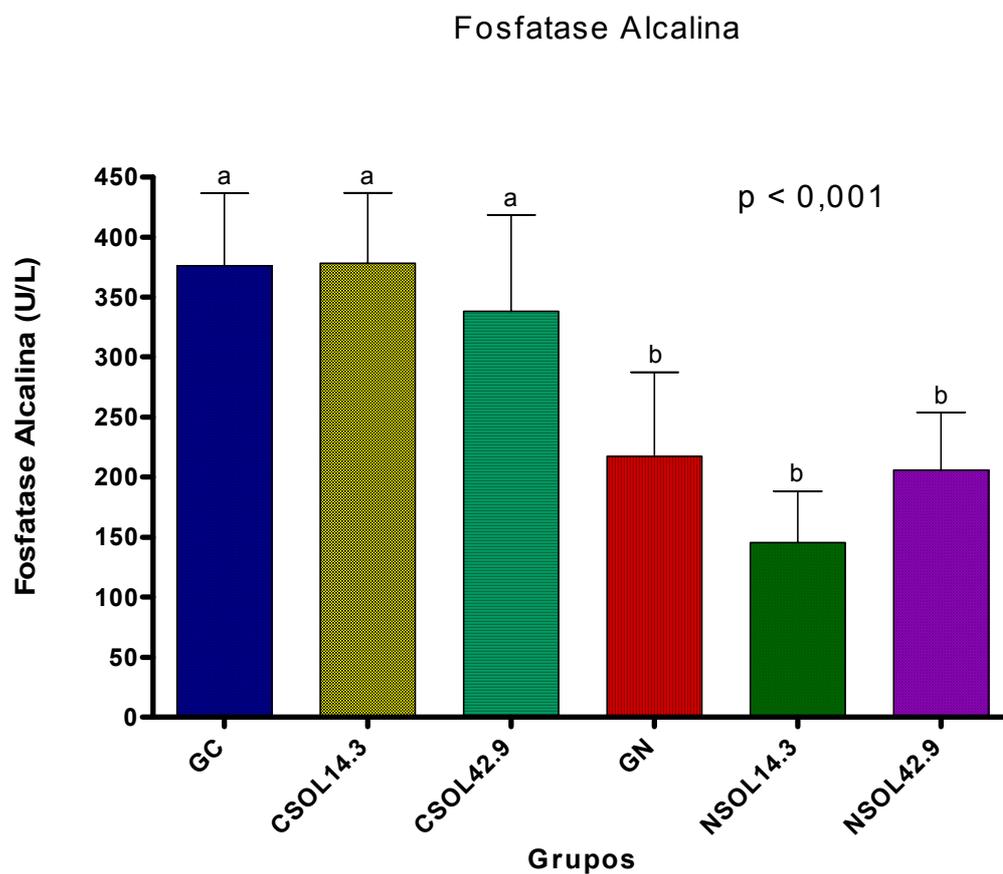


Figura 38: Gráfico da fosfatase alcalina dos grupos estudados.

A figura 39 referente ao gráfico da TGO mostra que houve diferença entre o grupo controle e o grupo controle (GC) com cogumelo do sol na dose de 14,3 mg (CSOL 14,3), e o grupo controle (GC) com o grupo nitrosamino com cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (NSOL 42,9) pela análise de Bonferroni. E por Mann-Whitney, houve diferença significativa entre o grupo controle com cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (CSOL 42,9) e o grupo nitrosamina + cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (NSOL 42,9).

5.4.2- Gráfico da Aspartato Aminotransferase (TGO)

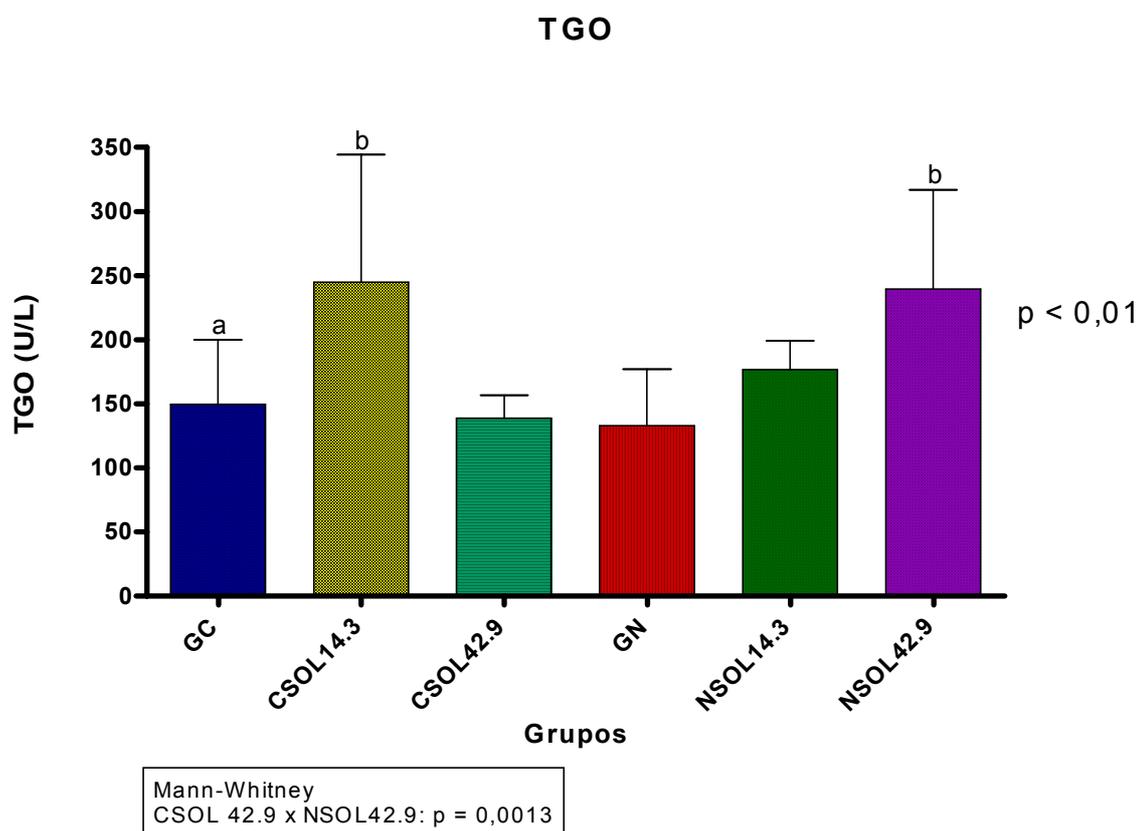


Figura 39: Gráfico da aspartato aminotransferase (TGO) dos grupos estudados.

A figura 40 referente ao gráfico da TGP, mostra que o grupo nitrosamina com cogumelo do sol na dose de 42,9 mg apresentou diferença significativa com todos os demais grupos e pela análise de Mann-Whitney não houve diferença estatística significativa entre os grupos estudados.

5.4.3- Gráfico da Alanina Aminotransferase (TGP)

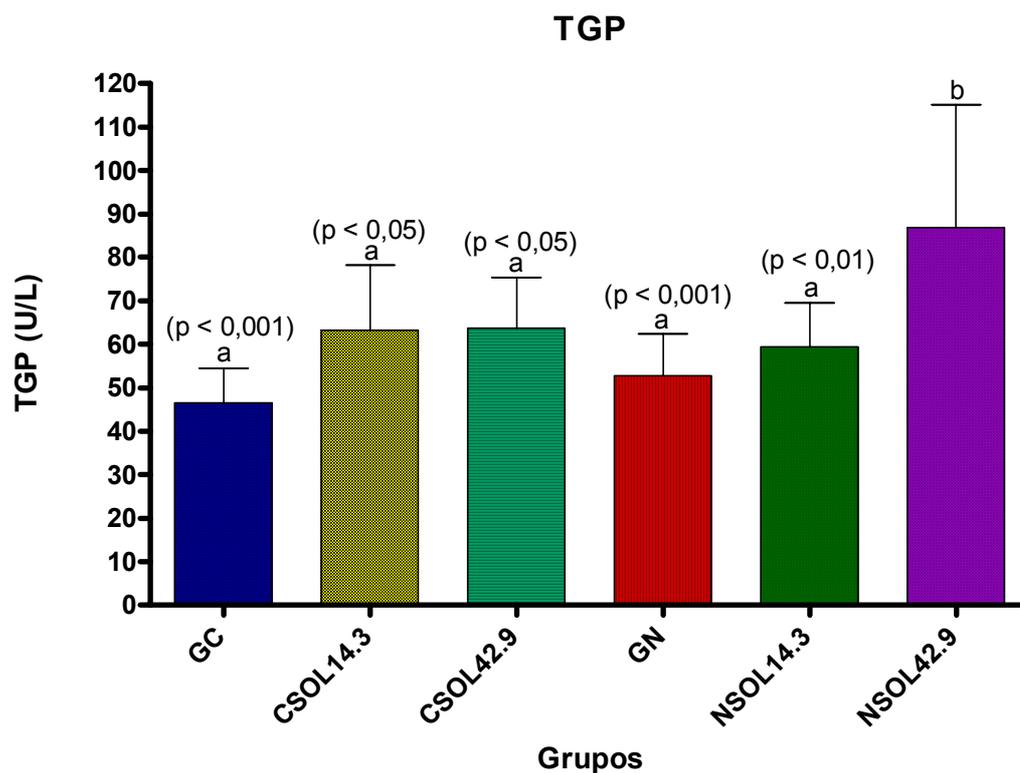


Figura 40: Gráfico da alanina aminotransferase (TGP) dos grupos estudados.

5.4.4- Gráfico da gama glutamiltransferase (GGT)

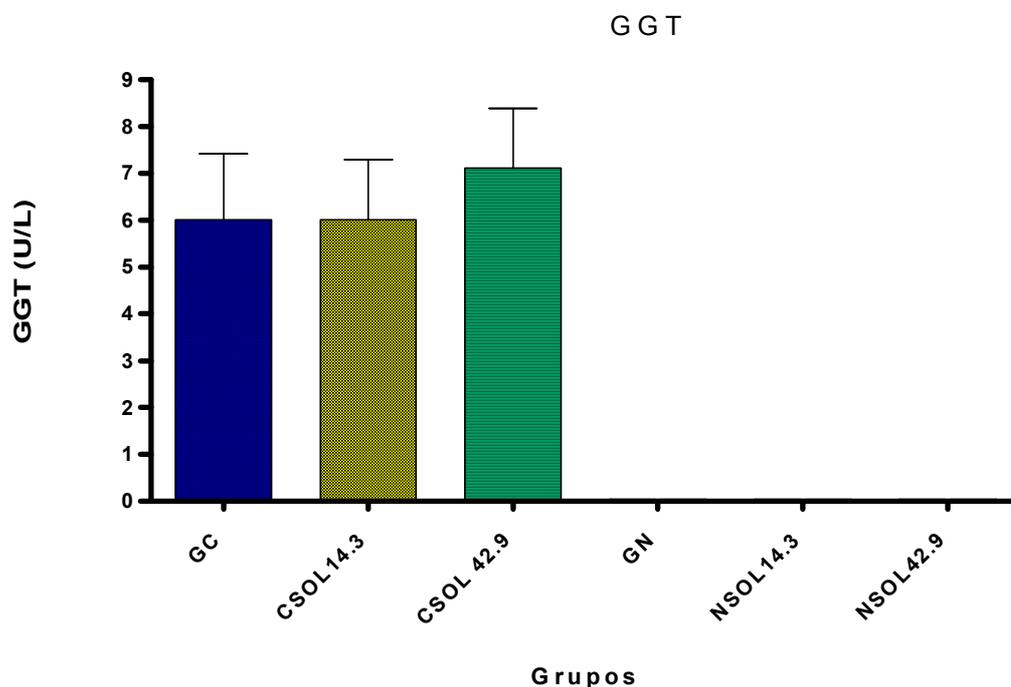


Figura 41: Gráfico da análise de gama glutamil transferase (GGT) dos grupos estudados.

A figura 41 referente ao gráfico da análise da GGT mostra que não houve diferença significativa entre os grupos controle. Entretanto, não foi possível compará-los com os grupos nitrosamina, pois o equipamento não conseguiu mensurar os níveis de GGT nesses grupos. A análise foi repetida duas vezes, mas não houve detecção da atividade enzimática para GGT nestes grupos. No entanto, o nível enzimático foi determinado no grupo controle (GC), no grupo controle com cogumelo do sol por gavagem na dose de 14,3 mg (CSOL 14,3) e no grupo controle com cogumelo do sol por gavagem na dose de 42,9 mg (CSOL 42,9).

5.5- Parâmetros Laboratoriais: Colesterol e Triglicerídeo.

A figura 42 referente ao gráfico da análise de colesterol, mostra que não houve diferença significativa entre os grupos tanto pela análise de Bonferroni como de Mann-Whitney.

5.5.1- Gráfico da Análise de Colesterol

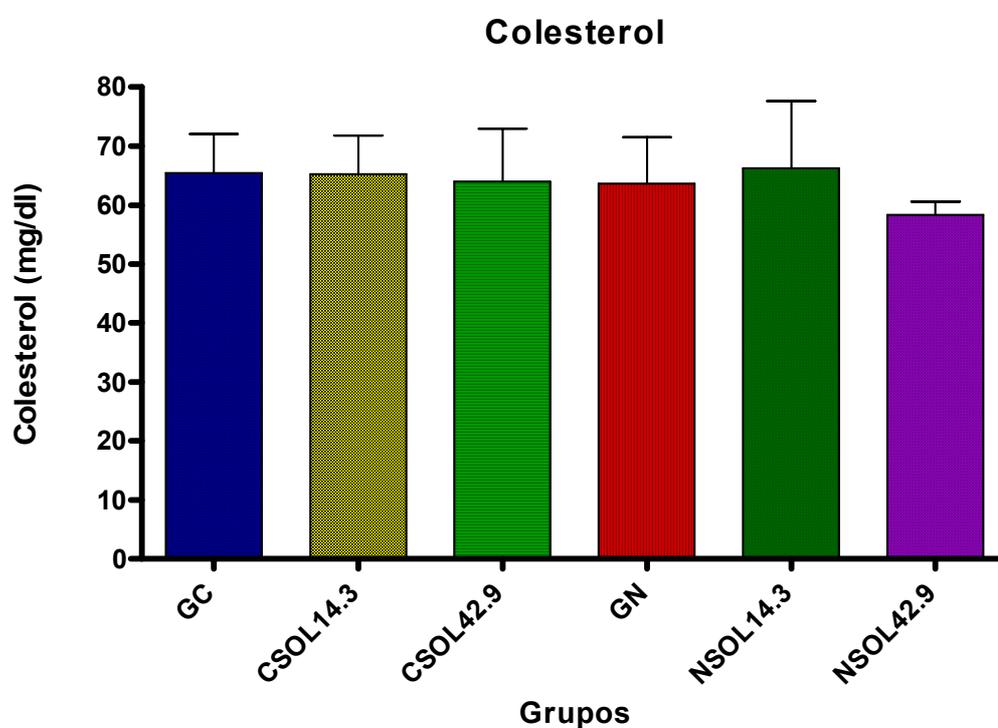


Figura 42: Gráfico da análise de colesterol dos grupos estudados.

Na figura 43 referente ao gráfico da análise de triglicerídeos observa-se que houve diferença significativa entre o grupo controle com cogumelo do sol na dose de 14,3 mg (CSOL 14,3) e o grupo nitrosamino com cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (NSOL 42,9) pela análise de Bonferroni. Em relação a análise de Mann-Whitney houve diferença significativa entre o grupo controle com cogumelo do sol na dose de 14,3 mg (CSOL 14,3) e o grupo nitrosamina + cogumelo do sol na dose de 14,3 mg (NSOL 14,3).

5.5.2- Gráfico da Análise de Triglicerídeo

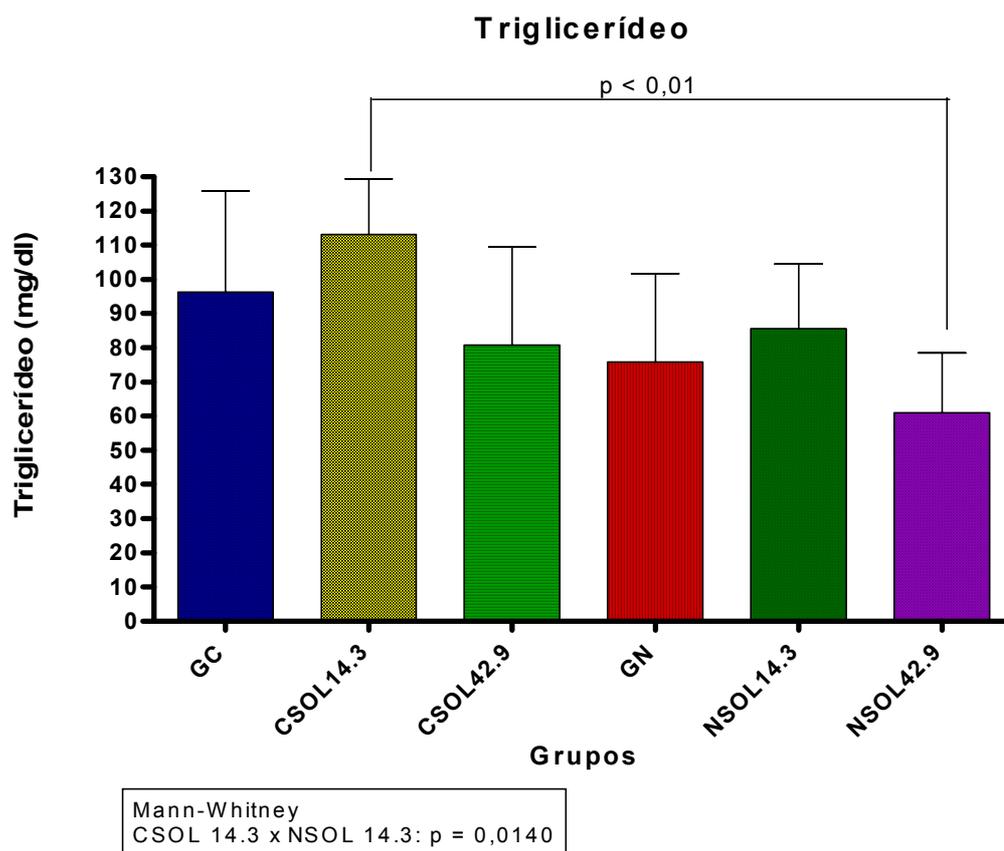


Figura 43: Gráfico de triglicerídeo dos grupos estudados

5.6- Macroscopia Pulmonar

Os achados da macroscopia pulmonar estão sintetizados na tabela 3 e 4.

Tabela 3: Alterações macroscópicas do grupo NNK e grupo NNK + cogumelo do sol nas doses de 14,3 mg e 42,9 mg.

Alterações	Grupo Nitrosamina (%)	Grupo Nitrosamina + cogumelo do sol na dose de 14,3 mg (%)	Grupo Nitrosamina + cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (%)
Pulmão sem alterações	10% n = 2	30% n = 3	25% n = 2
Pulmão com lesões de aspecto brancacento nos lobos	10% n = 2	0% n = 0	12,5% n = 1
Pulmão com múltiplos abscessos (pulmão inteiro c/ abscessos) + áreas de hepatização nos lobos	10% n = 2	0% n = 0	12,5% n = 1
Pulmão de coloração avermelhada e poucos abscessos (1 a 2 abscessos) e com pouco exsudato purulento	0% n = 0	20% n = 2	0% n = 0
Pulmão com múltiplos abscessos (pulmão inteiro c/ abscessos) e grande quantidade de exsudato purulento	40% n = 8	20% n = 2	37,5% n = 3
Pulmão com múltiplos abscessos (pulmão inteiro c/ abscessos)	25% n = 5	20% n = 2	12,5% n = 1
Presença de nódulo	5% n = 1	10% n = 1	0% n = 0

Tabela 4: Alterações macroscópicas do grupo controle e controle mais cogumelo do sol nas doses de 14,3 mg e 42,9 mg

Alterações	Grupo controle (%)	Grupo controle + cogumelo do sol na dose de 14,3 mg (%)	Grupo controle + cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (%)
Pulmão sem alterações	85% n = 17	71,44% n = 5	100% n = 9
Pulmão com múltiplos abscessos (pulmão inteiro c/ abscessos)	15% n = 3	14,28% n = 1	0% n = 0
Pulmão com presença de exsudato purulento	0% n = 0	14,28% n = 1	0% n = 0

5.7- Microscopia

Em relação à carcinogênese, no presente material houve apenas observação de pontos de metaplasia, sem que fossem evidenciadas alterações displásicas ou neoplasia, seja *in situ* ou de maior intensidade. No entanto, ao invés de neoplasia o grande achado foi constituído por infiltrados inflamatórios pulmonares compatíveis com a natureza pneumônica. A intensidade das alterações que compuseram o quadro histológico da pneumonia desde a fase inicial (congestão e edema), fase típica da doença (exsudato fibrino-leucocitário nos brônquios e alvéolos), fase resolutive até a fibrose cicatricial das áreas destruídas pelos abscessos, foram graduadas de 0 (zero) sem alteração a ++++ (quatro cruces) com alterações muito acentuadas. O exsudato era composto de poliformonucleares (neutrófilos e piócitos) e monucleares (macrófagos e linfócitos). Para melhor análise estatística, a representação de cruces foi substituída por códigos numéricos, variando de 0 (zero) sem alteração a 4

(quatro) alterações muito acentuadas. A tabela 5 sintetiza os achados histológicos.

Tabela 5: A tabela mostra a média e desvio padrão de acordo com a análise estatística de Kruskal Wallis e Mann Whitney entre os grupos controle (GC, CSOL 14,3, CSOL 42,9) e seu respectivo par (GN, NSOL 14,3, NSOL 42,9) ao nível de p: *p < 0,01 e **p < 0,05.

Grupos	Congestão	Edema	Exsudato alveolar	Exsudato bronquiolar	Bronquiectasia	Abscesso	Metaplasia do ep. brônquico	Fibrose
GC	1,235 ± 0,424	0,882 ± 0,582	0,706 ± 1,015 *	0,706 ± 1,176 *	0,118 ± 0,471	0,235 ± 0,644	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
CSOL 14,3	1,286 ± 0,452	0,857 ± 0,639	0,857 ± 0,990	1,000 ± 1,309	0,571 ± 1,050	0,143 ± 0,350	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
CSOL 42,9	1,444 ± 0,497	1,000 ± 0,000	0,222 ± 0,416 **	0,333 ± 0,471 **	0,000 ± 0,000	0,111 ± 0,314	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
GN	1,456 ± 0,589	1,200 ± 0,600	1,750 ± 1,090 *	1,300 ± 0,900 *	0,850 ± 1,236	0,450 ± 0,865	0,500 ± 1,245	0,800 ± 1,122
NSOL 14,3	1,700 ± 0,640	1,200 ± 0,400	1,400 ± 1,200	1,200 ± 1,077	0,300 ± 0,640	0,200 ± 0,600	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
NSOL 42,9	1,556 ± 0,497	1,222 ± 0,786	1,667 ± 0,816 **	1,667 ± 0,667 **	1,333 ± 1,247	0,778 ± 1,474	0,000 ± 0,000	1,000 ± 1,247

De acordo com a análise estatística, houve diferença significativa para o surgimento de exsudato alveolar e exsudato bronquiolar entre o grupo controle e grupo nitrosamina (GC x GN) e entre o grupo controle com cogumelo do sol na dose de 42,9 mg e o grupo nitrosamina + cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (CSOL 42,9 x NSOL 42,9). Notar que o cogumelo do sol na dose de 42,9 mg não foi capaz de atenuar ou melhorar o processo inflamatório relacionado à nitrosamina (Figuras 44 e 45). Para as demais características, não houve diferença significativa entre os grupos.

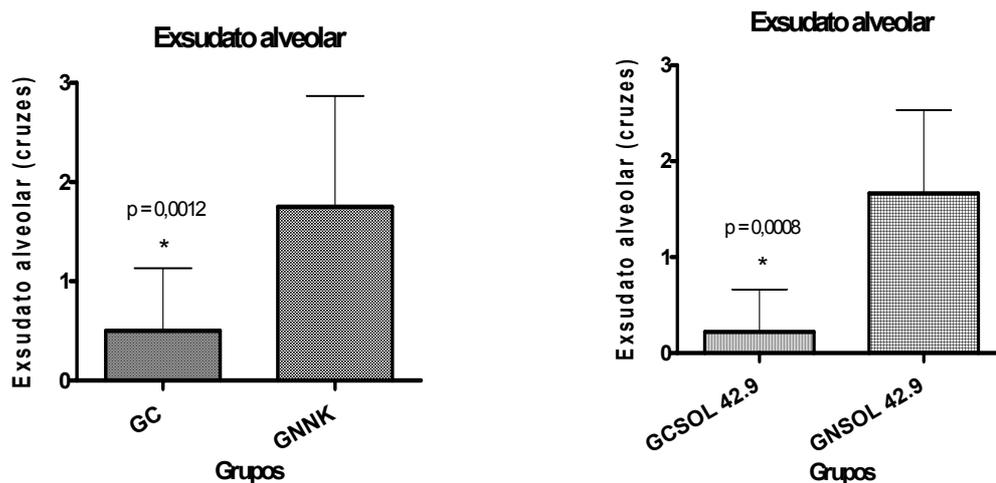


Figura 44: Gráfico da diferença de exsudato alveolar encontrado nas análises microscópicas dos grupos controle (GC) x grupo nitrosamina (GN) e do grupo controle com cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (GCSOL 42,9) x grupo nitrosamina + cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (GNSOL 42,9).

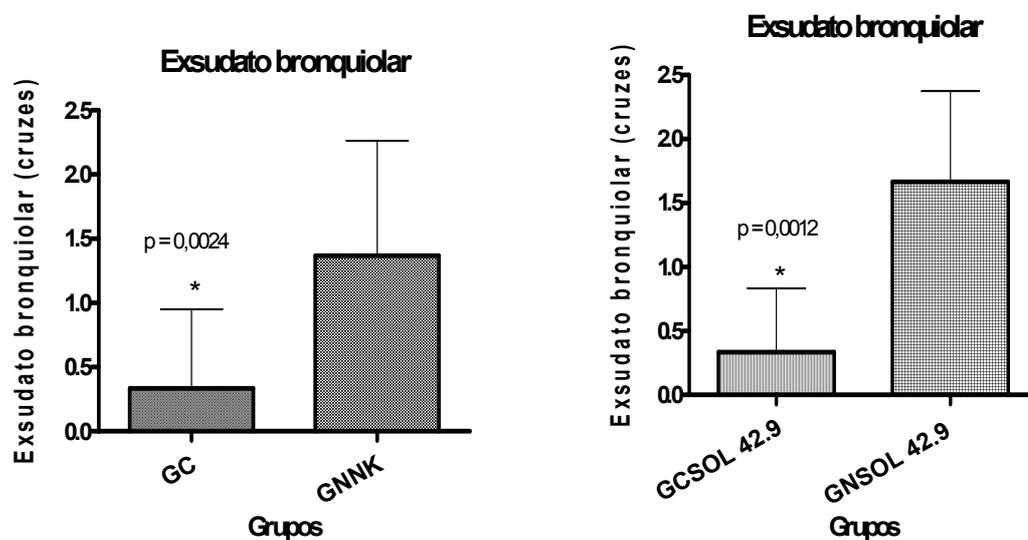


Figura 45: Gráfico da diferença de exsudato bronquiolar encontrado nas análises microscópicas dos grupos controle (GC) x grupo nitrosamina (GN) e do grupo controle com cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (GCSOL 42,9) x grupo nitrosamina + cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (GNSOL 42,9).

Por outro lado, não houve diferença significativa entre os grupos nitrosamina na dose de 14,3 mg e seu controle sem nitrosamina, demonstrando, portanto, que a dose de 14,3 mg de cogumelo do sol foi capaz de atenuar o processo inflamatório relacionado à nitrosamina NNK (Figura 46).

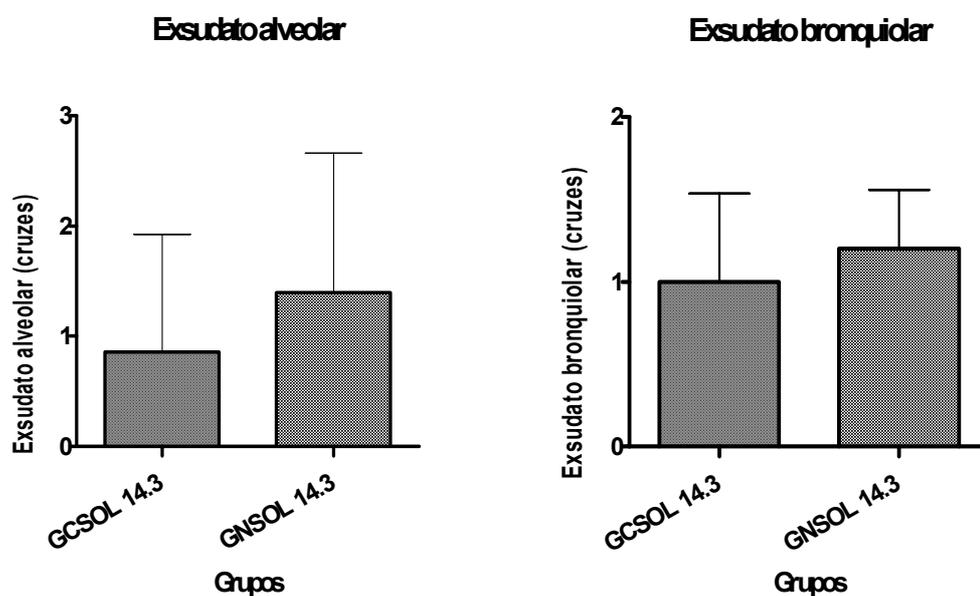


Figura 46: Gráfico de exsudato alveolar e exsudato bronquiolar entre os grupos controle com cogumelo do sol na dose de 14,3 mg (GCSOL 14,3) e grupo nitrosamina + cogumelo do sol na dose de 14,3 mg (GNSOL 14,3).

As imagens referentes à microscopia e suas diferentes colorações, assim como, os diferentes estágios do processo inflamatório são apresentadas nas figuras a seguir.

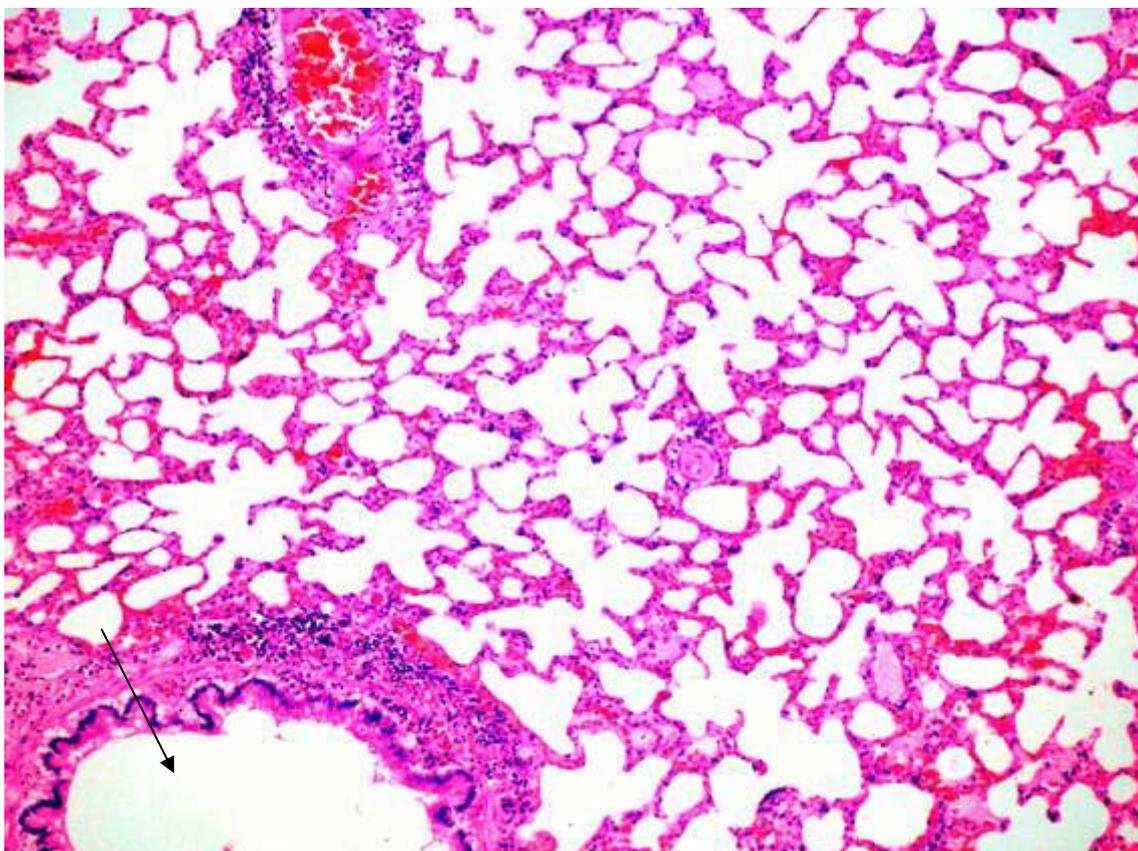


Figura 47. Rato Wistar adulto macho. Pulmão Normal. Alvéolos e brônquios (seta) livres, e septos interalveolares exibindo espessura fina e textura delicada. HE, microscopia óptica objetiva de 10 vezes. 0 cruz, ou seja, sem alteração.

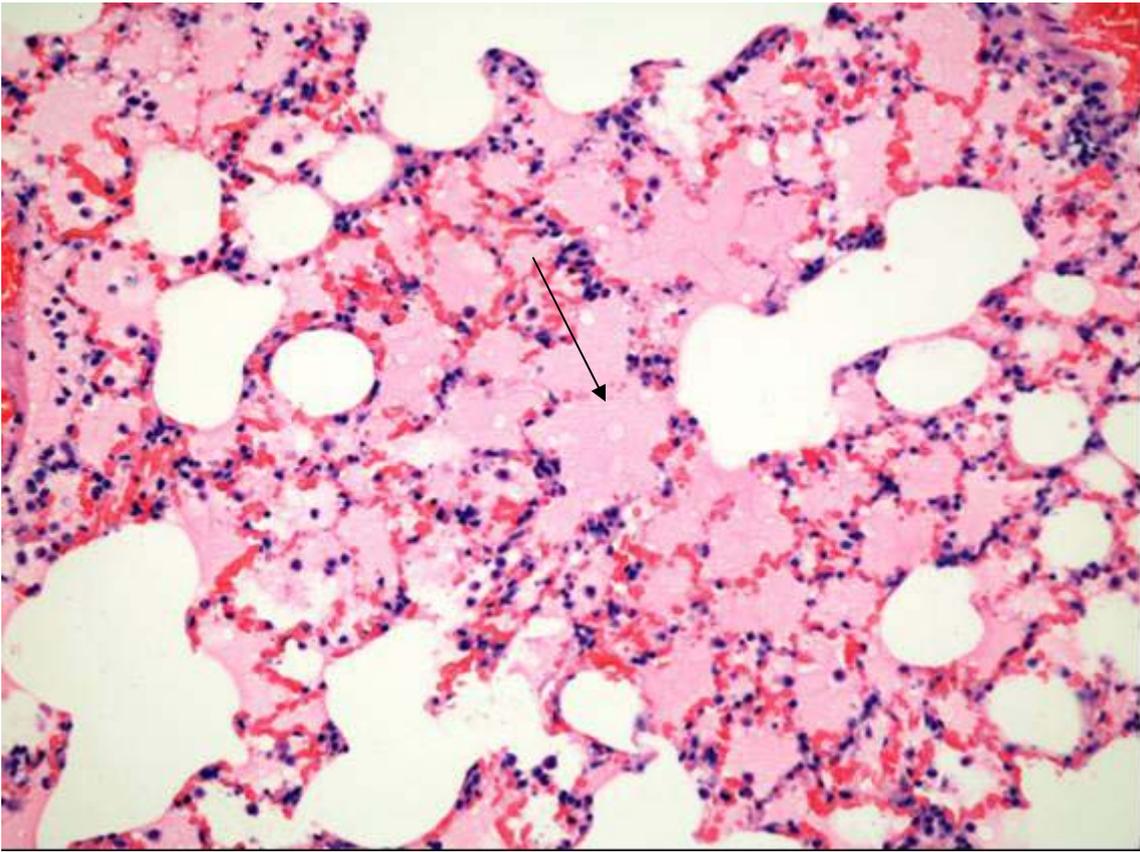


Figura 48. Rato Wistar adulto macho. Pulmão. Congestão e edema. Paredes alveolares com vasos sanguíneos dilatados e alvéolos repletos de plasma (seta). HE, microscopia óptica objetiva de 20 vezes. 3 cruces (+++), ou seja, alteração acentuada.

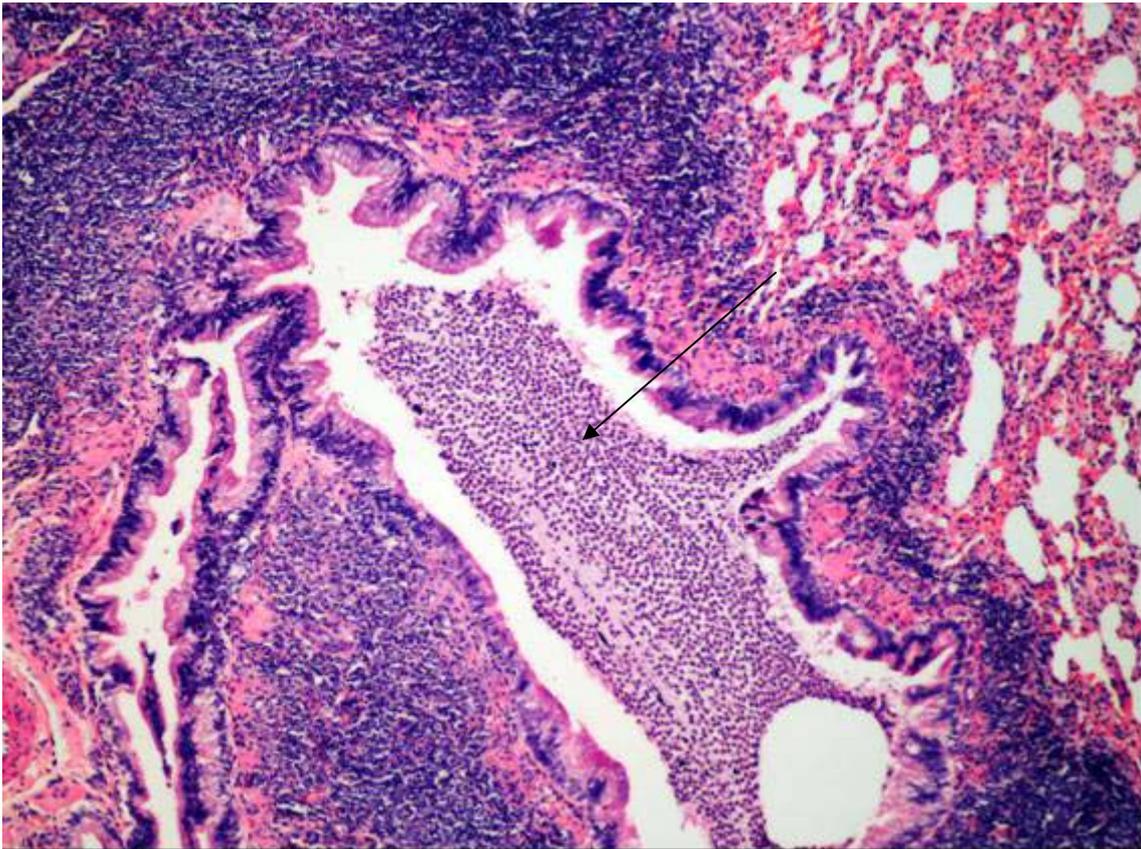
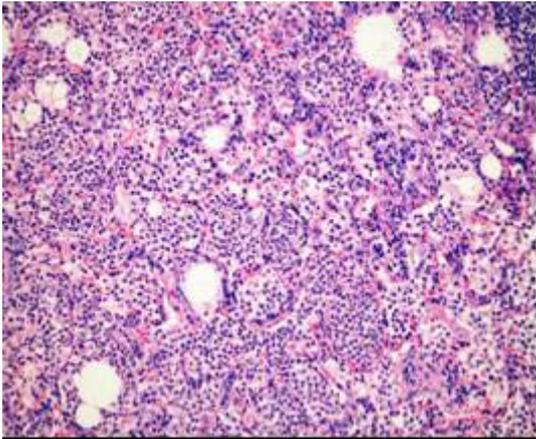


Figura 49. Rato Wistar adulto macho. Pulmão. Broncopneumonia. Brônquio apresentando em sua luz exsudato fibrino-leucocitário (seta). HE, microscopia óptica e objetiva de 10 vezes. 3 cruces (+++), ou seja, alteração acentuada.

A



B

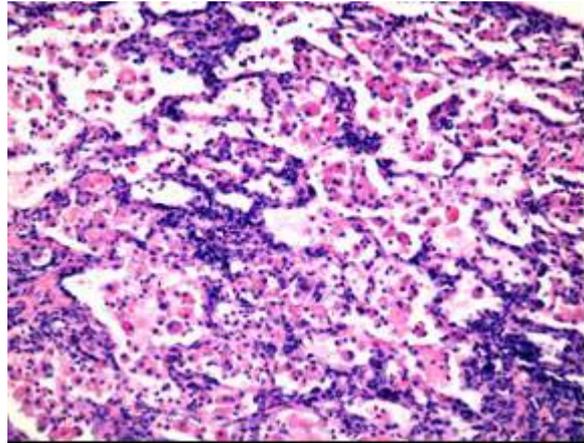


Figura 50 (A e B). Rato Wistar adulto macho. Pulmão. Pneumonia. Na figura A os alvéolos estão preenchidos por infiltrado inflamatório de polimorfonucleares (predomínio de neutrófilo) e na figura B por macrófagos. HE, microscopia óptica e objetiva de 20 vezes. 4 cruces (++++), ou seja alteração muito acentuada.

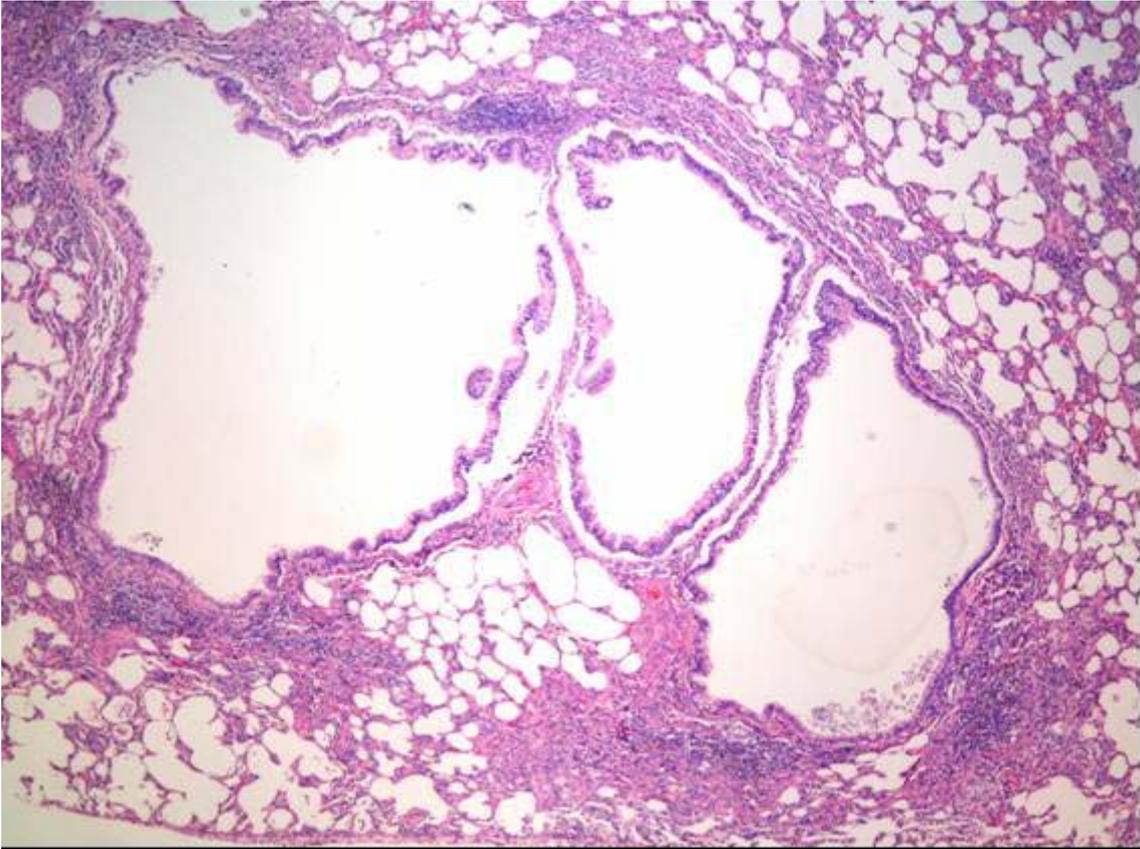


Figura 51. Rato Wistar adulto macho. Pulmão. Bronquiectasia. Brônquio apresentando dilatação em sua luz. HE, microscopia óptica com objetiva de 10 vezes. 3 cruces (+++), ou seja, alteração acentuada.

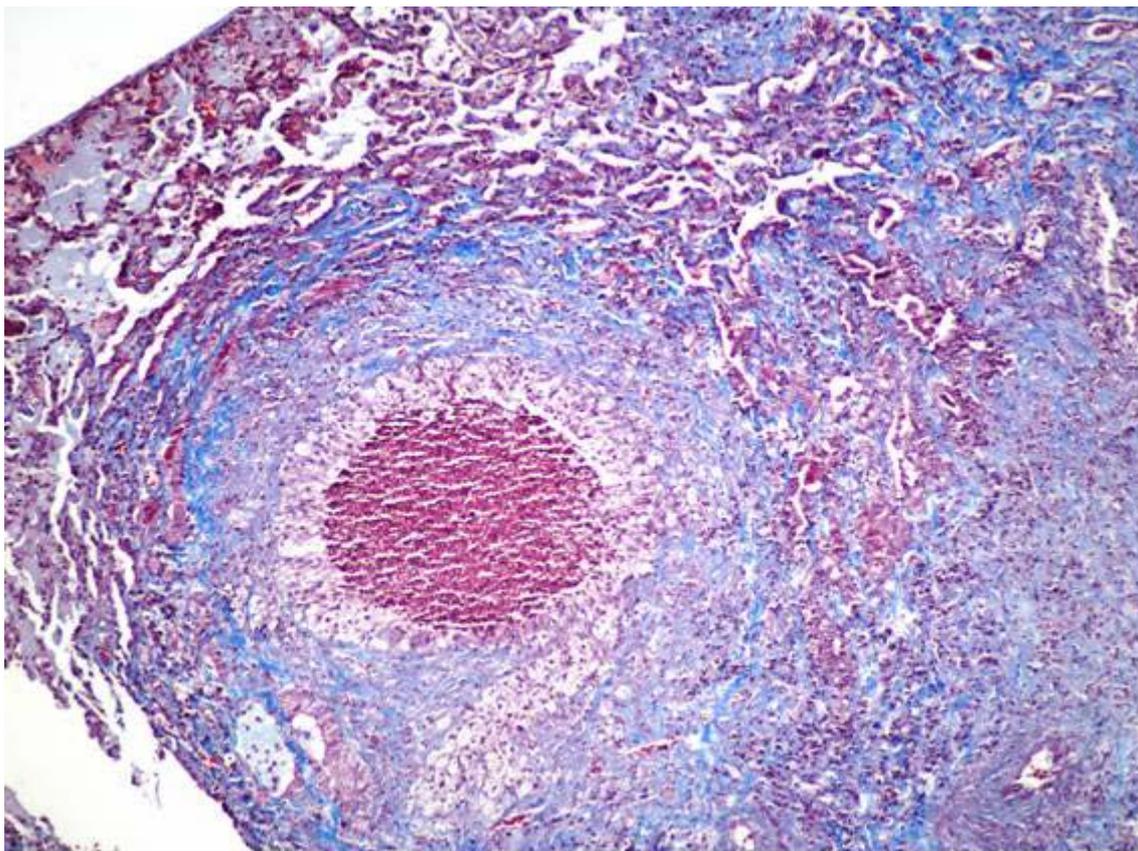


Figura 52. Rato Wistar adulto macho. Pulmão. Abscesso. Representado por necrose central, coleção purulenta e cápsula conjuntiva (corada de azul). Tricrômico de Masson, microscopia óptica com objetiva de 10 vezes. 4 cruces (++++), ou seja, alteração muito acentuada.

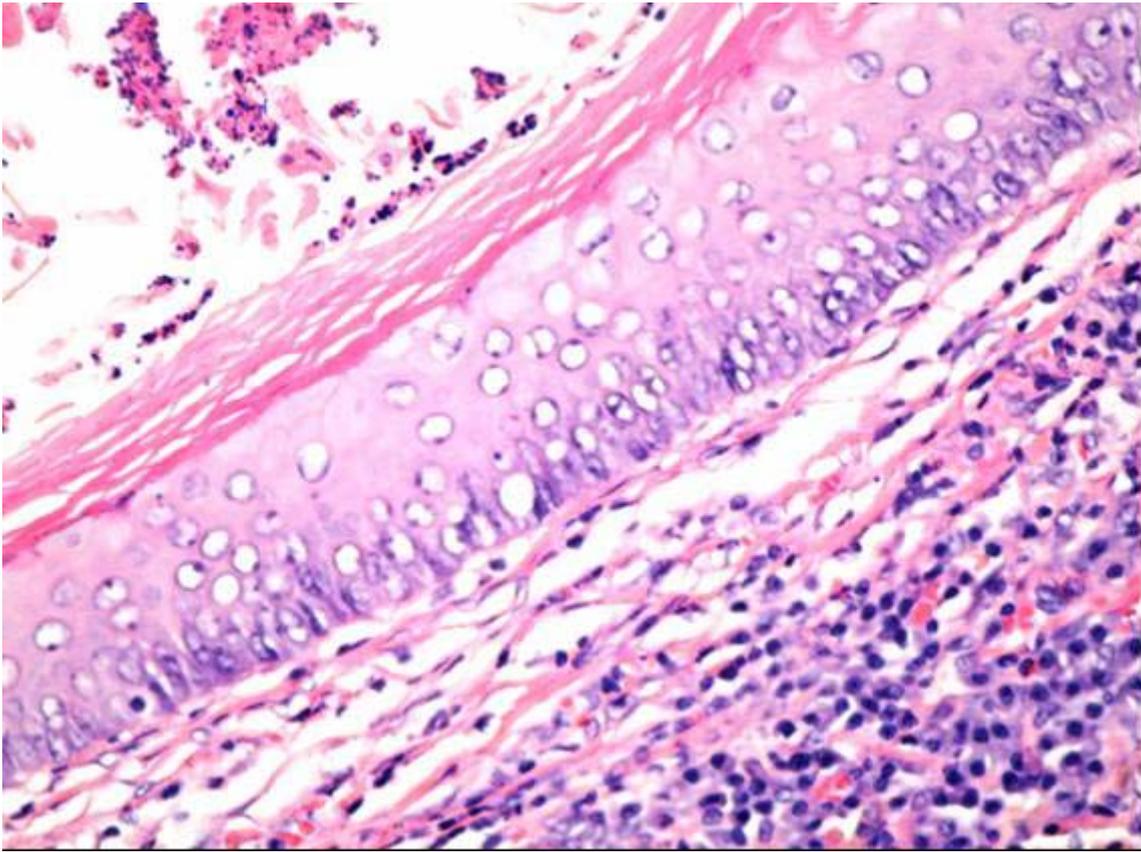


Figura 53. Rato Wistar adulto macho. Pulmão. Metaplasia escamosa do epitélio brônquico. HE, microscopia óptica e objetiva de 20 vezes. 4 cruces (++++), ou seja, alteração muito acentuada.

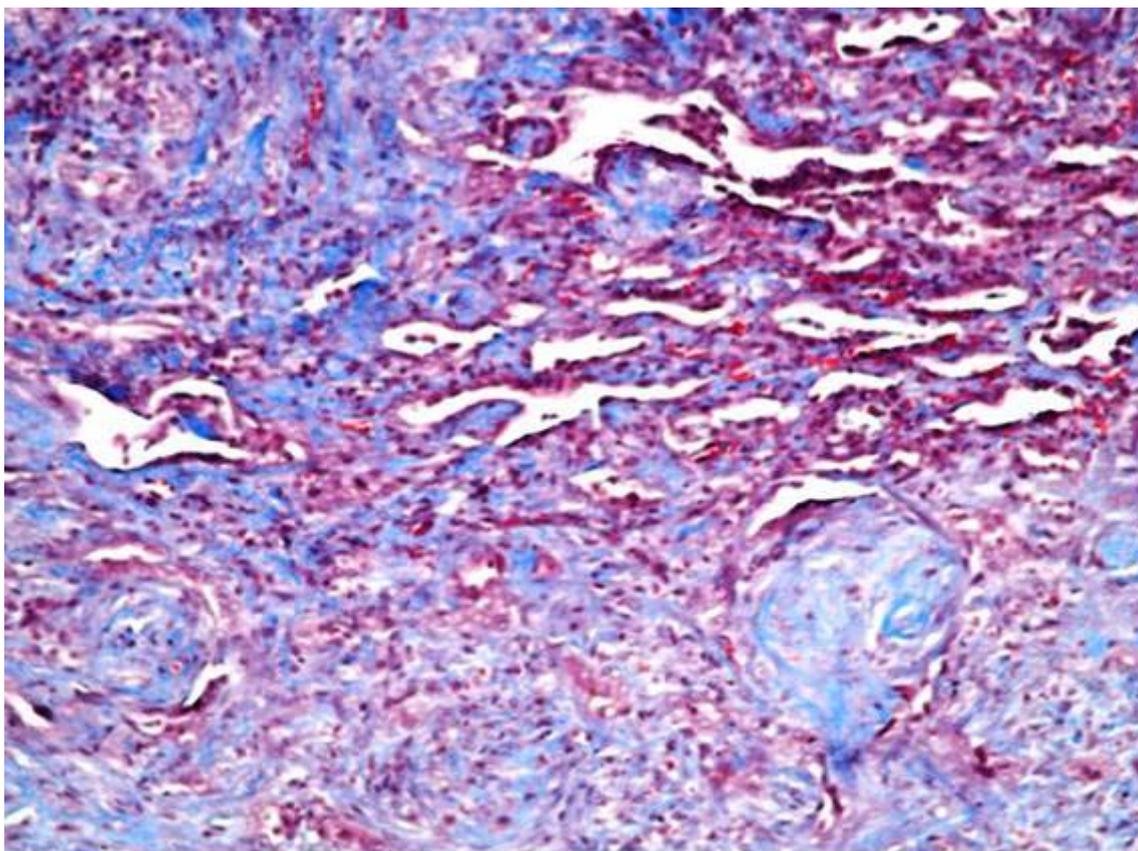


Figura 54. Rato Wistar adulto macho. Pulmão. Fibrose. Parênquima com proliferação de tecido conjuntivo (corado de azul). Tricrômico de Masson, microscopia óptica e objetiva de 20 vezes. 4 cruzes (++++), ou seja, alteração muito acentuada.

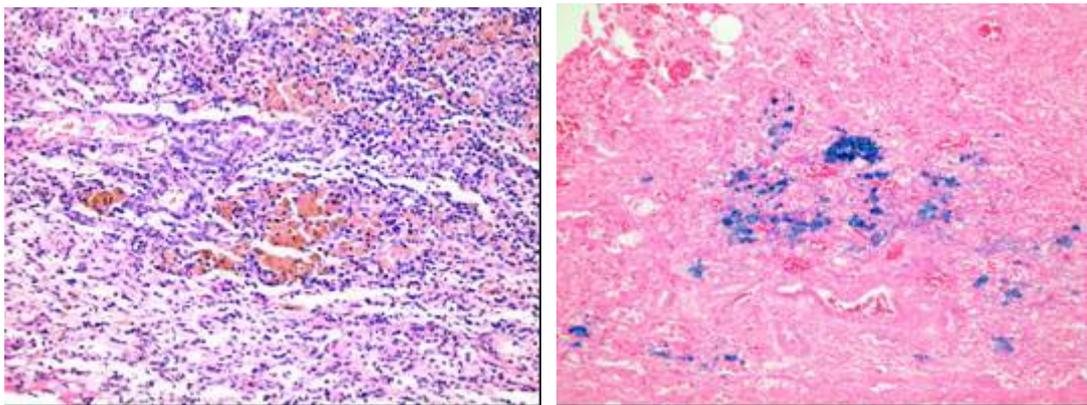


Figura 55. Rato Wistar adulto macho. Pulmão. Hemossiderose. A hemossiderina aparece com grânulos de pigmento marrom em HE. A hemossiderina destaca-se em cor azul escura no Perls, microscopia óptica e objetiva de 20 vezes.

5.8- Análise da Curtose na Curva do Histograma

Valores de curtose mais baixos, ou seja, mais próximos de zero, expressam maior surgimento de opacidades e curva mais achatada, denotando um processo inflamatório maior, verificado no grupo que recebeu nitrosamina. No pulmão esquerdo, apesar de não haver diferença estatística entre os grupos, nota-se que o grupo NNK apresenta valores de curtose mais baixos que o grupo controle, manifesta a tendência de acompanhar o ocorrido no pulmão direito (Figura 56).

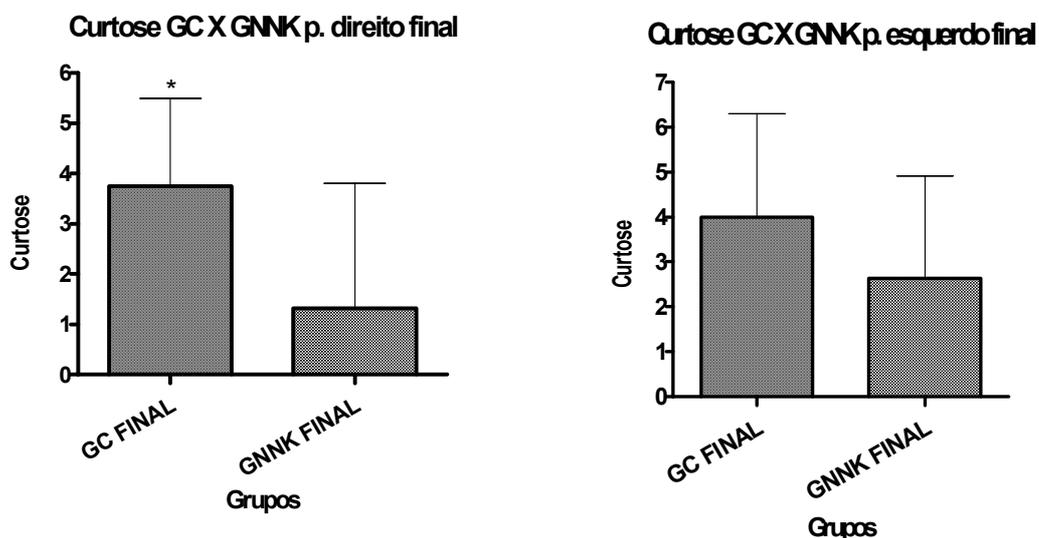


Figura 56: O grupo nitrosamina (GN) apresentou valores de curtose mais baixos que o grupo controle no pulmão direito. Essa diferença foi significativa.

A figura 57 ilustra a interface do software BEBÚI, aplicado originariamente na análise de nódulos pulmonares, para mostrar um exemplo da curva do histograma demonstrando a curtose típica dos grupos controle (GC; CSOL 14,3 e CSOL 42,9). Notar que a formação da curva é apiculada demonstrando, maior concentração de pixels na faixa de densidade predominantemente negativa no extremo esquerdo do gráfico.

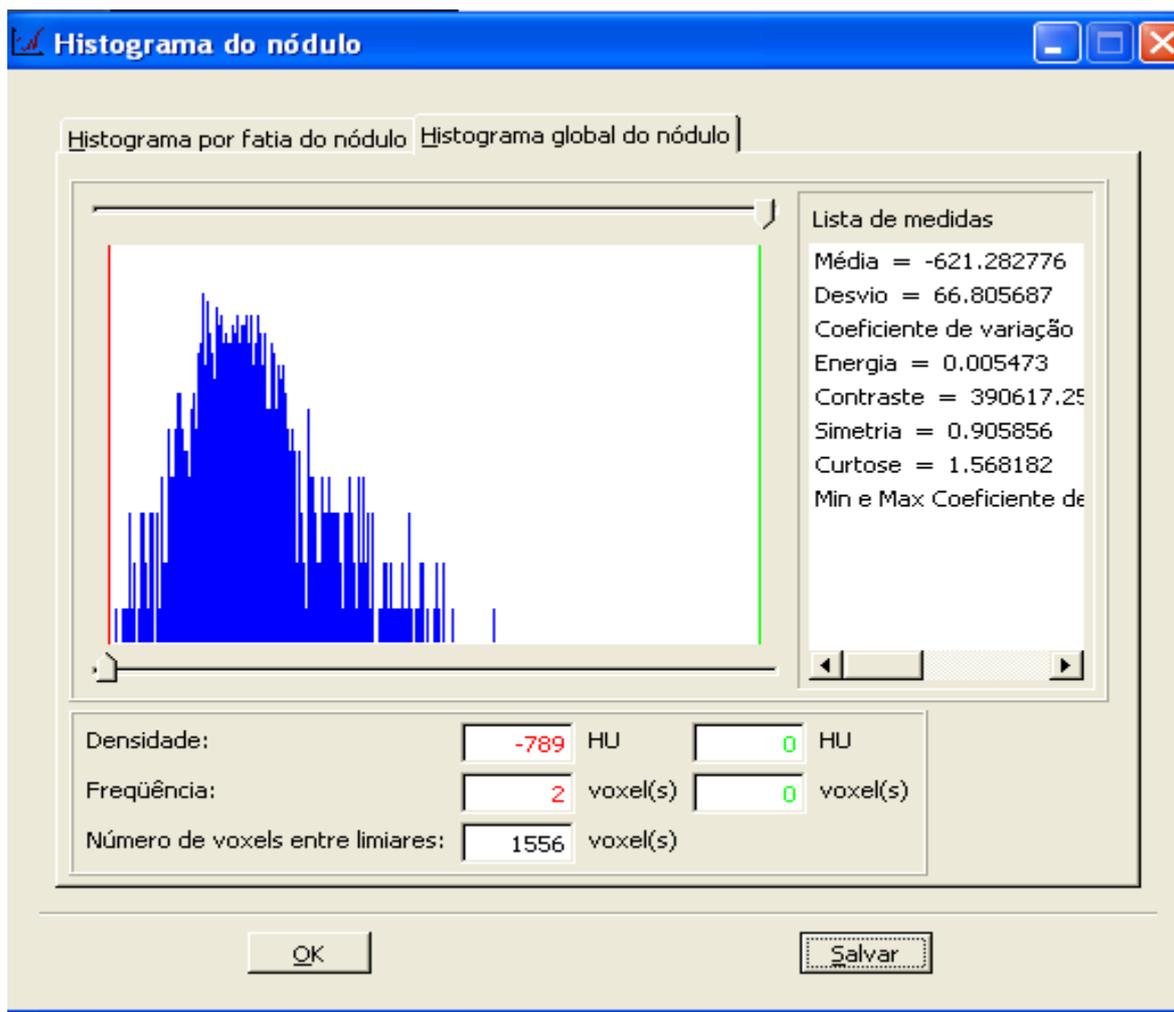


Figura 57: Interface do software BEBÚI mostrando a janela do histograma.

Da análise da curtose foi demonstrado que, diferentemente do grupo que recebeu nitrosamina sem cogumelo do sol (Figura 56), os valores do grupo NSOL 14.3 estão semelhantes ao seu controle (CSOL 14.3) demonstrando um histograma mais apiculado com maior curtose, menos inflamação e menos opacidades, sugerindo um possível efeito protetor exercido pelo cogumelo do sol na dosagem de 14,3 mg (figura 58).

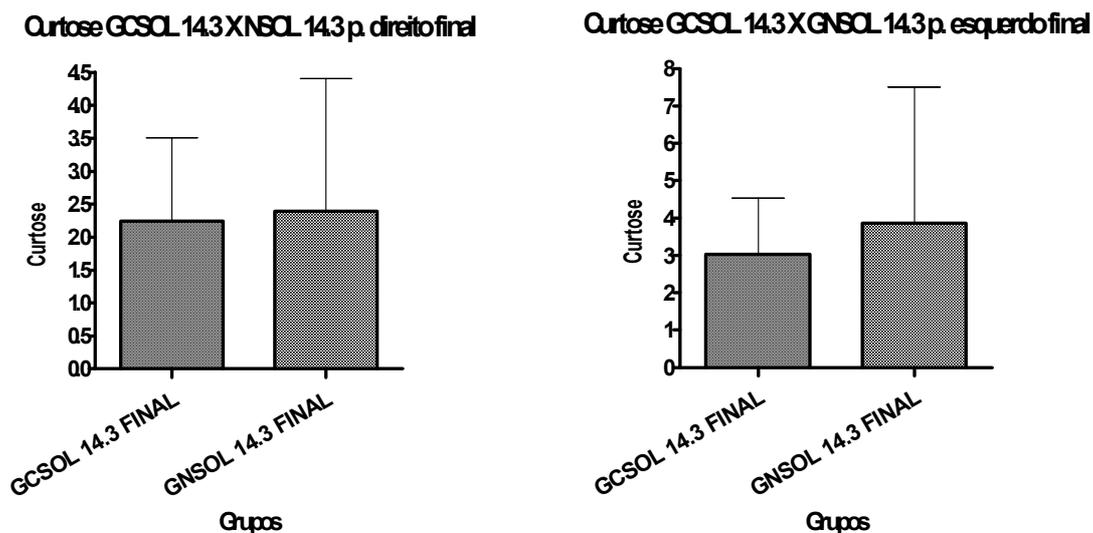


Figura 58: No grupo que recebeu cancerígeno + cogumelo do sol na dose de 14,3 mg, observa-se que não houve diferença significativa com seu respectivo controle em ambos os pulmões.

No entanto, o grupo NNK com cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (GNSOL 42,9) seguiu o mesmo padrão do grupo NNK sem cogumelo do sol apresentando diferença significativa com o seu controle ao nível do pulmão direito, mas não com o esquerdo. Portanto, o cogumelo na dose de 42,9 mg não atenuou a inflamação relacionada à NNK, se coadunando com os achados da microscopia. No pulmão esquerdo não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 59).

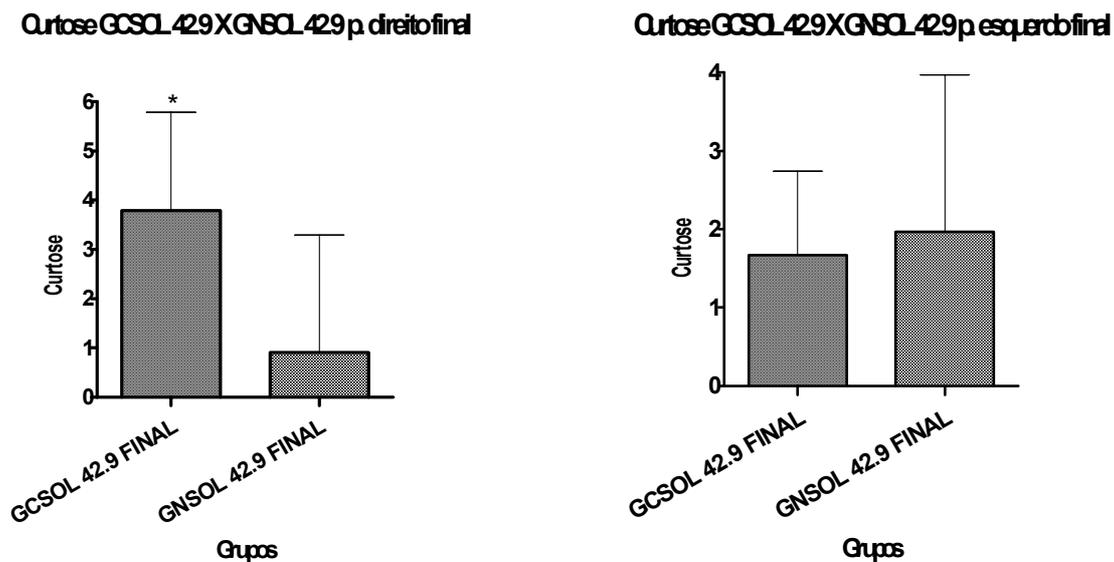


Figura 59: No pulmão direito, há diferença estatisticamente significativa entre os grupos. O GNSOL 42,9 apresentou valores de curtose mais baixos que o GCSOL 42,9. No pulmão esquerdo não houve diferença.

A figura 60 ilustra a interface do *software* BEBÚI evidenciando um perfil de histograma pulmonar de um animal que recebeu nitrosamina apenas ou com cogumelo do sol a 42,9 mg. Notar a diferença de distribuição em relação à figura 57. A curva apresenta-se mais plana, mais achatada, demonstrando a distribuição de pixels em direção a áreas de densidade mais elevadas, característica de condensações.

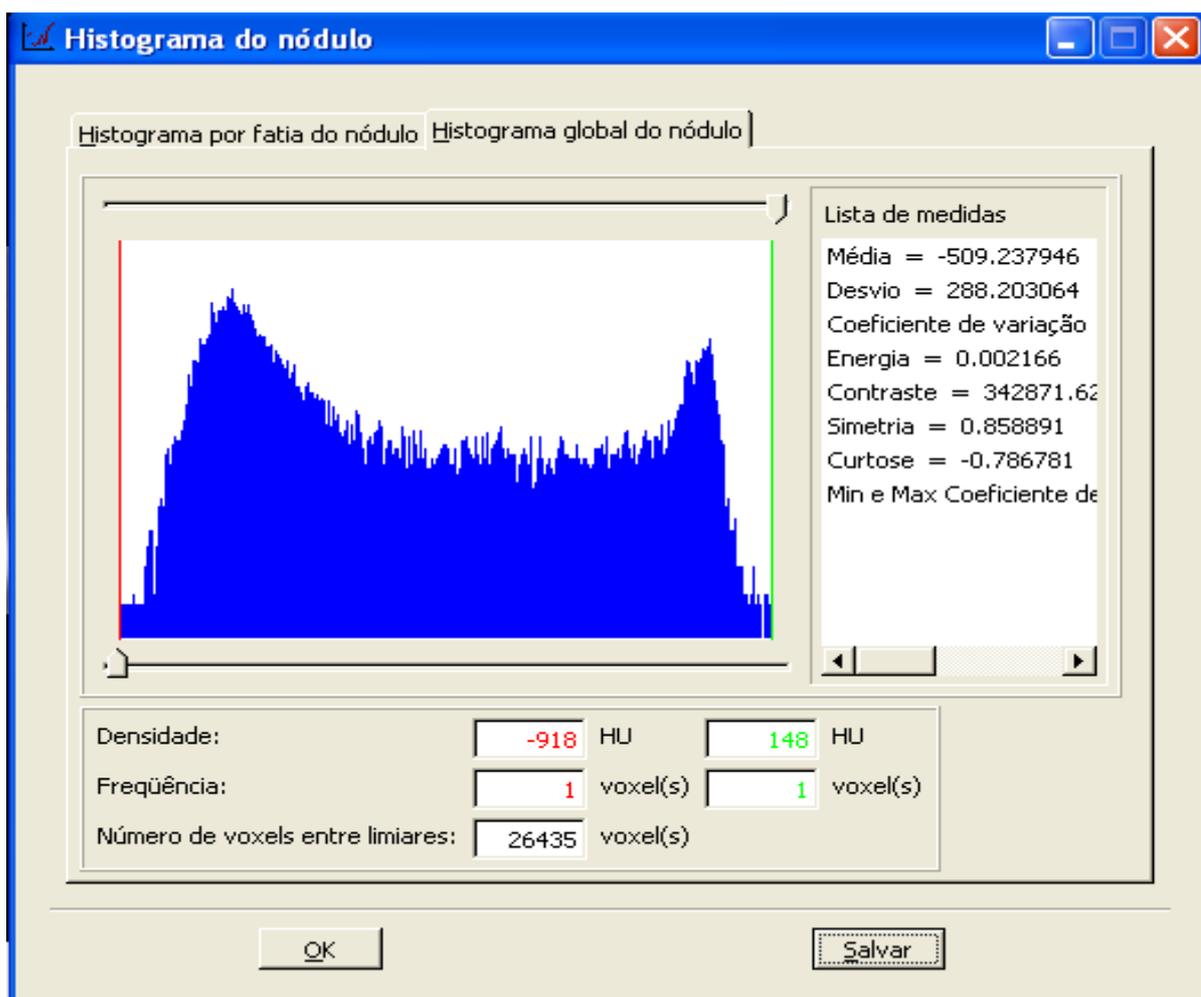


Figura 60: Exemplo da curva do histograma representativa da curtose do grupo nitrosamina (GN) e do grupo nitrosamina com cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (GNSOL 42.9).

5.9 – Ilustração dos Resultados

A seguir estão exemplificadas, para ilustração dos resultados do experimento, as características de cada grupo sob a forma de uma montagem que inclui o corte da Tomografia Computadorizada, o histograma da fatia, o histograma espacial da fatia com pseudo-cores (cores atribuídas a diferentes faixas de densidade) e a fotografia do campo microscópico que representa o grupo. As montagens estão identificadas em relação ao tempo experimental em que foram obtidas.

5.9.1- Imagens de Animal do Grupo Controle (GC) ao Término do Experimento

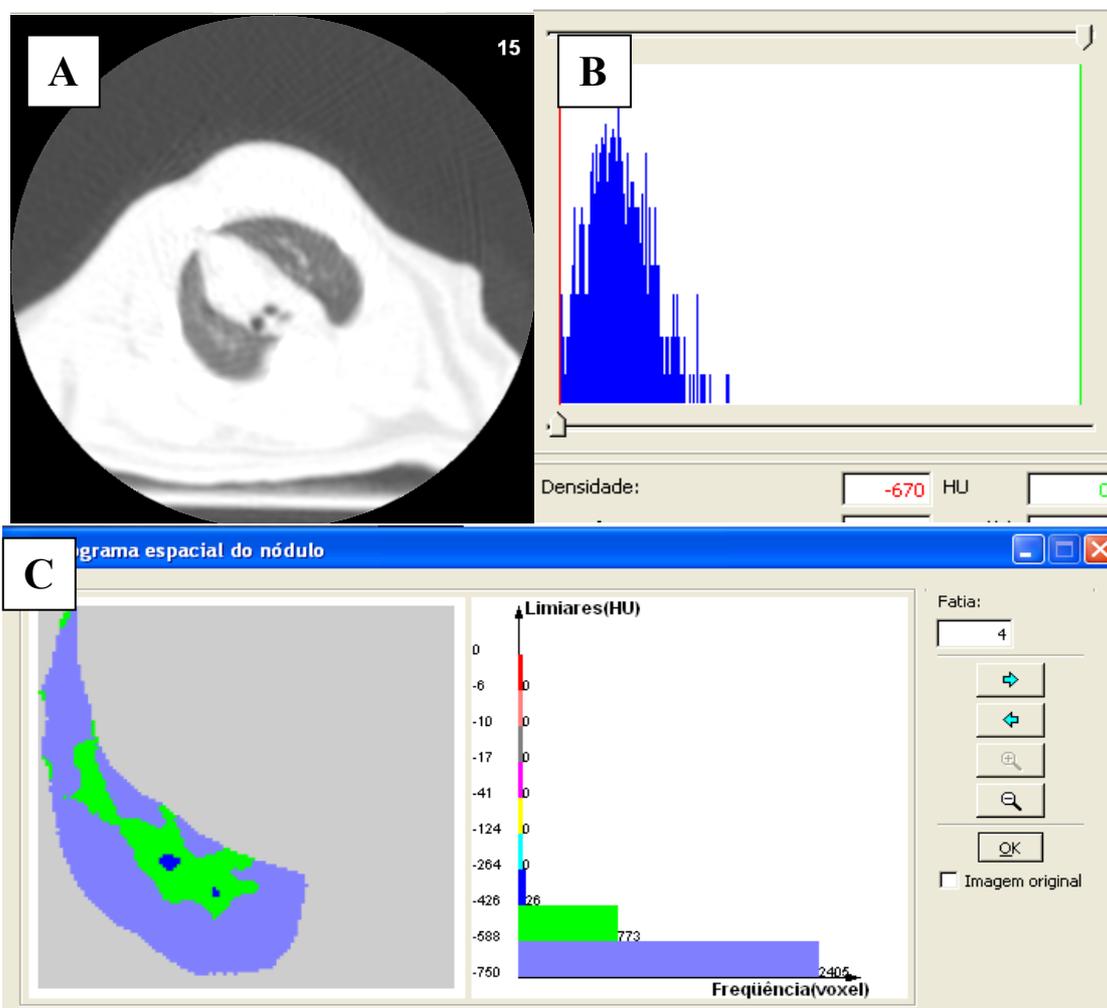


Figura 61: Imagens pulmonares de animal do grupo controle (GC) originada pelo *software* BEBÚI, utilizando a janela do pulmão (A); histograma da imagem do pulmão ao final do experimento (B); histograma espacial de pseudo cores para identificar a localização dos voxels de maior densidade radiológica (C).

5.9.2- *Imagens de Animal do Grupo Nitrosamina (GN) antes da administração*

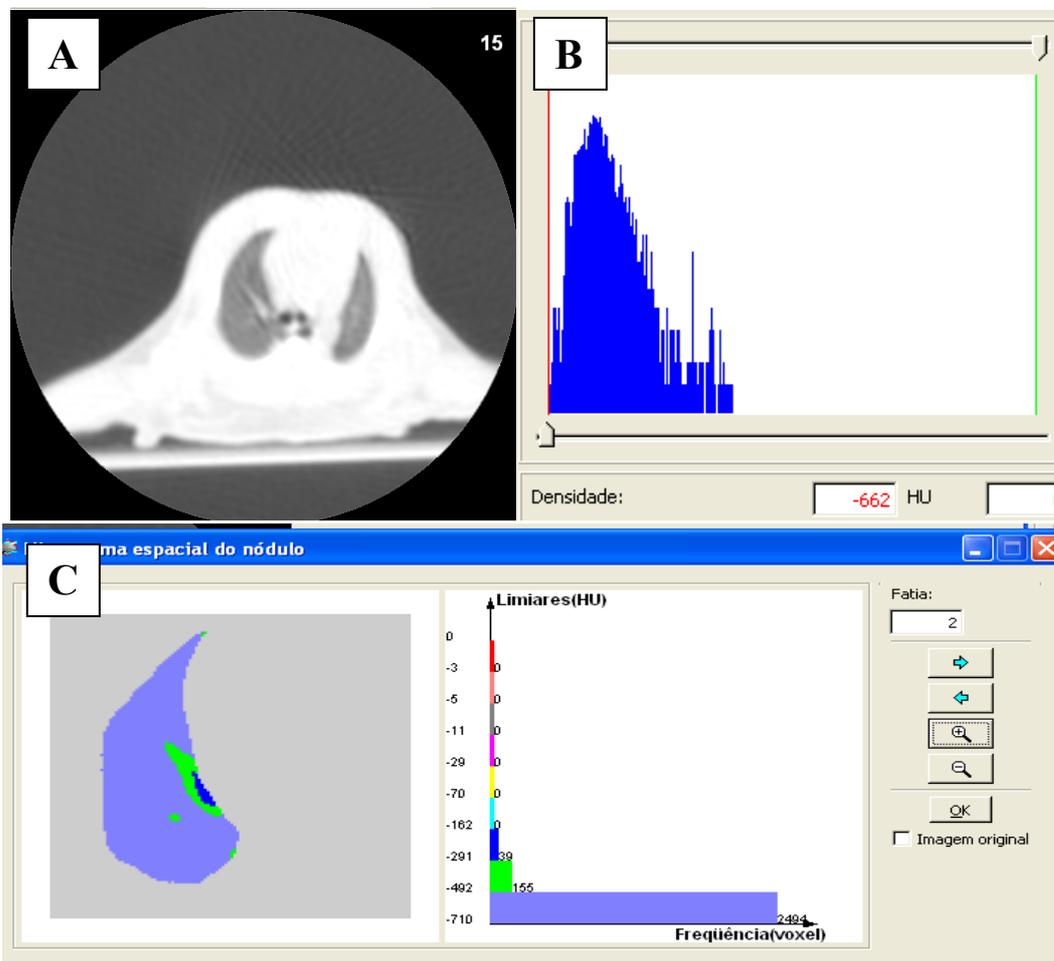


Figura 62: Imagens pulmonares de animal do grupo nitrosamina (GN) originada pelo *software* BEBÚI ao início do experimento, utilizando a janela do pulmão (A); histograma da imagem do pulmão ao início do experimento (B); histograma espacial de pseudo cores para identificar a localização dos voxels de maior densidade radiológica (C). Notar a semelhança no início do experimento com o grupo controle – figura 61 - (GC).

5.9.3- *Imagens de Animal do Grupo Nitrosamina (GN) ao Final do Experimento*

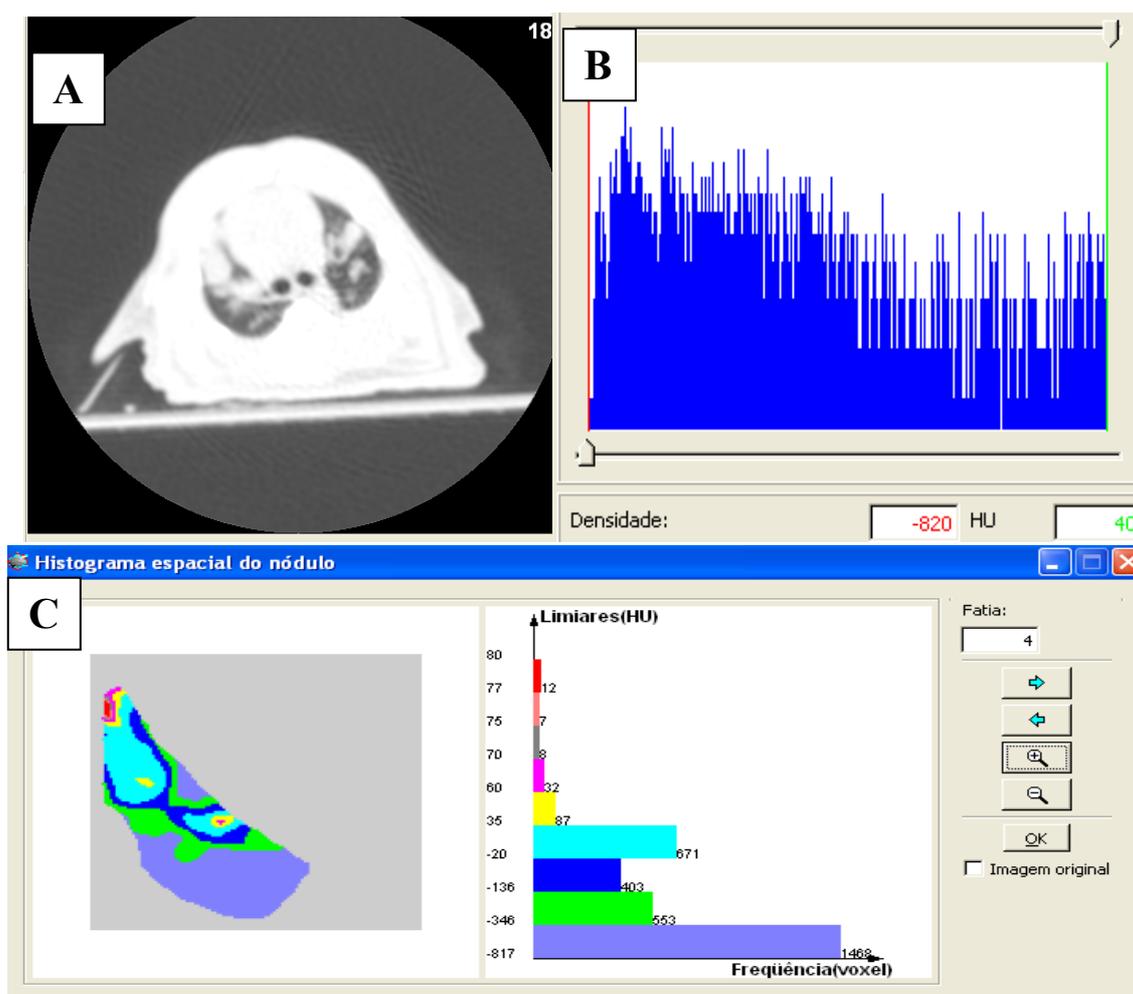


Figura 63: Imagens pulmonares de animal do grupo nitrosamina (GN) originada pelo *software* BEBÚI ao final do experimento, utilizando a janela do pulmão (A); histograma da imagem do pulmão ao final do experimento (B); e histograma espacial de pseudo cores para identificar a localização dos voxels de maior densidade radiológica (C).

5.9.4- Imagens de Animal do Grupo Controle com Cogumelo do Sol na dose de 14,3 mg (CSOL 14,3) ao Término do Experimento

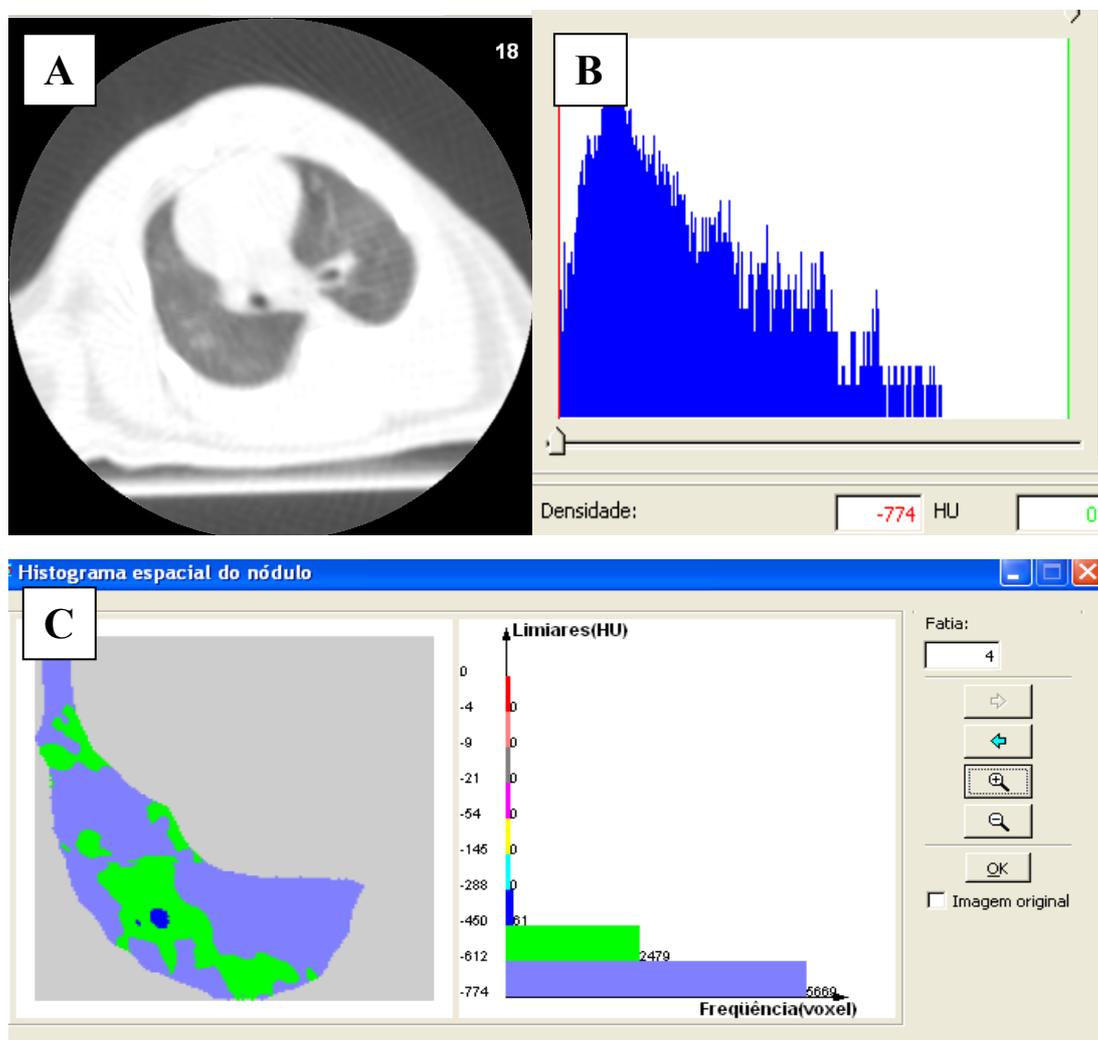


Figura 64: Imagens pulmonares de animal do grupo controle com cogumelo do sol na dose de 14,3 mg (GCSOL 14.3) originada pelo *software* BEBÚI, utilizando a janela do pulmão (A); histograma da imagem do pulmão ao final do experimento (B); histograma espacial de pseudo cores para identificar a localização dos voxels de maior densidade radiológica (C).

5.9.5- Imagens de Animal do Grupo Nitrosamina com Cogumelo do Sol na dose de 14,3 mg (NSOL 14,3) ao Término do Experimento

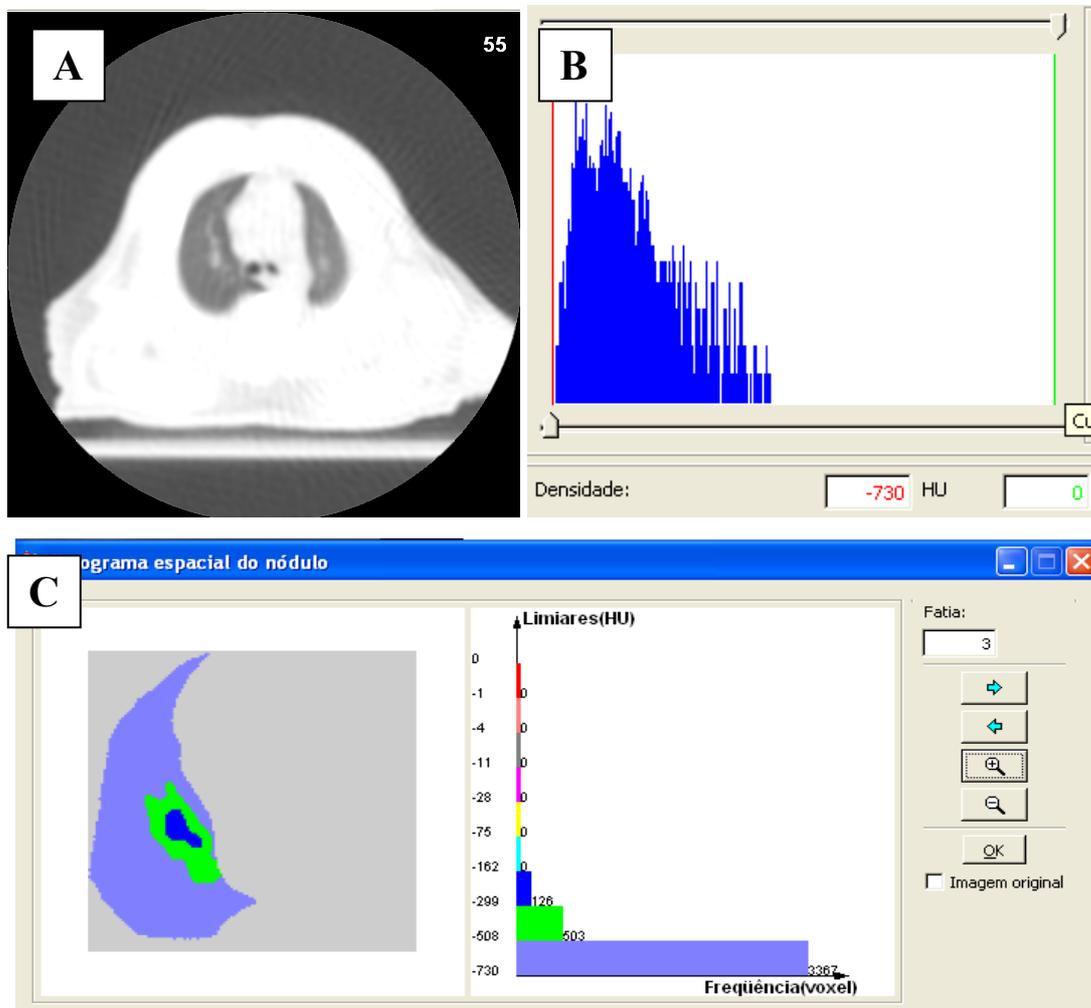


Figura 65: Imagens pulmonares de animal do grupo nitrosamina com cogumelo do sol na dose de 14,3 mg (GNSOL 14,3) originada pelo *software* BEBÚI ao final do experimento, utilizando a janela do pulmão (A); histograma da imagem do pulmão ao final do experimento (B); histograma espacial de pseudo cores para identificar a localização dos voxels de maior densidade radiológica (C).

5.9.6- Imagens de Animal do Grupo Controle com Cogumelo do Sol na dose de 42,9 mg (CSOL 42,9) ao Término do Experimento

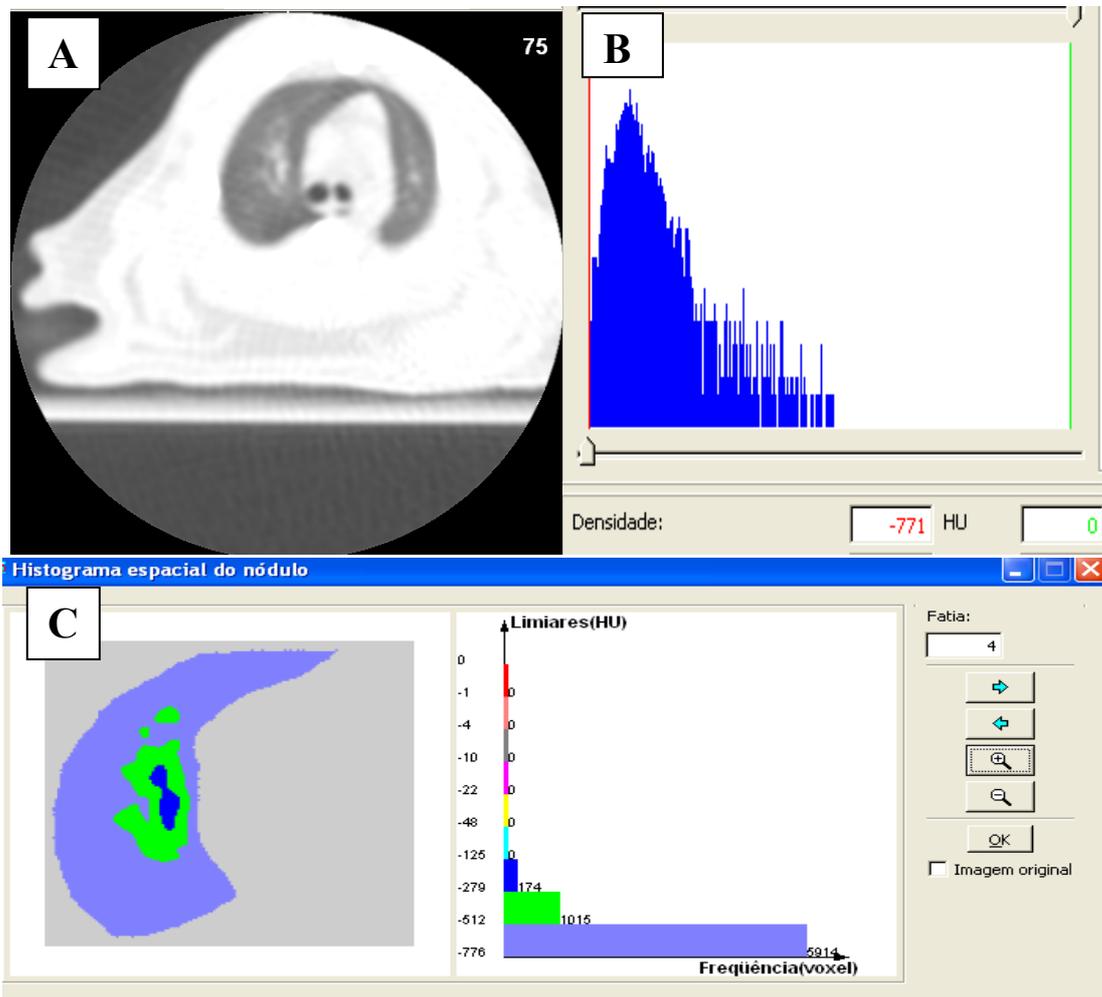


Figura 66: Imagens pulmonares de animal do grupo controle com cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (GCSOL 42.9) originada pelo *software* BEBÚI utilizando a janela do pulmão (A); histograma da imagem do pulmão ao final do experimento (B); histograma espacial de pseudo cores para identificar a localização dos voxels de maior densidade radiológica (C).

5.9.7- Imagens de Animal do Grupo Nitrosamina com Cogumelo do Sol na dose de 42,9 mg (NSOL 42,9) ao Término do Experimento

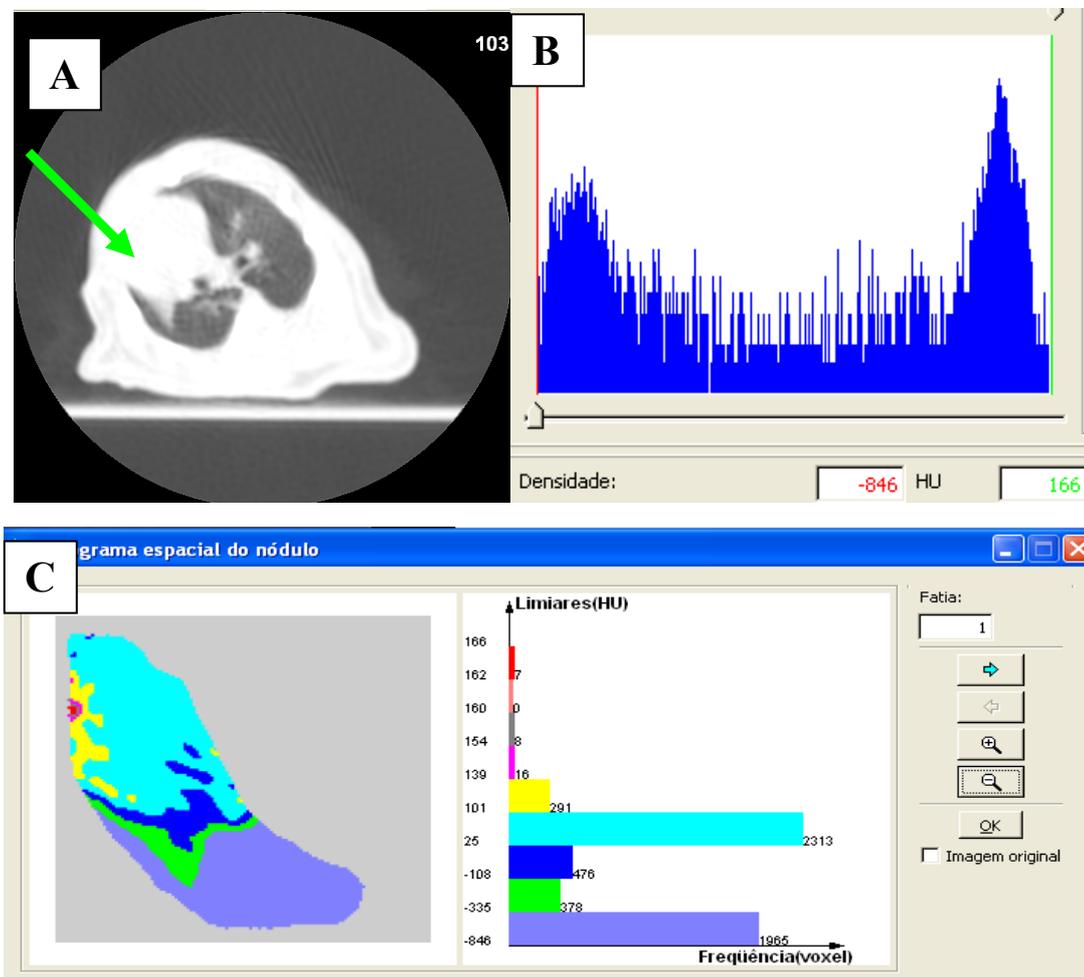


Figura 67: Imagens pulmonares de animal do grupo nitrosamina com cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (GNSOL 42,9) originada pelo *software* BEBÚI ao final do experimento, utilizando a janela do pulmão, mostrando a condensação paramediastinal (A); histograma da imagem do pulmão ao final do experimento (B); histograma espacial de pseudo cores para identificar a localização dos voxels de maior densidade radiológica (C).

6- DISCUSSÃO

Os cogumelos fazem parte da medicina oriental há centenas de anos e são considerados benéficos à saúde. Muitos conhecimentos tradicionais à respeito de suas propriedades medicinais são provenientes do Japão, China, Coréia e Rússia [68]. Um grande número de cogumelos são comercializados e estão sendo divulgados no mercado como alimentos promotores de saúde. Pesquisas relacionadas a estes produtos estão sendo formuladas constantemente [68, 87,88].

Um dos fungos mais estudados atualmente é o *Agaricus Blazei* Murrill ou Cogumelo do Sol, como é popularmente conhecido. Veículos de mídia divulgam seus benefícios e produtos relacionados ao Cogumelo do Sol têm sido vendidos nas prateleiras de lojas comerciais para cidadãos comuns.

A necessidade de mais pesquisas envolvendo o Cogumelo do Sol é, de certa forma, urgente, pois seu consumo está vinculado a melhoras e benefícios relacionados a indivíduos que tenham algum tipo de câncer ou estão em fase de tratamento.

Por outro lado, o câncer de pulmão é um dos cânceres de maior mortalidade e sua prevenção ainda é a forma primária, ou seja, combate ao tabagismo [11]. O presente estudo analisou os efeitos do consumo do extrato de cogumelo do sol no parênquima pulmonar sob estímulo carcinogênico da substância NNK.

Apesar de, no presente material, não ter sido encontrado o desenvolvimento de tumores pulmonares, nos animais que receberam o cancerígeno NNK, foram encontrados processos inflamatórios com perfil histopatológico de pneumonia. No grupo controle houve também o achado

de processo pneumônico embora de menor intensidade do que os grupos que receberam o cancerígeno.

O processo inflamatório, incidente em diferentes graus, mas em todos os grupos, poderia ser explicado pelo estresse no procedimento de gavagem, com broncoaspiração da flora bacteriana. Um dado importante que reforça esta explicação é o fato de haver um certo predomínio de condensações no pulmão direito, mais sujeito à broncoaspiração do que o esquerdo. De fato, anatomicamente, em ratos, o brônquio esquerdo é horizontalizado enquanto o direito é mais verticalizado [89]. Isto facilitaria uma eventual broncoaspiração, quando o animal é colocado em posição ereta, por ocasião do processo de gavagem. A ausência de partículas de corpo estranho ao nível pulmonar corrobora que provavelmente os episódios de aspiração tenham como seu principal inóculo as secreções das vias digestiva e respiratória altas e seus microorganismos. Outro fator que reforça esta hipótese é que o grupo nitrosamina que recebeu apenas gavagem com salina desenvolveu uma pneumonia de grande intensidade.

Cumprido ressaltar que o protocolo experimental previa que todos os animais fossem submetidos a períodos de estresse pela gavagem, injeção de um mesmo volume líquido e anestesia para tomografia computadorizada, ou seja, todos estariam submetidos às mesmas condições facilitadoras para o desenvolvimento pneumônico. Desta forma, acreditou-se que diferenças entre as intensidades das pneumonias pudessem refletir, também, diferenças entre os grupos experimentais. Neste contexto, seria factível supor, conforme evidenciado nos presentes resultados, que a NNK tenha tido realmente um papel adicional, no mínimo facilitador, na gênese da pneumonia, possivelmente por um mecanismo imunossupressor.

Uma explicação para a indução de uma imunodeficiência ao nível pulmonar seria o envolvimento metabólico da NNK através de um mecanismo de alfa-metilhidroxilação que atuaria inibindo mediadores pró-

inflamatórios dos macrófagos alveolares reduzindo o mecanismo de defesa destas células contra células tumorais e invasão bacteriana [23, 90-93]. A NNK agiria por meio das vias citocromo P450, lipoxigenases e cicloxigenases, inibindo, em uma concentração e tempo dependente, a produção de citocinas inflamatórias [23, 59, 116]. Os macrófagos alveolares são as primeiras células a entrar em contato com partículas estranhas e são responsáveis por manter a homeostase pulmonar pela estimulação e inibição de respostas inflamatórias [117]. Eles produzem IL-12, TNF e NO, mas também produzem IL-10 e prostaglandinas E₂ que são potentes inibidores das funções dos macrófagos alveolares e da produção de citocinas inflamatórias. Desta forma, o mecanismo de alfa-metilhidroxilação da NNK, além da atividade carcinogênica, contribuiria para a alta incidência de câncer pulmonar e infecções respiratórias em fumantes ativos e passivos [23, 118,119]. O fato de 14 animais dos 19 que morreram serem do grupo que recebeu NNK sugere que o cancerígeno influenciou de modo considerável o óbito dos mesmos independente dos animais terem morrido à mesa da tomografia ou não, pois destes 14, dez morreram antes da última TC. Foi confirmado pela análise histológica que estes animais apresentaram processo inflamatório característico de pneumonia em estado avançado sendo representados por 3 cruces ou mais em características como congestão, edema, fibrose e exsudatos.

Os animais de todos os grupos tiveram uma grande variação no consumo de ração. Como mostram as figuras 28 a 34, os animais apresentaram uma grande diminuição, seguida de um aumento na ingestão na mesma proporção. Isso sugere um provável mecanismo de compensação nos períodos de diminuição do consumo de forma a recuperar uma possível perda de peso, passível de continuar se houvesse continuidade da baixa ingestão. Este mecanismo provavelmente fez com que os animais

mantivessem uma evolução de peso corporal ao longo de todo o experimento.

Algumas possibilidades para explicar a variação no consumo de ração podem ser elaboradas. Uma delas é que o procedimento de gavagem tivesse distendido o estômago fazendo com que houvesse saciedade, diminuição da ingestão e aumento da mesma após o período de saciedade. O estresse do experimento, das aplicações de carcinógeno ou do óleo de milho podem ter influenciado o consumo. Também o procedimento de anestesia para a realização das tomografias pode ter contribuído para que os animais não ingerissem a ração durante um período, compensando esta perda com o aumento na mesma proporção da ingestão. Os resultados de evolução de peso corporal e consumo de ração foram semelhantes aos encontrados por Barbisan *et al*, 2003 e Kuroiwa *et al*, 2005 [75, 94]. Apesar das variações observadas em relação ao consumo apresentadas anteriormente, todos os grupos estudados mantiveram uma evolução de peso corporal, embora os grupos que receberam o carcinógeno NNK tenham tido uma evolução de peso corporal menor do que os grupos controle, com diferença significativa entre o grupo controle e o grupo nitrosamina (GC x GN) e entre o grupo controle com cogumelo do sol na dose de 42,9 mg e o grupo nitrosamina + cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (CSOL 42,9 x NSOL 42,9). Esta menor evolução de peso poderia, em tese, constituir também um co-fator para o desenvolvimento pneumônico nos grupos afetados.

Laboratorialmente, os resultados obtidos foram surpreendentes, pois apesar de alguns dados como evolução de peso corporal e consumo de ração se apresentarem de acordo com a literatura [75, 94], outros, como o número de células de defesa (linfócitos, leucócitos e monócitos) não se coadunaram com os resultados de outros trabalhos [9, 17, 26].

Nas análises do hemograma, observou-se que apesar da série vermelha apresentar algumas diferenças estatísticas entre os grupos, todos os grupos se mantiveram na faixa de normalidade esperada para roedores [95]. No entanto, em relação à série branca não houve diferença significativa entre os grupos. Isso sugere que o cogumelo do sol utilizado na dosagem deste estudo não foi capaz de aumentar o número de leucócitos, linfócitos, monócitos e neutrófilos em relação ao grupo controle, ou seja, não foi capaz de aumentar a produção e proliferação das células de defesa de forma global. Observou-se também que os grupos nitrosamina, tanto o que recebeu cogumelo do sol, como o que somente recebeu a NNK apresentaram os níveis de polimorfonucleares e morfonucleares iguais ao do grupo controle. Isto sugere que a NNK não foi capaz de afetar quantitativamente estes componentes do sistema imunológico durante o período do experimento. Por outro lado, os grupos que receberam NNK mais o cogumelo do sol apresentaram os mesmos níveis das células de defesa que o grupo controle e o grupo nitrosamina. Ou seja, o cogumelo do sol não foi capaz de alterar os níveis de leucócitos, linfócitos, monócitos e neutrófilos nos animais que receberam o cancerígeno. Os resultados referentes aos glóbulos brancos, principalmente linfócitos, contradizem os resultados encontrados em parte da literatura [9, 17, 26] que relata aumento no número, se bem que a diferenciação dos subtipos de linfócitos não tenha sido estudada. Os presentes resultados são semelhantes aos encontrados por Kazuyoshi e Okumura em 2004 [96] onde não foi observada alteração nos níveis de linfócitos em indivíduos que consumiram o extrato do *Agaricus blazei*.

Os resultados encontrados no presente trabalho referentes aos linfócitos, monócitos e eosinófilos foram também semelhantes ao encontrado por Kuroiwa em 2005 [94], ou seja, sem diferença estatística entre os grupos estudados. No caso dos eosinófilos, observou-se diferença

significativa entre o grupo controle e os grupos nitrosamina com e sem cogumelo do sol. O grupo cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (CSOL 42,9) apresentou diferença significativa com o grupo nitrosamina (GN). Foi observada diferença significativa somente entre o grupo controle (GC) e o grupo nitrosamina (GN).

Apesar das diferenças estatísticas encontradas, os grupos nitrosamina independente de terem recebido o cogumelo do sol por gavagem, apresentaram níveis maiores de contagem de eosinófilos do que os grupos controle com e sem cogumelo do sol. Isto poderia sugerir que, indiretamente, a resposta inflamatória encontrada nos pulmões desses animais possa guardar algum tipo de relação com os eosinófilos, pois em relação aos grupos controle não houve o aumento da contagem destas células. Os demais grupos, também, não apresentaram diferença significativa entre si. Esta eosinofilia pode estar relacionada ao parasitismo intestinal, já que esses animais são convencionais, ou seja, não foram submetidos às barreiras sanitárias. O fato de não terem sido encontrados eosinófilos no pulmão pode corroborar essa hipótese.

Embora não tenha sido verificada diferença significativa da contagem de neutrófilos, todos os grupos que receberam o cogumelo do sol por gavagem estavam com os níveis de neutrófilos maiores do que o grupo controle. Um estudo mostrou que em ratos com inflamação aguda tratados com beta glucana, um princípio ativo do cogumelo do sol, apresentaram níveis de neutrófilos maiores (66%) em relação ao início do experimento [97].

Os níveis de colesterol, neste modelo experimental, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos e todos se mantiveram na faixa de normalidade para roedores (colesterol: 40 a 130 mg/100 ml). O resultado encontrado é diferente do relatado por Kuroiwa, 2005 [94] que apresentou diferença estatística nos níveis de colesterol entre

dois grupos que receberam diferentes doses do extrato do *Agaricus blazei*. Em relação aos níveis de triglicerídeos, apesar das diferenças estatísticas encontradas, todos os grupos encontram-se na faixa de normalidade para roedores (triglicerídeo: 26 a 145 mg/100 ml) [95]. Tem sido demonstrado que a beta glucana atua reduzindo o LDL colesterol e aumentando o HDL colesterol melhorando o perfil lipídico e reduzindo o risco de doenças cardiovasculares [98-100]. No presente estudo não foram analisadas as frações lipídicas, somente o colesterol total, que não se mostrou alterado nos grupos estudados.

Nas análises do hepatograma, o gráfico da fosfatase alcalina mostra que houve diferença significativa entre os grupos controle com e sem cogumelo do sol e os grupos nitrosamina com e sem cogumelo do sol. A fosfatase alcalina é uma enzima amplamente distribuída no fígado, placenta, intestino, rins e leucócitos. Seus níveis aumentados podem sugerir malignidade hepática o que aparentemente não ocorreu neste estudo pela macroscopia do fígado ser considerada normal à autópsia. Na realidade, os animais do grupo nitrosamina apresentaram níveis diminuídos desta enzima em relação aos grupos controle, mas apesar dessa diminuição, todos os grupos se mantiveram na faixa de normalidade de fosfatase alcalina para roedores e isto se coaduna com a literatura [101-104]. A enzima aspartato aminotransferase (TGO) também está distribuída nos leucócitos e seu aumento indica dano à célula hepática. No gráfico da aspartato aminotransferase, somente o grupo controle com cogumelo do sol na dose de 14,3 mg (CSOL 14,3) e o grupo nitrosamina com cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (NSOL 42,9) foram diferentes estatisticamente dos demais grupos. Entretanto, todos os grupos encontram-se dentro dos parâmetros de normalidade descritos na literatura [85]. A alanina aminotransferase (TGP), também apresenta níveis aumentados em caso de dano na célula hepática. No gráfico da alanina aminotransferase, somente o grupo NSOL 42.9

obteve diferença significativa com todos os demais grupos, mas este grupo, assim como os demais, encontram-se dentro da faixa de normalidade descrita na literatura [101-104]. Não houve diferença significativa entre os grupos controle e seus respectivos pares experimentais.

A enzima gama glutamil transpeptidase está aumentada em hepatopatias e em doenças pulmonares. No gráfico da gama glutamil transpeptidase foi observado que não houve diferença estatística em relação aos grupos controle. Não foi possível comparar os grupos controles com os grupos nitrosamina, pois o equipamento não leu atividade enzimática para GGT nos grupos que receberam o cancerígeno. A expressão de GGT é baixa no pulmão se comparada a outros tecidos como o fígado, epidídimo e pâncreas [105-107]. Os baixos níveis de atividade de GGT no pulmão é atribuída à abundância de glutathione no revestimento fluido epitelial pulmonar [107-109]. Estudos mostraram que a perda da atividade de GGT no pulmão devido ao estresse prejudica a homeostase da glutathione na superfície pulmonar e predispõe à injúria por oxidantes inalatórios [107]. Devido a esses estudos, foi sugerido que a ausência de atividade enzimática de GGT nos animais experimentais possa ter ocorrido devido ao estresse na tentativa de induzir um tumor pulmonar através do carcinógeno NNK. No presente trabalho, fica, portanto, indeterminado se a baixa da GGT teria papel contributivo para a lesão pulmonar. Também não foi encontrada na literatura pesquisada [107] referência específica de interferência da NNK na metodologia da dosagem da GGT.

Quanto às análises de composição nutricional e minerais do cogumelo do sol, verificou-se que, quando foram comparados os resultados obtidos com o rótulo do produto obtido dos produtores de São Paulo, os valores de proteínas, lipídeos, fibras insolúveis, cálcio, ferro e fósforo são menores do que os descritos no referido rótulo. Comparando os resultados obtidos com o estudo de Ying Liu *et al*, 2008 [68], observa-se que os

valores de cálcio e fósforo são maiores do que o apresentado na literatura e os valores de proteína, lipídeos, fibras insolúveis são menores. Essas diferenças são normais e aceitáveis devido às diferenças de linhagem do cogumelo, parte estudada (micélio, corpo frutificado), modo de plantio, geografia, clima, solo, condições de processamento e armazenamento. Destaca-se na composição do produto a quantidade de proteínas. Embora não tenha sido avaliada a qualidade dessa proteína, o baixo teor de lipídeos e a quantidade de fibras sugerem que o cogumelo do sol seja um alimento propício para indivíduos dislipidêmicos e/ou diabéticos. O cogumelo do sol também apresenta boa quantidade de minerais destacando-se o ferro, cálcio e o fósforo, sendo os valores de ferro e fósforo muito próximos aos recomendados para indivíduos adultos [110].

A técnica de Hematoxilina-Eosina é o método mais comumente utilizado para classificação inicial do câncer de pulmão [111], sendo também capaz de demonstrar processos inflamatórios com exsudato alveolar como ocorreu no presente trabalho.

Nas análises referentes à microscopia, as diferenças encontradas em relação às diferentes características dos processos inflamatórios pulmonares observados nas lâminas e classificadas de 0 a 4 cruces de acordo com o grau de alteração, mostraram menos cruces nos grupos controle em relação aos grupos nitrosamina. Na análise estatística foi observada diferença significativa somente entre os grupos controle versus nitrosamina (GC x GN) e entre os grupos controle com cogumelo do sol na dose de 42,9 mg versus o grupo nitrosamina com cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (CSOL 42,9 x NSOL 42,9) para a presença de exsudato alveolar e exsudato bronquiolar. Isto sugere que o cancerígeno NNK na dose utilizada foi capaz de associar-se a alterações pulmonares significantes em relação aos grupos controle. A dose de cogumelo do sol de 42,9 mg, não foi capaz de atenuar ou melhorar o processo inflamatório ocorrido nesse grupo.

Por outro lado, os animais que receberam a dose de 14,3 mg de cogumelo do sol + cancerígeno NNK não apresentaram diferença significativa com seu respectivo controle sem NNK para exsudato alveolar e bronquiolar. Isso sugere que a dose de 14,3 mg de cogumelo do sol foi mais efetiva na promoção de proteção contra a inflamação encontrada.

A inflamação aguda é mediada principalmente por formação de exsudatos e migração de leucócitos, especialmente neutrófilos. Padilha *et al* avaliaram a atividade antiinflamatória do extrato aquoso do *A. blazei* em diversos modelos de inflamação crônica [112]. Os animais tratados com cogumelo do sol neste estudo demonstraram uma melhor resposta e tiveram a migração de neutrófilos inibida para a cavidade peritoneal quando comparada com o grupo controle. Este achado foi justificado, por uma atividade imunomodulatória nos macrófagos ter diminuído a migração celular induzida pela secreção do fator de necrose tumoral alfa, interleucina 8 e secreção de óxido nítrico pela formação de células no interior da cavidade peritoneal. Estas células, os macrófagos, estavam presentes antes do estímulo para a inflamação, inibindo fatores de regulação quimiotáticos assim como inibindo a migração de outras células até o sítio de inflamação [112, 113]. Estes dados sugerem que o extrato do *A. blazei* possa ser utilizado mais como agente profilático, devido à estimulação do sistema imune, do que como um agente que atua diretamente sobre componentes do processo inflamatório [112].

No presente estudo, a dose de cogumelo do sol de 14,3 mg demonstrou exercer um certo efeito protetor contra a inflamação pela ausência de diferença significativa com seu respectivo controle, sem NNK. A dose de cogumelo de 14,3 mg é a dose usualmente recomendada para o consumo humano, sendo adaptada ao animal para melhor tolerância no processo de gavagem.

Processos inflamatórios têm sido associados ao desenvolvimento de diversas doenças pulmonares incluindo o câncer. Especialmente em experimentos utilizando ratos, o processo inflamatório pulmonar é freqüente e diretamente relacionado à incidência de câncer pulmonar [114,115]. Neste particular, em relação aos dados histológicos, o cogumelo do sol pode ter promovido um fator de proteção à inflamação pulmonar, conforme a classificação em cruzes dos grupos. Para as outras alterações observadas (congestão, edema, bronquiectasia, abscesso, metaplasia e fibrose) não houve diferença estatística.

Nas imagens observadas nas tomografias somente em poucos casos houve a formação de um pseudotumor ou pseudonódulo, predominando as condensações difíceis de mensurar individualmente. As opacidades encontradas se apresentaram muito difusas e dispersas pelo pulmão do animal e muitas vezes com limites pouco precisos e textura tênue, que, no entanto, puderam ser confirmadas por zonas de maior densidade.

Foram analisadas as imagens da tomografia ao início e ao final do experimento. As imagens, realizadas ao longo de todo o experimento, não foram apresentadas no presente estudo, pois sua finalidade era de servir de acompanhamento ao desenvolvimento do esperado processo neoplásico, verificando se o tempo previamente traçado era suficiente ou se seria necessário prolongar por mais um período o experimento. Somente com a necrópsia, ao final do experimento, verificou-se que se tratavam de processos inflamatórios.

A mensuração das condensações encontradas na tomografia após a delimitação manual de cada uma seria um processo muito sujeito a erros pela multiplicidade de segmentações. Numerosas imagens em vidro fosco poderiam não ser corretamente delimitadas ou omitidas, principalmente considerando artefatos de movimento, passíveis de acontecer em animais respirando durante o exame. Por isso, optou-se por delimitar todo o

pulmão, fatia a fatia, um de cada vez, já que seus limites anatômicos são mais bem definidos do que as condensações em si. A delimitação do pulmão se iniciava pela janela do mediastino e se complementava com a janela do pulmão para evitar erros de interpretação visual. Uma vez delimitado o pulmão, foi possível apresentar um resultado mais fidedigno, pois todas as condensações ficaram englobadas. O conjunto de condensações era então evidenciado pelo histograma que acusava o aparecimento de voxels de maior densidade radiológica, em meio ao universo de voxels de muito baixa densidade característica do parênquima pulmonar.

Das formas de análise do histograma optou-se por utilizar a curtose, que traduz as condensações pelo achatamento da curva do pulmão normal que é, caracteristicamente, apiculada, pela concentração de voxels de densidade muito baixa. Além disso, das análises realizadas, a curtose foi a mais coincidente com os achados da microscopia, considerada o padrão ouro para avaliação de inflamações pulmonares e câncer.

Os resultados encontrados da curtose confirmam os achados da microscopia, através de uma outra forma de avaliação, independente da primeira. Em relação ao grupo controle versus o grupo nitrosamina (GC x GN), no pulmão direito, há diferença significativa e observa-se que o grupo nitrosamina apresenta a curva do histograma mais achatada, por seus valores estarem próximos de zero, ou seja, há mais condensações no pulmão do grupo que recebeu a NNK. No pulmão esquerdo, apesar de não haver diferença estatística entre os grupos, nota-se que o grupo que recebeu a nitrosamina (GN) apresentou valores de curtose mais baixos que o grupo controle, coadunando-se com o ocorrido no pulmão direito. Para o grupo controle com cogumelo do sol na dose de 42,9 mg versus o grupo nitrosamina + cogumelo do sol na dose de 42,9 mg (CSOL 42.9 x NSOL 42.9), no pulmão direito, há diferença estatisticamente significativa entre os

grupos. O GNSOL 42.9 apresentou valores de curtose mais baixos que o GCSOL 42.9 (fig. 61) demonstrando o desenvolvimento de opacidades e curva mais achatada do GNSOL 42.9. Isto sugere, que o cogumelo na dose de 42,9 mg não foi eficaz no combate à inflamação relacionada à NNK, comprovando os achados da microscopia. No pulmão esquerdo não houve diferença significativa entre os grupos, o que poderia ser explicado pela anatomia brônquica do rato como já foi descrito.

Já no grupo que recebeu cancerígeno e cogumelo do sol na dose de 14,3 mg (CSOL 14.3), observa-se que não houve diferença significativa com seu respectivo controle em ambos os pulmões, demonstrando então, um possível efeito protetor exercido pelo cogumelo do sol nesta dosagem. Os valores de curtose do grupo NSOL 14.3 estão semelhantes ao CSOL 14.3 exibindo um histograma mais apiculado com maior curtose, menos inflamação e menos opacidades. As comparações foram propositadamente realizadas somente com o seu respectivo controle, para possibilitar a análise de uma só variável, neste caso a utilização ou não da NNK. Talvez a beta-glucana, o elemento destacado como imunoestimulador do cogumelo do sol desempenhe um papel nesta proteção.

Pela comprovação da ativação de macrófagos pela beta-glucana e inibição dos mediadores pró-inflamatórios pela NNK, produzidos por macrófagos alveolares pode-se sugerir um sítio de competição entre a beta-glucana e a NNK junto a receptores nos macrófagos alveolares, onde enquanto um agente atua para estimular células que combate a progressão de tumores e a invasão bacteriana, o outro atua inibindo estes fatores de proteção e estimulando respostas tipo 2 polarizadas responsáveis pelo crescimento e progressão de inflamações e tumores [120,121].

Apesar da expectativa em contrário, no presente modelo experimental não foi encontrada a presença de células neoplásicas ou

células atípicas no parênquima pulmonar com o uso da NNK. Entretanto, como relatado, foram achados processos inflamatórios pneumônicos mais acentuados nos grupos que receberam a nitrosamina NNK. Em modelos de carcinogênese química, Miranda *et al*, 2003 [122], relatou que a frequência de mutações genéticas secundárias à agressão de tecido ocorre continuamente e são reparadas por mecanismos de defesa celular que controlam o crescimento, a latência e a apoptose celular, enfatizando a necessidade da continuidade do processo inflamatório relacionado à carcinogênese. Ouyang e Huang [123] enfatizaram em 2006 a importância da continuidade da agressão de indução do câncer afirmando que em muitos casos a inflamação aguda, diferentemente da crônica, pode contribuir para a redução da carcinogênese.

Mediante os estudos citados [122, 123] sugere-se que o período de observação da carcinogênese poderia ser ampliada com a finalidade de verificar se o referido processo inflamatório surgido poderia preceder o aparecimento de tumores e se a dose de *A. Blazei* utilizada, seria capaz de inibir ou atenuar o crescimento e desenvolvimento dos tumores assim como o fez com as inflamações pulmonares.

7- CONCLUSÕES

- A substância NNK na dose utilizada neste modelo experimental não foi capaz de desenvolver uma neoplasia pulmonar nos animais estudados no período determinado, mas relacionou-se ao aparecimento de um processo inflamatório de natureza pneumônica.
- O conteúdo de macro e microminerais da amostra de *A. blazei* apresentou diferenças nas quantidades de nutrientes descrita no rótulo do produto.
- Todos os grupos tiveram aumento evolutivo de peso durante o experimento, embora os grupos que receberam o carcinógeno NNK com e sem cogumelo do sol tenham cursado com uma evolução de peso menor do que os grupos controle com e sem cogumelo do sol.
- A curtose da curva do histograma corroborou os resultados da microscopia onde a dose de cogumelo de 42,9 mg não foi capaz de atenuar ou impedir o processo inflamatório pulmonar associado à NNK.
- No presente modelo experimental as diferenças encontradas nas análises histopatológicas do exsudato alveolar e bronquiolar, bem como a análise da curtose do histograma mostram que a dose de cogumelo do sol de 14,3 mg se mostrou capaz de atenuar o processo inflamatório pulmonar de natureza pneumônica associado à NNK.

Este projeto foi apoiado por recursos pelo projeto CAPES-PROCAD nº 044/2006 e FAPERJ nº E-26170515/2006.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chang, R: Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition Review*. 1996; 54: S91-S93.
2. Mallita P, Suonpää K, Pironen V: Functional property of edible mushrooms. *Nutrition*. 2000; 16: 694-696.
3. James A Talcott, Jack A Clark, Insu P Lee: Measuring perceived effects of drinking an extract of basidiomycetes *Agaricus blazei* Murrill: a survey of Japanese consumers with cancer. *BCM Complementary and alternative medicine*. 2007; 7: 32-40.
4. Eisenberg DM, Kessler RC, Foster C, Norlock FE, Calkins DR, Debanco TL: Unconventional medicine in the United States. Prevalence, costs and patterns of use. *N Engl. J. Med*. 1993; 328: 246-252.
5. Cassileth BR, Lusk EJ, Staouse TB, Bodenheimer BJ: Contemporary unorthodox treatments and practitioners. *Ann Intern Med*. 1984; 101: 105-112.
6. Astin JA: Why patients use alternative medicine: results of a national study. *JAMA*. 1998; 279: 1548-1553.
7. Boon H, Stewart M, Kennard MA, Gray R, Sawka C, Brown JB, McWilliam C, Gavin A, Baron RA, Aaron D, Haines-Kamka T: Use of complementary alternative medicine by breast cancer survivors in Ontario: prevalence and perceptions. *J Clin Oncol*. 2000; 18: 2515-2521.
8. Eisenberg DM, Davis RB, Ettner SL, Appel S, Wilkey S, Van Rompay M, Kessler RC: Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: Results of a follow up national survey. *JAMA*. 1998; 280: 1569-1575.
9. Mizuno TK: *Agaricus blazei* Murrill medicinal and dietary effects. *Food Rev. Int*. 1995; 11: 167-172.

10. Firenzuoli F, Gori L, Di Simone L, Morsuillo M: Internet information about herbal products and dietary supplements. *Recenti Prog. Med.* 2006; 97: 189-192.
11. Ministério Da Saúde. Instituto Nacional Do Câncer. Coordenação Nacional de Controle do Tabagismo – CONTAPP. “Falando sobre o Câncer e seus Fatores de Risco”. Rio de Janeiro, 1996.
12. IARC: Coffee, tea, mate, methylxanthines and methylglyoxal. IARC. Lyon, France. Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans: caffeine. 1991; 51: 291-390.
13. Park PG, Merryman J, Orloff M, Schuller HM: Beta adrenergic mitogenic signal transduction in peripheral lung adenocarcinoma: implications for individuals with preexisting chronic lung disease. *Cancer Res.* 1995; 55(16): 3504-3508.
14. Mackay J. & Eriksen M: *The Tobacco Atlas* (World Health Organization, Geneva), 2002.
15. World Health Organization. *The World Health Report 2002: Reducing Risks, Promoting Health Life.* (WHO, Geneva, 2002).
16. Takaku T, Kimura Y, Okuda H: Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanisms of action. *J.Nutr.* 2001; 131: 1409-1413.
17. Fujimiya Y, Suzuki Y, Oshiman K, Kobori H, Moriguchi K, Nakashima H, Matumoto Y, Takahara S, Ebina T, Katakura R: Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis. *Cancer Immunol Immunother.* 1998; 46: 147-159.
18. Yazawa Y, Yokota M, Sugiyama K: Antitumor promoting effect of an active component of polyporus ergosterol and related compounds on rat urinary bladder carcinogenesis in a short-term test with concanavalin A. *Biol Pharm Bull.* 2000; 28: 1298-1302.

19. Ohno N, Furukawa M, Miura NN, Adachi Y, Motoi M, Yadomae T: Antitumor beta glucan from the cultured fruit body of *Agaricus Blazei*. Biol. Pharm. Bull. 2001; 24: 820-828.
20. Kasai H, He LM, Kawamura M, Yang PT, Deng XW, Munkanta M, Yamashita A, Terunuma H, HIRAMA M: IL-12 production induced by *Agaricus blazei* fraction H (ABH) involves toll-like receptor (TLR). Complementary and alternative medicine. 2004; 1(3): 259-267.
21. D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante NM, Chehimi J, Kubin M, Aste M, Chan SH, Kobayashi M, Young D, Nickbarg E: Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. J. Exp. Med. 1992; 176: 1387-1398.
22. Trinchieri G and Gerosa: Immunoregulation by interleukin-12. J. Leukoc. Biol. 1996; 59:505-511.
23. Proulx L, Castonguay A, Bissonnette E: Cytokine production by alveolar macrophages is down regulated by the α -methylhydroxylation pathway of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). Carcinogenesis. 2004; 25 (6):997-1003.
24. Banchereau J, Briere F, Caux C: Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev. Immunol. 2000; 18: 767-811.
25. Smyth MJ, Taniguchi M, Street SE: The antitumor activity of IL-12: mechanism of innate immunity that are dose and model dependent. J. Immunol. 2000; 165: 2665-2670.
26. Takimoto H, Wakita D, Kawaguchi K, Kumazawa Y: Potentiation of cytotoxic activity in naïve and tumor-bearing mice by oral administration of hot-water extracts from *Agaricus blazei* fruiting bodies. Biol. Pharm. Bull. 2004; 27 (3): 404-406.
27. Firenzuoli F, Gori L, Lombardo G: The medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murrill: review of literature and pharmaco-toxicological problems. eCAM. 2008; 5 (1): 3-15.

28. Janeway CA Jr.: The immune system evolved to discriminate infections nonself from noninfectious self. *Immunol Today*. 1992; 13: 6-11.
29. Akramienė D, Kondrotas A, Didžiapetrienė J, Kėvelaitis E: Effects of b-glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)*. 2007; 43 (8): 597-606.
30. Brown GD, Gordon S: Fungal b-glucans and mammalian immunity. *Immunity* 2003; 19:311-15.
31. Ishibashi K, Miura NN, Adachi Y, Ohno N, Yadomae T: Relationship between solubility of Grifolan, a fungal 1,3-b- D-glucan, and production of Tumor Necrosis Factor by macrophages *in vitro*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001; 65: 1993-2000.
32. Lee DY, Ji IH, Chang HI, Kim CW: High-level TNF-a secretion and macrophage activity with soluble b-glucans from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002; 66: 233-8.
33. Eynde BJ, Bruggen P: T cell defined tumor antigens. *Curr. Opin. Immunol*. 1997; 9(5): 684-693.
34. Stone BB, Clarke AE: *Chemistry and Biology of (1-3)- β-glucans*, La Trobe University Press, Australia, 1992.
35. Whistler RL, Bushway AA, Singh PP, Nakahara W, Tokuzen R: Noncytotoxic, antitumor polysaccharides. *Adv.Carbohydr. Chem. Biochem*. 1976; 32: 235-275.
36. Novak M, Vetvicka V: Glucans as Biological Response Modifiers. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*. 2009; 9: 67-75.
37. Muta T, Iwanaga S: The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 1996; 8: 41-7.
38. Battle J, Ha T, Li C, Della Beffa V, Rice P, Kalbfleisch J: Ligand binding to the (1-3)- β- D-glucan receptor stimulates NFκB activation, but not apoptosis in U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 249: 499-504.

39. Vetvicka V, Thornton BP, Ross GD: Soluble glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b-opsonized target cells. *J. Clin. Invest.* 1996; 98: 50-61.
40. Zimmerman JW, Lindermuth J, Fish PA, Palace GP, Stevenson TT, DeMong DE: A novel carbohydrate-glycosphingolipid interaction between a beta -(1-3)-glucan immunomodulator, PGG-glucan, and lactosylceramide of human leukocytes. *J Biol Chem.* 1998; 273: 22014-20.
41. Taylor PR, Brown GD, Reid DM, Willment JA, Martinez-Pomares L, Gordon S: The b-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol.* 2002; 169: 3876-82.
42. Kim GY, Choi GS, Lee SH, Park YM: Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* enhances through the upregulation of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha from peritoneal macrophages. *J Ethnopharmacol.* 2004; 95: 69-76.
43. Diluzio NR: *Springer Semin. Immunopathol.* 1999; 8: 387-400.
44. Mohagheghpour N, Dawson M, Hobbs P, Judd A, Winant R, Dousman L, Waldeck N, Hokama L, Tuse D, Kos F: Glucans as immunological adjuvants. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1995; 383: 13-22.
45. Rios-Hernandez M, Dos-Santos NJ, Silvia-Cardoso, Bello-Garciga JL, Pedroso M: Immunopharmacological studies of beta-1,3-glucan. *Arch. Méd. Res.* 1994; 25: 179-180.
46. World Health Organization. Cancer. Fact sheet n° 297. Feb 2006. Geneva: World Health Organization; c2007 [cited 2007 Oct 10]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/print/html>.

47. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Incidência de Câncer no Brasil. Estimativa 2008. 2007; Endereço eletrônico: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/versaofinal.pdf>
48. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: Incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2009. ISBN 978-85-7318-161-6 (versão eletrônica). <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/versaofinal.pdf>
49. Hildegard Schuller M, Porter B, Riechert A, Walker K, Schmoyer R: Neuroendocrine lung carcinogenesis in hamsters is inhibited by green tea or theophylline while the development of adenocarcinomas is promoted: implications for chemoprevention in smokers. *Lung Cancer*. 2004; 45: 11-18.
50. Daniel PB, Walker WH, Habener JF: Cyclic AMP signaling and gene regulation. *Annu Rev Nutr*. 1998; 18: 353-383.
51. Heasley LE: Autocrine and paracrine signaling through neuropeptide receptors in human cancer. *Oncogene*. 2001; 20(13): 1563-1569.
52. Shi ST, Wang Z-Y, Smith TJ, Hong J-Y, Chen W-F, Ho C-T, Yang CS: Effects of green tea and black tea on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone bioactivation, DNA methylation and lung tumorigenesis in A/J mice. *Cancer Res*. 1994; 54: 4641-4647.
53. Xu Y, Ho C-T, Amin SG, Han C, Chung F-L: Inhibition of tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis in A/Jmice by green tea and its major polyphenol as antioxidants. *Cancer Res*. 1992; 52: 3875-3879.
54. Embola CW, Sohn OS, Fiala ES, Weisburger JH: Induction of UDP-glucuronosyltransferase 1 (UDP-GT1) gene complex by green tea in male F344 rats. *Food Chem Toxicol*. 2002; 40(6): 841-844.

55. Chung FL: The prevention of lung cancer induced by a tobacco-specific carcinogen in rodents by green and black tea. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1999; 220(4): 244-248.
56. Rehm S, Devor DE, Henneman JR, Ward JM: Origin of spontaneous and transplacentally induced mouse lung tumors from alveolar type II cells. *Exp. Lung Res.* 1991; 17(2): 181-195.
57. Sakai K, Kohri T, Mizunuma T, Ichinose T, Sagai M, Kishino Y: Immunohistochemical localization of surfactant protein A in *N*-bis (2-hydroxypropyl) nitrosamine-induced lung tumors in rats. *Tokushima J. Exp. Méd.* 1996; 43(1/2): 55-59.
58. Hecht SS: Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2003; 3:733-744.
59. Hecht SS: Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific *N*-nitrosamines. *Chem. Res. Toxicol.* 1998; 11: 559-603.
60. Belinsky SA, Foley JF, White CM, Anderson MW, Maronpot RR: Dose-response relationship between O⁶-methylguanine formation in Clara cells and induction of pulmonary neoplasia in the rat by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1butanone. *Cancer Res.* 1990; 50: 3772-3780.
61. Schlöbe D, Hölze D, Richter E, Tricker AR: Determination of tobacco-specific nitrosamine hemoglobin and lung DNA adducts. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 2002; 43:346.
62. Hecht SS: Human urinary carcinogen metabolites: biomarkers for investigating tobacco and cancer. *Carcinogenesis.* 2002; 23: 907-922.
63. Travis WD, Travis LB, Devesa SS: Lung cancer. *Cancer.* 1995; 75: 191-202.
64. Hecht SS, Adams JD, Numoto S, Hoffmann D: Induction respiratory tract tumors in Syrian golden hamsters by a single dose of 4-

(methylnitrosamino)-1-(3pyridyl)-1-butanone (NNK) and the effect of smoke inhalation. *Carcinogenesis*. 1983; 4: 1223-1229.

65. Hecht SS, Trushin N, Castonguay A, Rivenson A: Comparative carcinogenicity and DNA methylation in F344 rats by 4 - (methylnitrosamino)-1-(3pyridyl)-1-butanone and N-nitrosodimethylamine. *Cancer Res*. 1986; 46: 498-502.

66. Hecht SS, Lin D, Castoguy A: Effects of α -deuterium substitution on the mutagenicity of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). *Carcinogenesis (Lond.)*. 1984; 4:305-310.

67. Fung-Lung C, Mingyao W, Abraham R, Michael JI, Joel C, Brian P, Chi-Tang H, Shantu GA: Inhibition of lung carcinogenesis by black tea in fischer rats treated with a tobacco-specific carcinogen: caffeine as an important constituent. *Cancer Research*. 1998; 58: 4096-4101.

68. Liu Y, Fukuwatari Y, Okumura K, Takeda K, Ishibashi K, Furukawa M, Ohno N, Mori K, Gao M, Motoi M: Immunomodulating activity of *Agaricus brasiliensis* KA21 in mice and human volunteers. *eCAM*. 2008; 5(2) 205:219.

69. Hecht SS, Hoffmann D: Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke. *Carcinogenesis*. 1988; 6:875-884.

70. Schuller HM: Mechanisms of smoking-related lung and pancreatic adenocarcinoma development. *Nature Rev. Cancer*. 2002; 2: 455-463.

71. West KA: Rapid akt activation by nicotine and a tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells. *J. Clin. Invest*. 2003; 111: 81-90.

72. IAL – Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. IVa. ed. Brasília – DF. Prol Editora. 2006; p. 1019.

73. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis. 15^o ed. Washington, D. C., 1990.

74. Mahan LK, Stump SE: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. 11^aed. São Paulo, Editora Rocca, 2005.
75. Barbisan FL, Spinardi-Barbisan TLA, Moreira LE, Salvadori FMD, Ribeiro RL, Eira FA, De Camargo VLJ: *Agaricus blazei* (Himematsutake) does not alter the development of rat diethylnitrosamine-initiated hepatic preneoplastic foci. *Cancer Sci.* 2003; 94: 188-192.
76. da Silva Sousa João Rodrigo Ferreira, Silva Aristófanés Corrêa, de Paiva Anselmo Cardoso, Nunes Rodolfo Acatauassú: Methodology for automatic detection of lung nodules in computerized tomography images. *Computer Methods and Programs in Biomedicine.* 2010; 98: 1-14.
77. Nunes Rodolfo Acatauassú, Corrêa Silva Aristófanés, Higa Cláudio, Saito Eduardo Haruo: Nódulo pulmonar solitário. *Pulmão RJ.* 2009; 1: 6-11.
78. Silva Aristófanés Corrêa, Silva Erick Corrêa, Paiva Anselmo Cardoso de, Nunes Rodolfo Acatauassú: Diagnosis of Lung Nodule using Moran's Index and Geary's Coefficient in Computerized Tomography Images. *Pattern Analysis and Applications.* 2008; 11: 89-99.
79. Silva Aristófanés Corrêa, Silva Erick Corrêa, Paiva Anselmo Cardoso de, Nunes Rodolfo Acatauassú, Gattass Marcelo: Diagnosis of Solitary Lung Nodules using the local form of Ripley's K function applied to three-dimensional CT data. *Computer Methods and Programs in Biomedicine.* 2008; 90: 230-239.
80. Silva Aristófanés Corrêa, Gattass Marcelo, Carvalho Paulo Cezar Pinto: Analysis of spatial variability using geostatistical functions for diagnosis of lung nodule in computerized tomography images. *Pattern Analysis and Applications.* 2005; 7(3): 227-234.
81. Silva AC, Carvalho PCC, Gatass, M: Analysis of spatial variability using geostatistical functions for diagnosis of lung nodule in computerized tomography images. *Patterns Analysis e Applications.* 2004; 7(3): 227-234.

82. Nunes RA: Estudo Volumétrico de Nódulos Pulmonares. Tese de Livre-Docência. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 2004.
83. Silver M: Estatística para Administração. São Paulo: Atlas, 2000.
84. Levine DM, *et al*: Estatística: Teoria e Aplicações. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A. – LTC, 2000
- 85 Teixeira GN: Caracterização da hepatotoxicidade produzida pelo veneno de cascavel da região do Vale do Paraíba em fígado de ratos. 2003. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos.
86. Junqueira LCU, Carneiro J: Histologia básica. 10^a ed. 2004.
87. Kodama N, Asakawa A, Inui A, Masuda Y, Nanba H: Enhancement of cytotoxicity of NK cells by D-Fraction, a polysaccharide from *Grifola frondosa*. *Oncol Rep.* 2005; 13: 497-502.
88. Masaki K, Hirotake K: Delayed cell cycle progression and apoptosis induced by hemicellulase-treated *Agaricus blazei*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2006; in press, available on-line.
89. Kittel B, Ruehl-Fehlert C, Morawietz G, Klapwijk J, Elwell MR, Lenz B, Gerard O'sullivan M, Roth DR, Wadsworth PF: Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice – Part 2 A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp. Toxic Pathol.* 2004; 55: 413–431.
90. Higashimoto Y, Shimada Y, Fukuchi Y, Ishida K, Shu C, Teramoto S, Sudo E, Matsuse T, Orimo H: Inhibition of mouse alveolar macrophage production of tumor necrosis factor alpha by acute *in vivo* and *in vitro* exposure to tobacco smoke. *Respiration.* 1992; 59: 77-80.
91. Yamaguchi E, Itoh A, Furuya K, Miyamoto H, Abe S, Kawakami Y: Release of tumor necrosis factor-alpha from human alveolar macrophages is decreased in smokers. *Chest.* 1993; 103: 479-483.

92. Hendrzak JA, and Brunda MJ: Interleukin-12. Biologic activity, therapeutic utility and role in disease. *Lab. Invest.* 1995; 72: 619-637.
93. Van der Pouw Kraan TC, Boeije LC, Snijders A, Smeenk RJ, Wijdenes J, Aarden LA: Regulation of IL-12 production by human monocytes and the influence of prostaglandin E₂. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1996; 795: 147-157.
94. Kuroiwa Y, Nishikawa A, Imazawa T, Kanki K, Kitamura Y, Umemura T, Hirose M: Lack of subchronic toxicity of an aqueous extract of *Agaricus blazei* Murrill in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology.* 2005; 43: 1047-1053.
95. Markness, John E & Wagner, Joseph E: *Biologia clínica de coelhos e roedores.* 1993. 1ª edição, Livraria Roço Ltda.
96. Kazuyoshi T, Okumura K: CAM and NK cells: eCAM. 2004; 1(1): 17-27.
97. LeBlanc BW, Albina JE, Reichner JS: The effect of PGG- β -glucan on neutrophil chemotaxis *in vivo*. *J Leukoc Biol.* 2006; 79: 667-75.
98. Anderson JW: Dietary fibre, complex carbohydrate and coronary artery disease. *Can J Cardiol.* 1995; 11: 55G–62G.
99. Reyna-Villasmil N, Bermudez-Pirela V, Mengual-Moreno E, *et al*: Oat-derived beta-glucan significantly improves HDLC and diminishes LDLC and non-HDL cholesterol in overweight individuals with mild hypercholesterolemia. *Am J Ther.* 2007; 14: 203–12.
100. Kapur NK, Ashen D, Blumenthal RS: High density lipoprotein cholesterol: an evolving target of therapy in the management of cardiovascular disease. *Vasc Health Risk Manag.* 2008; 4: 39–57.
101. Quaresma AB, d'Acampora AJ, Tramonte R, Farias DC, Joly FS: Histological study of the liver and biochemistry of the blood of Wistar rats following ligation of right hepatic duct: *Acta Cir. Bras.* [serial on the Internet]. 2007, Jan-Febr; 22 (1).

102. Rodrigues ER, Moreti DLC, Martins CHG, Kasai A, Stoppa MA, Alves EG, Paz K, Lopes RA, Sala MA, Petenusci SO: Estudo de parâmetros bioquímicos em ratos sob ação de planta medicinal. [XI. *Chiococca Alba* (L.) Hitchc.]: Rev. Bras. Pl. Méd. 2006; 8: 169-172.
103. Dantas AJ, Ambiel RC, Cuman NKR, Baroni S, Bersani-Amado AC: Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. Acta Sci. Health Sci. 2006; 28: 165-170.
104. Araújo Lima AAL, de Ramalho LNZ, Zucoloto S, Bagnato VS, Silva Júnior O de C: The study os alkaline phosphatase in cirrhotic and hepatectomized rats after laser irradiation. Acta Cir. Bras. 2001; v.16 suppl 1. São Paulo.
105. Albert Z, Orłowska J, Orłowska M, and Szewczuk A: Histochemical and biochemical investigations of gamma-glutamyl transpeptidase in the tissues of man and laboratory rodents. Acta Histochem. 1964; 18: S78–S89.
106. Tate S and Meister A: Gamma-Glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects. Mol Cell Biochem. 1981; 39: 357–368.
107. Chang JJ, Liu Y, Brown LA, Marc RE, Klings E, Martin JB: Gamma-Glutamyl transferase deficiency results in lung oxidant stress in normoxia. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2002; 283: L766–L776.
108. Cantin AM, North SL, Hubbard RC, Crystal RG: Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. J Appl Physiol. 1987; 63: 152–157.
109. Davis WB, Pacht ER: Extracellular antioxidant defenses. In: The Lung: Scientific Foundations (1st ed.), edited by Crystal RG and West JB. New York: Raven. 1991; 2: 1821–1827.
110. Mahan K, Escott-Stump S: Alimentos, nutrição e dietoterapia. 10ª edição. Editora Roca.

111. Franklin WA: Diagnosis of lung cancer-pathology of invasive and preinvasive neoplasia. *Chest*. 2000; 117: 80-89.
112. Padilha M, Avila AAL, Pergentino JCS, Cardoso LGV, Perazzo FF, Carvalho JCT: Anti-Inflammatory Activity of Aqueous and Alkaline Extracts from Mushrooms (*Agaricus blazei* Murill). *Journal of Medicinal Food*. 2009; 12(2): 359-364.
113. Higaki M, Abe K, Kikukawa T, Ekuchi F, Yoshimoto H: *Agaricus blazei* Murr extracts as immunoregulators and anti-inflammatory drugs. *Jpn Kokai Tokkyo Koho*. 1999; 13.
114. Agen B, Maas LM, Zwingmann IH, Schooten FJV, Kleinjans JCS: B[a]P adduct formation and induction of human epithelial lung cell transformation. *Environ Mol Mutagen*. 2001; 30: 287-92.
115. Gerde P, Muggenburg BA, Lundborg M, Dahl AR: The rapid alveolar absorption of diesel soot-absorbed benzo[a]pyrene: bioavailability, metabolism and dosimetry of an inhaled particle-borne carcinogen. *Carcinogenesis*. 2001; 22 (5): 741-749.
116. Smith TJ, Stoner GD, Yang CS: Activation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in human lung microsomes by cytochromes P450, lipoxygenase, and hydroperoxides. *Cancer Res*. 1995; 55: 5566-5573.
117. Thepen T, Kraal G, Holt PG: The role of alveolar macrophages in regulation of lung inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1994; 28: 200-206.
118. Meyaard L, Hovenkamp E, Otto SA, Miedema F: IL-12-induced IL-10 production by human T cells as a negative feedback for IL-12-induced immune responses. *J. Immunol*. 1996; 156: 2776-2782.
119. Isler P, de Rochemonteix BG, Songeon F, Boehringer N, Nicod LP: Interleukin-12 production by human alveolar macrophages is controlled by the autocrine production of interleukin-10. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 1999; 20: 270-278.

120. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A: Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002; 23: 549-555.
121. Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L: The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol. Today.* 1992; 13: 265-270.
122. Miranda DGN, Jamnik S, Santoro IL, Uehara C: Avaliação do escarro induzido no diagnóstico do carcinoma brônquico. *Ver. Brás. Cancerol.* 2003; 49 (2): 91-98.
123. Lu H, Ouyang W, Huang C: Inflammation, a key event in câncer development. *Mol Cancer Res.* 2006; 4(4): 1-13.

9 - ANEXOS

Anexo 1:

- Marca comercial da ração: Guabinutrilabor ratos e camundongos
- Indicação: Animais de laboratório (ratos e camundongos)
- Composição nutricional (por Kg do produto): umidade máxima (13%), proteína bruta mínimo (22%), extrato etéreo mínimo (4%), matéria fibrosa máxima (10%), matéria mineral máxima (10%), cálcio máximo (1,2%), fósforo mínimo (0,8%), vitamina A (24.000 UI), vitamina D (4.000 UI), vitamina E (60 mg), vitamina K (6,0 mg), tiamina (8,0 mg), riboflavina (30 mg), piridoxina (14 mg), vitamina B12 (40 mcg), pantotenato de cálcio (50 mg), ácido fólico (3,0 mg), niacina (80 mg), biotina (0,1 mg), colina (1.200 mg), cobalto (1,5 mg), cobre (10 mg), ferro (50 mg), iodo (2 mg), manganês (70 mg), selênio (0,1 mg), zinco (70 mg).

- Marca comercial da ração: Labina. Ração para animais de Laboratório.
- Indicação: Produto destinado para a alimentação de ratos, camundongos e hamsters de laboratório.
- Composição nutricional (por Kg do produto): biotina (0,16 mg), colina (2800 mg), ácido fólico (13 mg), ferro (180 mg), cobre (30 mg), zinco (110 mg), manganês (110 mg), iodo (1 mg), selênio (0,20 mg), cobalto (2 mg), vitamina A (25577 UI), vitamina E (82 mg), vitamina D (4000 UI), vitamina K (6,40 mg), sódio (2,80 g), magnésio (1,70 g), ácido propiônico (1540 mg), vitamina B₁₂ (40 mcg), niacina (220 mg), ácido pantotênico (90 mg), piridoxina (11 mg), riboflavina (12 mg), tiamina (11 mg).

***Agaricus blazei* Murrill and attenuation of pulmonary inflammatory process induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridil)-1-butanone (NNK)**

Croccia, Carolina¹; Pinto, Luis Felipe Ribeiro²; Sabaa-Srur, Armando Ubirajara Oliveira³; Vaz, Luis Carlos⁴, Trotte, Marcele Nogueira de Sousa⁵; Tessarollo, Bernardo⁶; Silva, Aristófanes Corrêa⁷; Matos, Haroldo José⁸; Nunes, Rodolfo Acatauassú⁹

1. Nutricionista e Mestranda em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas pelo Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
2. Professor Adjunto do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia Alberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e Coordenador de Pós-Graduação do Instituto Nacional de Câncer (INCA).
3. Professor Adjunto do Departamento de Nutrição Básica Experimental da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e Presidente da Sociedade Brasileira de Processamento de Frutas e Hortaliças.
4. Professor Adjunto da Disciplina de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (FCM-UERJ).
5. Mestre em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Fluminense e Bolsista da Unidade Docente Assistencial de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Pedro Ernesto da UERJ..
6. Médico radiologista do Serviço de Radiologia e Diagnóstico por Imagem do Hospital Universitário Pedro Ernesto e Coordenador do Serviço de Radiologia e

Diagnóstico por Imagem da Policlínica Piquet Carneiro - Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

7. Professor Adjunto do Departamento de Engenharia Elétrica da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).
8. Professor Adjunto do Departamento de Tecnologias de Informação e Educação em Saúde da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).
9. Professor Adjunto do Departamento de Cirurgia Geral da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Professor dos Cursos de Pós-Graduação em Ciências Médicas e Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas da Faculdade de Ciências Médicas e Livre-Docente pela Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

Author Correspondence:

Author: Carolina Croccia

Address: 28 de Setembro Avenue, rear , Biomedic Center, FCM, 1st floor.

Vila Isabel. Zipcode: 20561-030. Rio de Janeiro. Brazil.

E-mail: ccroccia@gmail.com

ABSTRACT

One of the most studied fungi is currently the *Agaricus blazei* Murrill, for its nutritional and therapeutic properties as anti-inflammatory or adjunct in cancer chemotherapy. Oral administration of aqueous extract of *A. blazei* in doses of 14.3mg and 42.9mg in *Wistar* rats was examined in order to observe parenchymal lung damage induced by carcinogenic 4-methylnitrosamino-1-3 pyridyl-1-butanone (NNK). NNK has not been able to produce a lung tumor along the experiment, but it was related to pulmonary inflammation (pneumonia). Lungs of animals that received NNK showed a higher inflammation than control group on histopathological examination and in analysis of kurtosis obtained from global histogram of CT lung image. Dose of 14.3mg of *A. blazei* was more effective in attenuate pulmonary inflammatory process during this experiment model.

Key words: *A. blazei*, carcinogenesis, lung inflammation, inflammatory process.

INTRODUCTION

Mushrooms for many years have been used as food for its nutritional value and/or as a therapeutic agent [1,2]. They are part of a group of substances considered “complementary alternative medicine” (CAM), used by many patients as a complementary treatment against cancer [3-5]. *Agaricus blazei* Murrill mushroom, known as “Cogumelo do SolTM”, is a native specimen from Brazil, especially in southern regions from Sao Paulo state. It is traditionally used as food for cancer prevention, diabetes, hyperlipidemia, arteriosclerosis, and chronic hepatitis [6]. *A. blazei* Murrill is also used as an adjuvant agent on chemotherapy or after removal of a malignant tumor [2]. Recently, Padilha *et al* evaluated the anti-inflammatory activity of aqueous extract of *A. blazei* in several models of chronic inflammation. The animals treated with *A. blazei* in this study demonstrated a better response and neutrophil migration into the peritoneal cavity was inhibited when compared with the control group. This finding was linked to an immunomodulatory activity on macrophages [7,8].

β -glucan, a substance found in *A. blazei*, has been identified as a high molecular weight carbohydrate that is present during the formation of the mushroom body, also called the fruiting of this fungus [9,10]. Activity receptors for β -glucan has been reported in a variety of leukocytes, including macrophages, neutrophils, eosinophils and natural killer cells (NK), and non-immune cells including endothelial cells, alveolar epithelial cells and fibroblasts [11]. Despite being used as an immunomodulatory substance present in nature and used as medicine and/or food, more research involving the β -glucan should be conducted to improve biotherapeutic responses and understanding of molecular mechanisms [9-14].

4-methylnitrosamino-1-3-pyridyl-1-butanone (NNK) is a carcinogenic compound that induces development of lung tumors, regardless the route of administration, and facilitates infections by immunosuppressive action [15]. NNK produces primarily adenocarcinoms in rodents [15, 16]. According to some studies NNK action inhibits formation of pro-inflammatory mediators such as TNF, IL-12, and NO from alveolar macrophages, decreasing defense mechanism of these cells against tumor cells and bacterial invasion [17-21].

The main objective of the present study is to analyze the effects of ingestion of *Agaricus blazei* Murrill in lung parenchyma of rats submitted to carcinogen stimulation by nitrosamine NNK.

MATERIALS AND METHODS

Raw materials

A. blazei crude dried powder was acquired from producers located at Sao Paulo state – Brazil and immediately transported by air in coolers to the Bromatology and

Food Technology Laboratory of the Institution of Nutrition of Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), where it was milled to become flour.

Experimental animals

Male rats (*Rattus norvegicus*, *Albinus rodentia mammalia*, Wistar strain), with average age between 21-25 days (weaning), were acquired from the Laboratory of Experimental Surgery of the Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), RJ, Brazil. The animals were kept in groups in polyethylene boxes (n=5) under a climate-controlled environment and photoperiodism (12-hour dark/light shifts), air-conditioned, temperature about $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, and controlled air humidity, with food and water *ad libitum*. This study was conducted according to internationally accepted principles of laboratory animal use (Protocol CEA/020/2009, Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ).

Extract of *Agaricus blazei* Murrill

The dose used was adapted to the rat from the dose commonly used by a person weighting about 70Kg which consumes one liter of *A. blazei* extract by day [22].

Aqueous extract was prepared by weighted 10g or 20 mg of dried flour *A. blazei* and added into 500mL of distilled water, previously heated to almost boiling, making a 30-minute infusion. Volume to reach individual dose of 14.3mg or 42,9mg was calculated. The extract was filtered and stored under refrigeration at 10°C .

Biological essay

Four experimental groups were formed, each one with 20 male animals, two of them subdivided, arising a total of six groups, randomly selected:

Group 1 – Control group without NNK and without *A. blazei* (CG) – (with subcutaneous injection of corn oil with the same volume of NNK in group 3 + saline solution by gavage);

Group 2 – *A. blazei* group (“Cogumelo do SolTM”) (CSOL 14.3 and CSOL 42.9) – (with subcutaneous injection of corn oil with the same volume of NNK in group 3 + *A. blazei* by gavage at dose of 14.3mg (n=10) and 42.9mg (n=10));

Group 3 – Nitrosamine group (NG) – (with subcutaneous injection of NNK at dose of 1.5mg/kg of animal weight + saline solution by gavage);

Group 4 – *A. blazei* group with NNK (NSOL 14.3 and NSOL 42.9) – (with subcutaneous injection of NNK at dose of 1.5mg/kg of animal weight + *A. blazei* by gavage at dose of 14.3mg (n=10) and 42.9mg (n=10).

Food and water *ad libitum*.

Evaluation by Computed Tomography

Pulmonary changes were controlled and analyzed by computed tomography, which was performed in all groups. Quantification of consolidations was made with the aid of the software BEBUI [23-27]. Diagnosis of lung images was performed by the same radiologist in all groups. Images of the lung were segmented semi-automatically slice by slice. Global histogram, representative of all slices, was automatically displayed by the software. Kurtosis was used to quantify consolidation inside of the normal lung parenchyma [28,29]. Kurtosis is a measure of whether the data are peaked or flat relative to a normal distribution. High kurtosis tends to have a peak appearance near the mean and low kurtosis tends to have a flat appearance. It is expressed by the following formula:

$$kurtosis = \frac{\sum_{i=1}^N (Y_i - \bar{Y})^4}{(N-1)s^4} - 3$$

Where: **N** is the total number of voxels, **Y** is the mean of Housnfield units, **s** is the standard desviation of the mean.

Pulmonary lesions

NNK injection in rats was performed according to the methodology recommended by Hetcht *et al.*, 1984 [30]. The substance used was 4-methylnitrosamino-1-3-pyridyl-1-butanone, a.k.a. NNK, acquired through Labex, Inc., a nitrosamine specifically used to induce lung cancer in rodents. The drug was injected in the experimental animals at doses of 1.5mg/Kg body weight three times a week by subcutaneous route for 20 weeks.

A. blazei and NNK administration

Animals received the aqueous extract of *A. blazei* by gavage for one week. After this, it was started on subcutaneous administration of NNK at dose of 1.5mg/kg body weight of animals three times a week, simultaneously with mushroom's extract administration. After 20 weeks, administration of NNK was interrupted and for more one week the extract of *A. blazei* was still offered. After this period, the animals stayed under observation for more four months. Finished this time it was collected blood by cardiac puncture and lungs have been withdrawal after euthanasia by gas chamber.

Methods of Histological Assessment

Lungs were immediately removed and cleaned in 0.9% saline followed by immersion in formaldehyde solution 10% to prevent tissue autolysis. The organs were cut into fragments to make easy the formalin fixation process [31].

Pulmonary Histomorphological Evaluation

Specimens were subjected to the usual techniques of paraffin embedding, microtomy, and colouring techniques by hematoxylin-eosin, Masson's trichome.

Intensity of changes were graded by a pulmonary pathologist from zero (no change) to four crosses + + + + (marked changes). Following parameters were evaluated: congestion, edema, alveolar exudate;

bronchial exudate, bronchiectasis, abscess, bronchial epithelial metaplasia, and fibrosis. The intensity of the changes that composed the histological features of pneumonia at an early stage (congestion and edema), typical phase of the disease (fibrino-leukocytic exudate in bronchi and alveoli) and resolution's stage with scarring of the areas destroyed by the abscess, were graded from 0 (zero) to + + + + (four crosses). For better statistical analysis, the representation of crosses was replaced by numerical codes ranging from 0 (zero), no change, to four (4), changes quite rapidly. To reach a gold standard classification the diagnosis of the lung changes was made by two independent pathologists to prevent defects and errors in classification. Both pathologists and radiologist made independent observations.

Statistical evaluation of results

Nonparametric Kruskal-Wallis (KW) complemented by Mann-Whitney test at $p < 0.05$, was used to evaluate microscopic features. Kurtosis of the histogram of each whole lung was compared with its respective control by Mann-Whitney test at $p < 0.05$. Statistical analysis was processed by the software 'Graph Pad Prism' 2008, version 4.0.

Results

Microscopy

In current material it was observed in bronchial tree and lung parenchyma only some points of metaplasia, without dysplastic changes or cancer, even *in situ*. Besides this, it was found several degrees of lung's inflammatory process with pneumonic characteristics. Table 1 shows the result of pathologic finding's quantification by Optical Microscopy

Groups	Co ngestion	E dema	Alv eolar exudate	B ronchial exudate	Bronc hiectasis	abscess	Br onchial epithelium metaplasia	Fi brosis
	1.2	0.	0.7	0.	0.118	0.	0.	0.

G	35 ± 0.424	882 ± 0.582	06 ± 1.015 *	706 ± 1.176 *	± 0.471	.235 ± 0.644	000 ± 0.000	000 ± 0.000
SOL 14.3	1.2 86 ± 0.452	0.857 ± 0.639	0.8 57 ± 0.990	1.000 ± 1.309	0.571 ± 1.050	.143 ± 0.350	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
SOL 42.9	1.4 44 ± 0.497	1.000 ± 0.000	0.2 22 ± 0.416 **	0.333 ± 0.471 **	0.000 ± 0.000	.111 ± 0.314	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
G	1.4 56 ± 0.589	1.200 ± 0.600	1.7 50 ± 1.090 *	1.300 ± 0.900 *	0.850 ± 1.236	.450 ± 0.865	500 ± 1.245	800 ± 1.122
SOL 14.3	1.7 00 ± 0.640	1.200 ± 0.400	1.4 00 ± 1.200	1.200 ± 1.077	0.300 ± 0.640	.200 ± 0.600	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
SOL 42.9	1.5 56 ± 0.497	1.222 ± 0.786	1.6 67 ± 0.816 **	1.667 ± 0.667 **	1.333 ± 1.47	.778 ± 1.474	0.000 ± 0.000	1.000 ± 1.247

Table 1: The table shows the mean and standard deviation of classification. Statistical analysis was made by Kruskal Wallis test and Mann-Whitney test for the control groups with their corresponding control groups at * $p < 0.01$ and ** $p < 0.05$.

There was significant difference in terms of alveolar exudate and bronchial exudate between control group and nitrosamine group (CG X NG) and between control group with *A. blazei* at dose of 42.9mg and the nitrosamine group + mushroom at dose of 42.9mg (CSOL 42.9 x NSOL 42.9). In fact, nitrosamine NNK administration was related to an important pulmonary inflammatory process expressed by alveolar and bronchiolar exudate as disclosed by significant difference with its respective control without NNK. *A. blazei* at dose of 42.9 mg was not able to reduce or prevent inflammation related to nitrosamine(Fig.1 and 2). For other characteristics, there was not significant difference between groups.

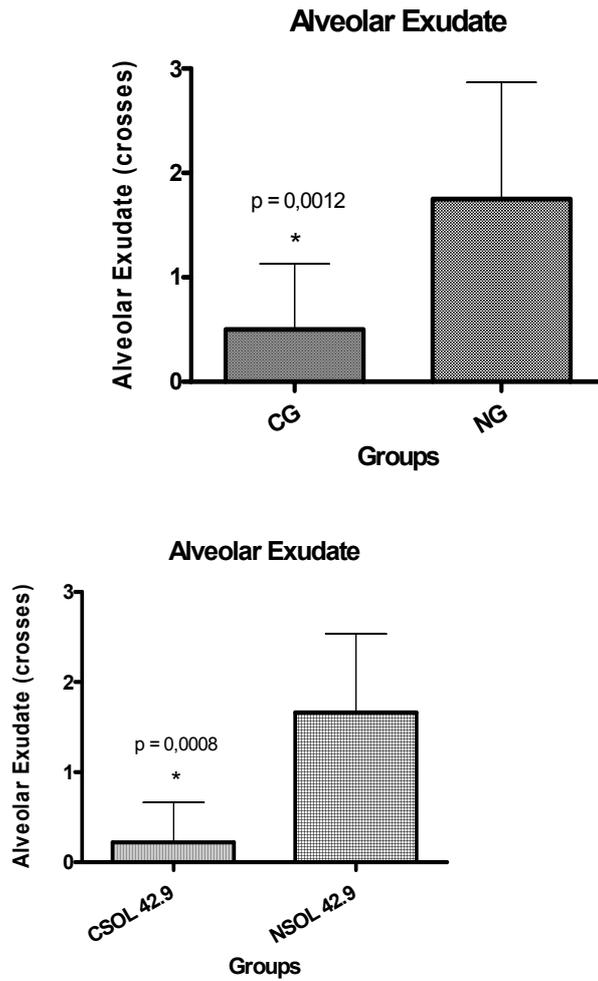


Figure 1: Chart showing the difference of alveolar exudate found in microscopic analyses of control group (CG) versus nitrosamine group (NG) and of control group with *A. blazei* at dose of 42.9mg (CSOL 42.9) versus nitrosamine group + *A. blazei* at dose of 42.9mg (NSOL 42.9).

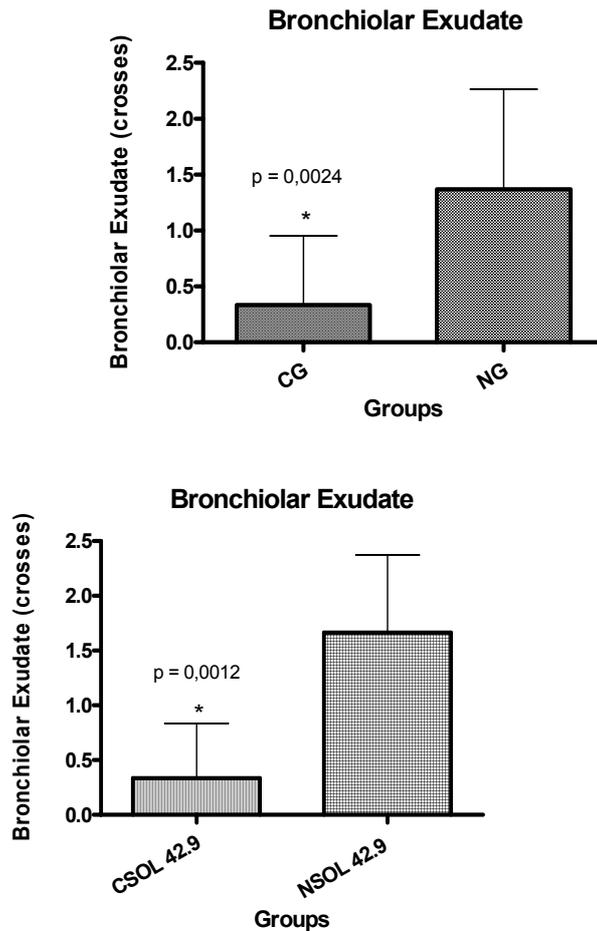


Figure 2: Chart showing difference of bronchiolar exudate found in microscopic analyses of control group (CG) versus nitrosamine group (NG) and CSOL 42,9 versus nitrosamine group + *A.blazei* at dose of 42.9mg (NSOL 42.9).

On the other hand, no significant difference was found between NNK + *A. blazei* at dose of 14.3mg group versus respective control without NNK. This finding suggests that the mushroom in this lower dose was able to attenuate the inflammatory process related to a nitrosamine NNK administration (Fig 3)

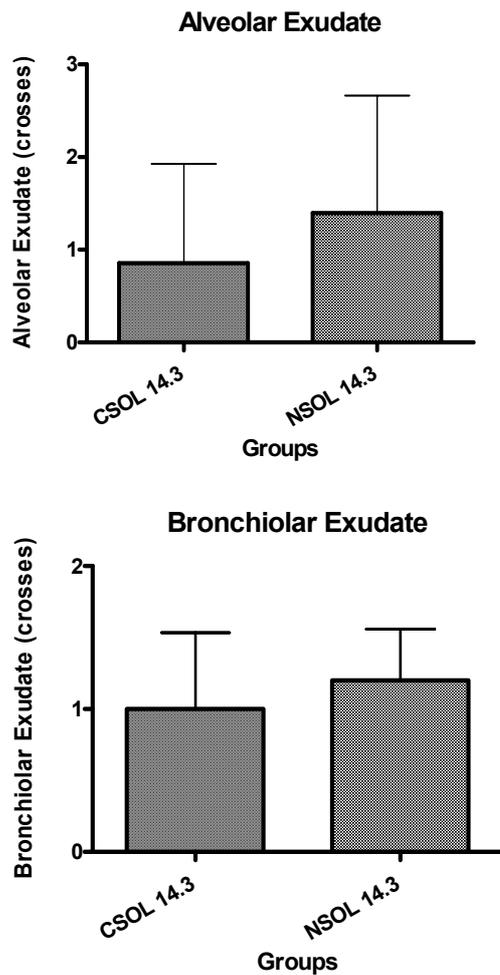


Figure 3: Chart of alveolar exudate and bronchiolar exudate comparing control group with *A. blazei* at dose of 14.3mg (CSOL14.3) versus nitrosamine group + *A. blazei* at dose of 14.3mg (NSOL14.3). There was no statistical difference.

Analysis of the kurtosis in the curve of the histogram

CT scan showed that the appearance of inflammatory lung histology is consistent with the quantification of lung's consolidation estimated by histogram kurtosis. Figure 4 shows a significant difference between the control group and NNK group in the right lung due to pulmonary's consolidation. Left lung was affected in the same way, but no significant difference was found.

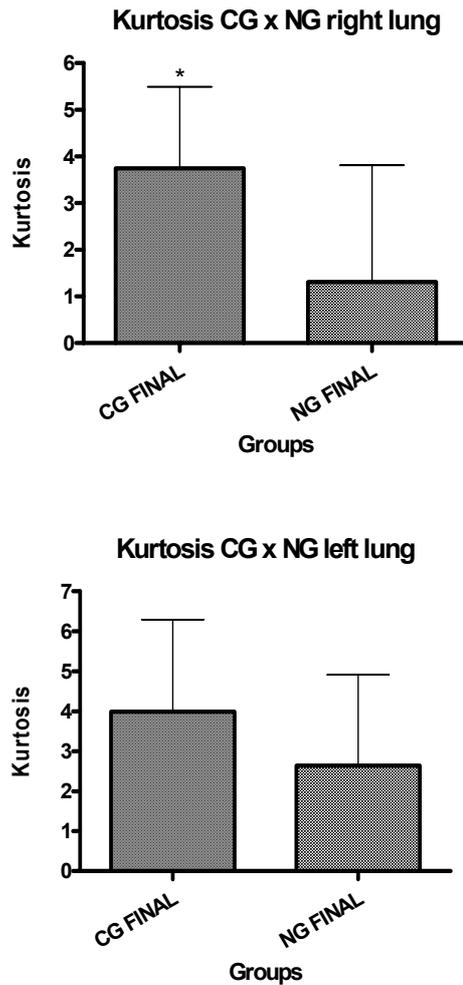


Figure 4: NNK group shows values of kurtosis lower than its control group. This difference was statistically significant in right lung, but no in the left one.

Lack of difference between kurtosis values of GNSOL 14.3 and GCSOL 14.3 in both lungs as expressed in figure 5. Like histopathology, this feature demonstrates a possible protecting effect by *A. blazei* at this dosage, preventing gross pulmonary consolidation.

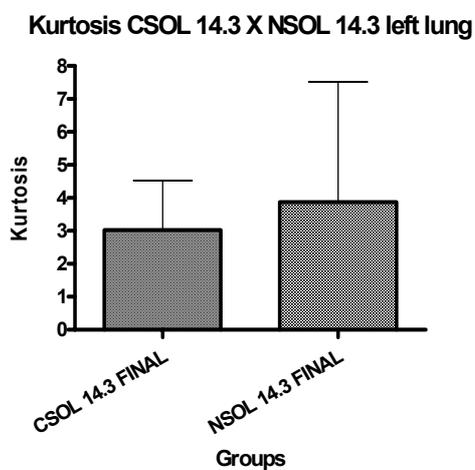
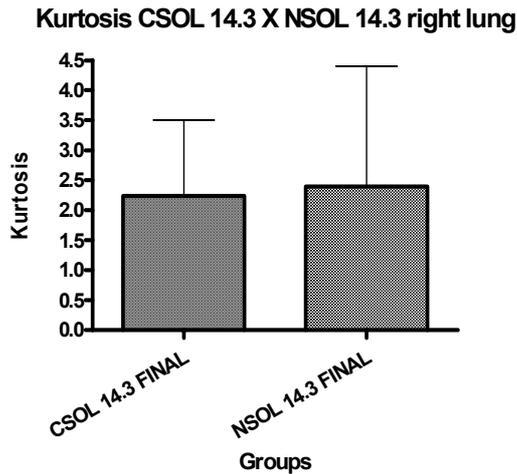


Figure 5: In the group that received NNK + *A. blazei* at dose of 14.3mg there was no difference comparatively with its control in both lungs.

However, *A. blazei* at dose of 42.9mg did not attenuate the inflammation linked to NNK on right lung, like as microscopic findings (Figure 6). On the left lung, there was no significant difference between groups. It means that NNK did not affect the left lung. This finding suggests strongly a mechanism of aspiration pneumonia.

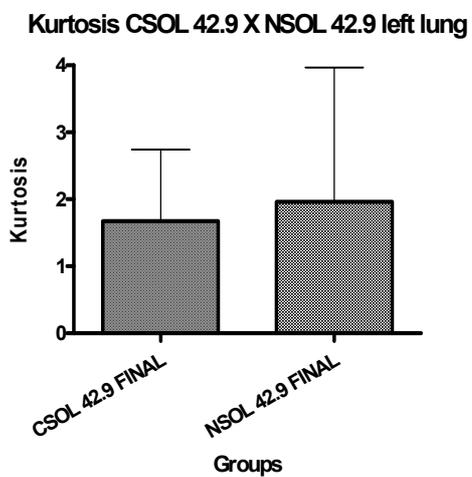
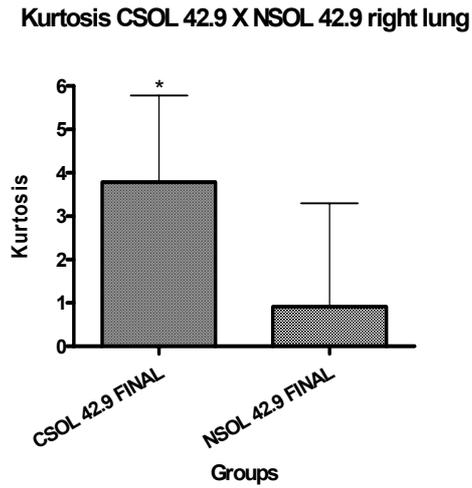
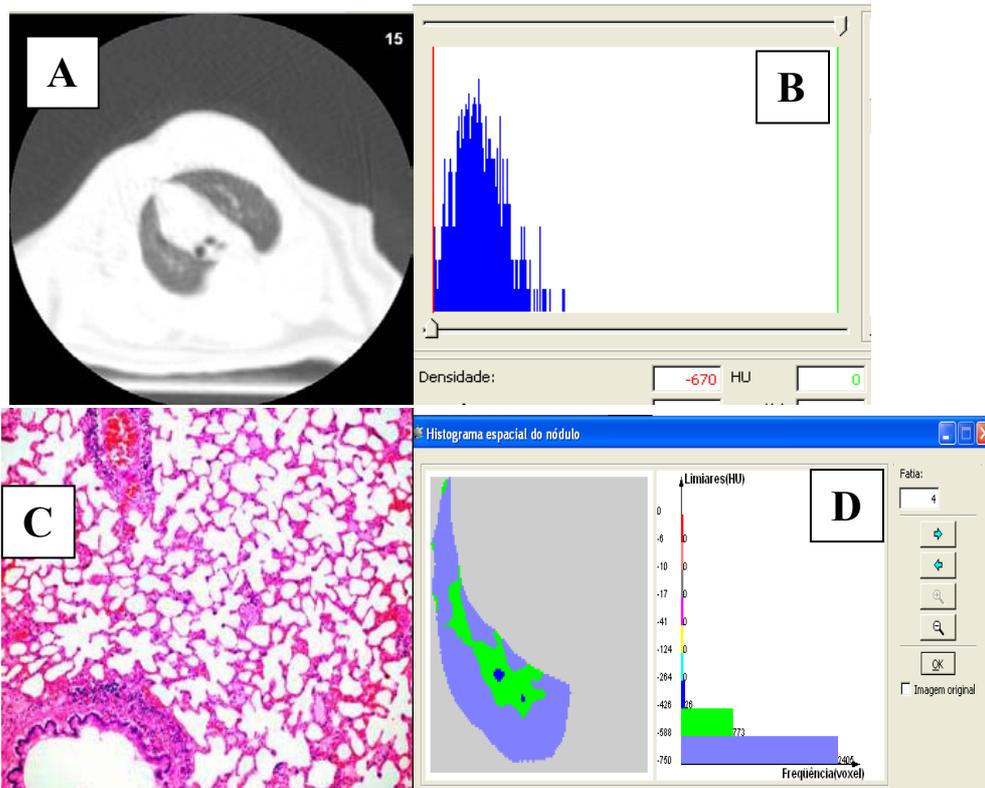


Figure 6: At right lung, there is difference statistically significant among groups. NSOL 42.9 showed values of kurtosis lower than CSOL 42.9 on right lung but not in the left one.

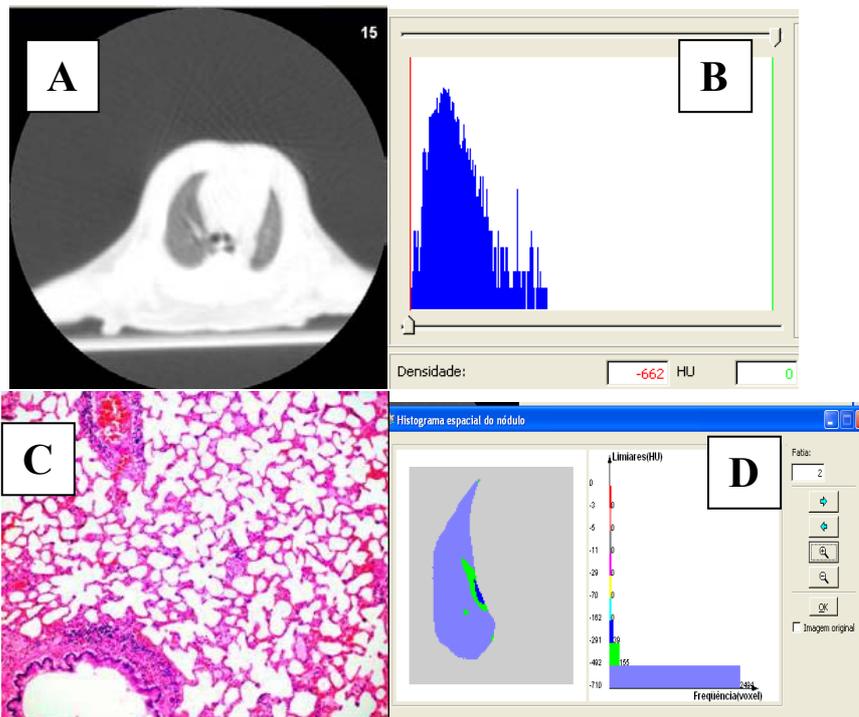
Representative slice of CT image (lung window), with its histogram curve and spatial histogram from the different groups are displayed as follow. Histological representative aspect of each group is also inserted in the same figure (Figures 7 to 13).

Images of Animal from Control Group (CG) at the End of Trial



Picture 7: Lung image of animal from control group (CG) made by software 'BEBÚI', using lung window (A); histogram of the image from lung at the end of trial (B); marked microscopy of animal without lung change (C), and spatial histogram of pseudo-colors in order to localize voxels of higher radiology density (D).

Images of Animal from Nitrosamine Group (NG) before Administration



Picture 8: Lung images of animal from nitrosamine group (NG) made by software 'BEBÚI' at the beginning of trial, using lung window (A); histogram of the lung image at the beginning of trial (B); microscopy of lung without change (C), and spatial histogram of pseudo-colors in order to localize voxels of higher radiology density (D).

Images of Animal from Nitrosamine Group (NG) at the End of Trial

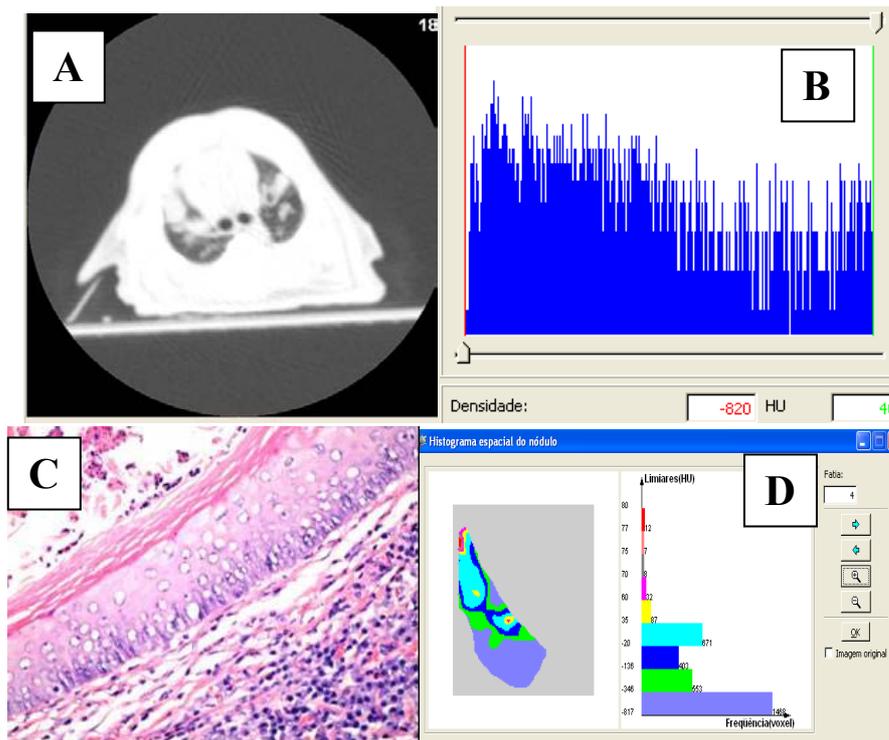


Figure 9: Lung images of animal from nitrosamine group (NG) made by software 'BEBÚI' at end of the experiment (lung window) disclosing bilateral consolidations (A); right pulmonary's histogram at the end of experiment showing evident flat distribution (B); heavy lung's inflammatory changes (C) and spatial histogram of pseudo-colors showing high densities characteristic of condensation's area(D).

Images of Animal from Control Group with Agaricus blazei at Dose of 14.3mg (CSOL 14.3) at the End of Trial

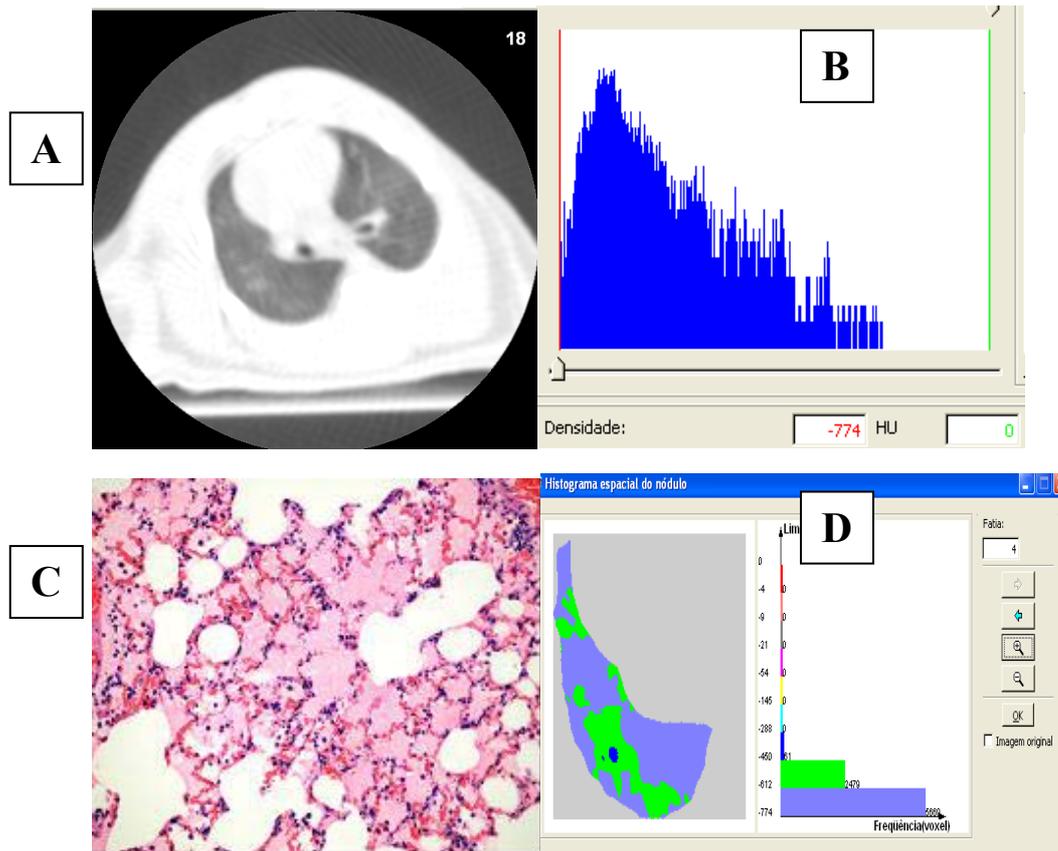
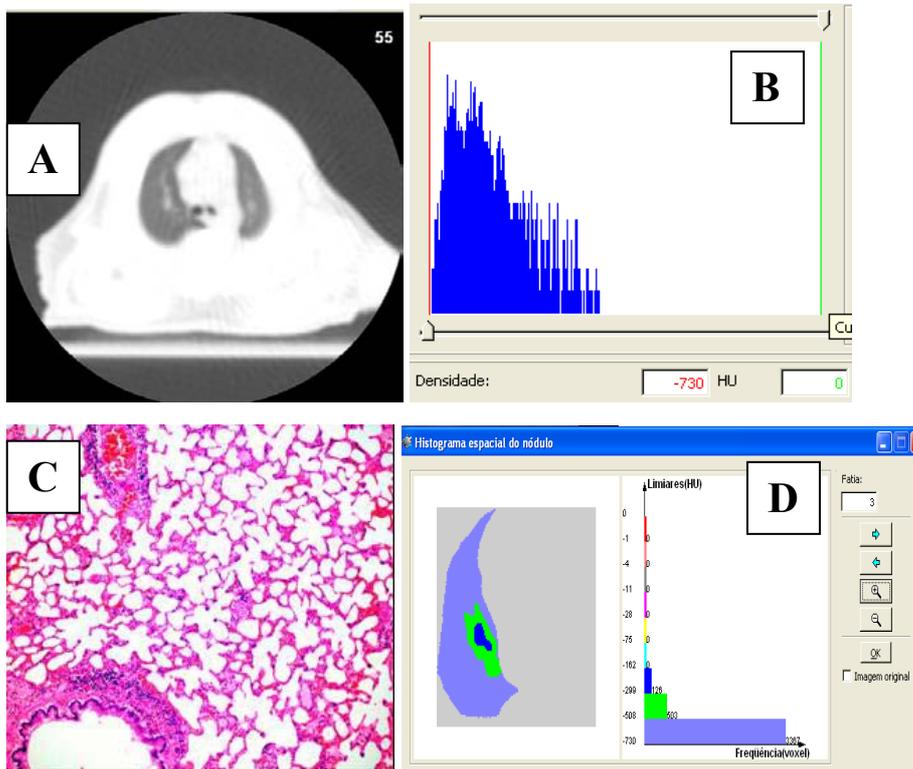


Figure 10: Lung images of animal from control group with *A. blazei* at dose of 14.3mg (GCSOL 14.3) made by software 'BEBÚP', using the lung window (A); histogram of the image from lung at the end of trial (B); microscopy with little lung change in some areas (C), and spatial histogram of pseudo-colors in order to localize voxels of higher radiology density in the same slice of A (D).

Images of Animal from Nitrosamine Group with Agaricus blazei at Dose of 14.3mg (NSOL 14.3) at the End of Trial



Picture 11: Lung images of animal from nitrosamine group with *A. blazei* at dose of 14.3mg (GNSOL 14.3) made by software 'BEBÚI' at the end of trial, using the lung window (A); histogram of the lung image at the end of trial (B); marked microscopy of animal without lung change (C), and spatial histogram of pseudo-colors in order to localize voxels of higher radiology density (D).

Images of Animal from Control Group with Agaricus blazei at Dose of 42.9mg (CSOL 42.9) at the End of Trial

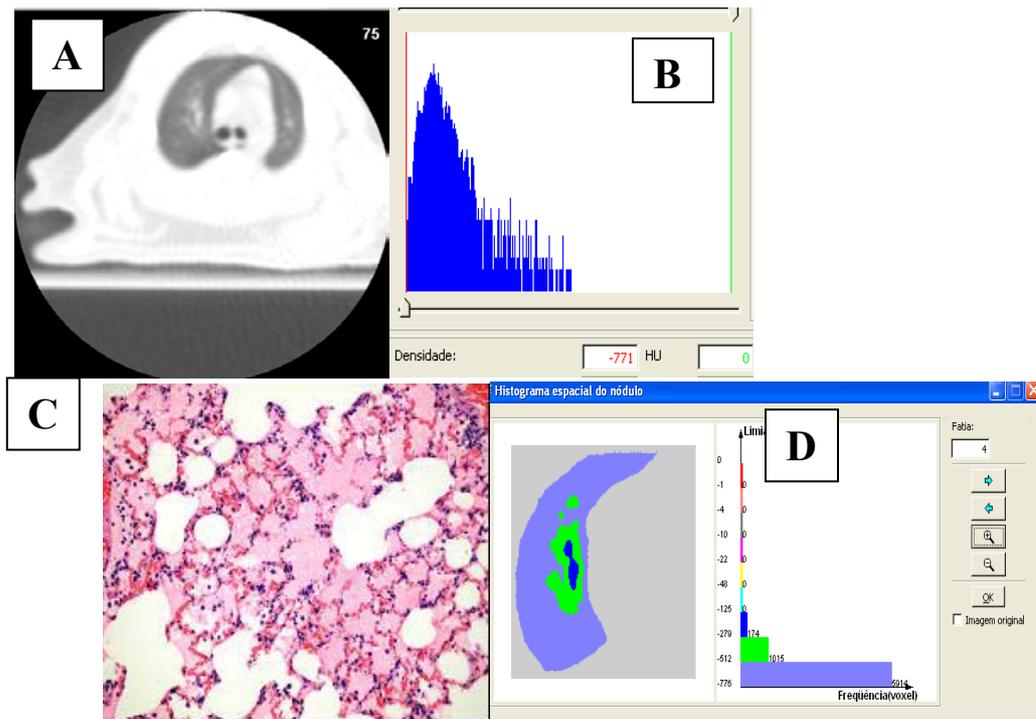


Figure 12: Lung images of animal from control group with *A. blazei* at dose of 42.9mg (GCSOL 42.9) made by software 'BEBÚI', using the lung window (A); histogram of lung image at the end of trial (B); marked microscopy of animal with little lung changes (C), and spatial histogram of pseudo-colors in order to localize voxels of higher radiology density (D).

Images of Animal from Nitrosamine Group with *Agaricus blazei* at Dose of 42.9mg (NSOL 42.9) at the End of Trial

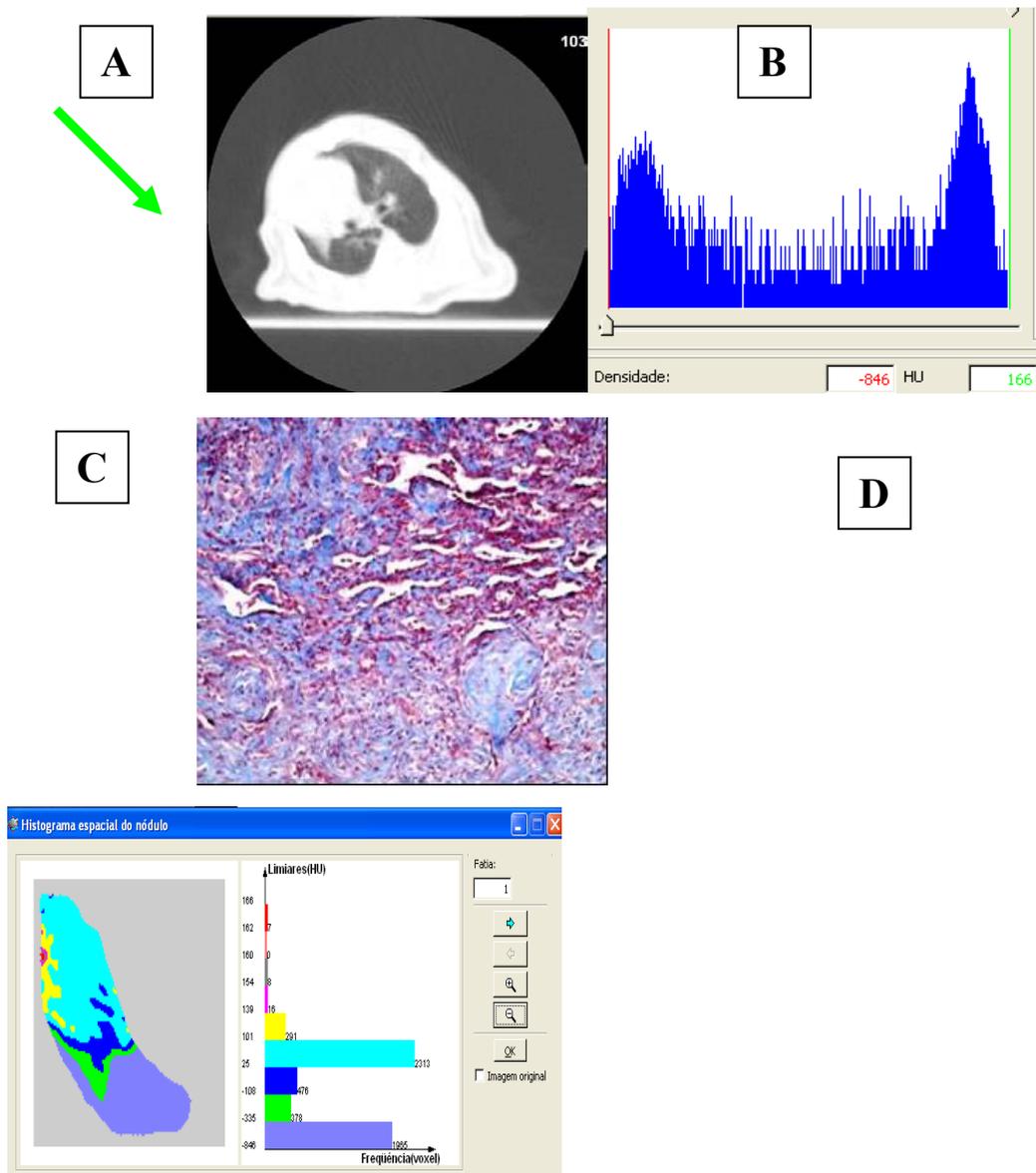


Figure 13: Lungs' image of animal from nitrosamine group with *A. blazei* at dose of 42.9mg (GNSOL 42.9) made by software 'BEBÚI' at the end of trial, using the lung window, showing paramediastinal condensation (green arrow) (A); histogram of lung image at the end of trial disclosing important enlargement of the voxels distribution with a second peak of higher densities expressing consolidations (B); heavy consolidation practically without free alveolar areas (C), and spatial histogram of pseudo-colors in order to localize focuses of high densities areas (D).

Discussion

Mushrooms are part of oriental medicine for centuries and are considered beneficial to health. Much of the traditional knowledge about its medicinal properties comes from Japan, China, Korea and Russia [32]. A large number of mushrooms have been disseminated on the market like health-promoting food. Searches related to these products are constantly being made [32-34]. One of the most studied fungi is currently the *Agaricus blazei* Murrill, “Cogumelo do Sol™” (pop name in Portuguese). Media outlets disseminate its benefits, and products related to Sun Mushroom have been sold in shops for common citizens.

The need for additional research involving the *Agaricus blazei* Murrill is somehow urgent because their consumption is linked to improvements and related benefits to individuals who have some kind of cancer or are undergoing treatment. In spite of this, scientific evidences supporting real benefits are few in the literature. One application would be in lung cancer setting because is one of the cancers with highest mortality [35]. This study examined the effects of consumption of the sun mushroom in the lung parenchyma under stimulation of NNK carcinogen.

However, despite not having been found development of tumors in animals receiving the NNK carcinogen in this experiment, it was found instead of cancer, inflammatory changes with histopathological profile of pneumonia. In the control group pneumonic process also was present but considerably lesser than the groups which was given carcinogen.

It was verified a domain of condensations at right lung, and this suggests a aspiration pneumonia. On fact, in rats, left bronchio is horizontal, and the right lung is more vertical, allowing in thesis, aspiration during gavage procedure, in which animal is put on erected position. Absence of foreign bodies in histological specimen are favorable to microorganism aspiration. Perhaps stress periods by gavage and drug injection or anesthesia for computed tomography may have contribute to the lung infection but for all groups. One explanation for the pneumonia linked to the NNK would be the mechanism of alpha-methyl-hydroxylation, that could attenuate or impair pro-inflammatory mediators of alveolar macrophages, reducing the defense mechanism of these cells against tumour cells and bacterial invasion [17-21].

Hematoxylin-Eosin technique is the most common way to classification of lung cancer [37], but it is also able to demonstrate inflammatory process with alveolar exudate like has happened in current work.

Microscopic analysis, were characteristics of inflammatory process and control groups showed lesser crosses than nitrosamine groups. Significant difference was

observed only between control group vs. nitrosamine (CG x NG) and between control groups with *A. blazei* at dose of 42.9 mg versus nitrosamine group with *A. blazei* at dose of 42.9mg (CSOL 42.9 x NSOL 42.9) concerning to the presence of alveolar and bronchial exsudate. This suggests that NNK was related to a significant lung changes in the control group, and the dose of *A. blazei* of 42.9 mg was not able to attenuate or improve the inflammatory process occurred in these groups. On the other hand, animals that received dose of 14.3mg of *A. blazei* + NNK cancerigen did not show significant difference with its control without NNK for alveolar and bronchial exsudate. This suggests that dose of 14.3mg of *A. blazei* was more effective on protection against lung inflammation.

In this experimental work acute lung inflammation was characterized by exsudates and migration of leukocytes, mainly neutrophiles. Padilha *et al.* evaluated anti-inflammatory activity of aqueous extract of *A. blazei* in different patterns of chronic inflammation. Animals treated with *A. blazei* in his study demonstrated a better response. It was justified by an immunomodulatory activity in macrophages. [7,8].

In current study, the dose of *A. blazei* of 14.3mg seems contribute to give some kind of protection against inflammation. This mushroom dose is usually recommended for human consumption and it was adapted to animals to the best tolerance in gavage process.

In this work, quantification of histogram of the lung CT image was used for evaluation of condensations. Kurtosis can be viewed graphically by the aspect of the curve of histogram. When the curve is flatter, towards voxels of more density, it means that there were more opacities or condensations at analyzed lung. In this setting kurtosis values will be next to zero. On the other hand, when the curve of histogram is more peaked in area of voxels of less density, it means there is more normal parenchyma in analyzed lung, and values of kurtosis will be positive and far from zero. Present results

of kurtosis support the findings. Control group versus nitrosamine group (CG x NG), in the right lung showed significant difference exhibiting flat histogram curve, with values next to zero. In the left lung, although there wasn't statistic difference between groups, it was observed that the group that received nitrosamine (NG) keeps values of kurtosis lower than the control group, supporting that inflammatory process was bigger in the group that did not received NNK. For the control group with *A. blazei* at dose of 42.9mg vs. nitrosamine group + *A. blazei* at dose of 42.9mg (CSOL 42.9 x NSOL 42.9), at right lung, there is significant difference between the groups. NSOL 42.9 showed values of kurtosis lower than CSOL 42.9 (Fig. 6) demonstrating the development of opacities and flatter curve of NSOL 42.9. It suggests the mushroom at dose of 42.9 mg was not efficient to attenuate pneumonia linked to the administration of NNK, like microscopic findings. On the other side, the group that received NNK + *A. blazei* at dose of 14.3mg (CSOL 14.3), disclosed that there wasn't significant difference with its control in both lungs, demonstrating, thus, a possible protecting effect by *A. blazei* at this dosage. Values of kurtosis of NSOL 14.3 are similar to CSOL 14.3 exhibiting a histogram peaked and with less opacities.

So, administration of *A. blazei* at dose of 14.3 mg in the current trial pattern seems to be associated to reduction of pneumonic process linked to NNK. This benefic action could be explained by a therapeutic concentration of beta-glucan. Mizuno *et al.* observed an increase in the population of T-cells after oral administration of *A. blazei* polysaccharides in mice. On the other hand, Nagata *et al.* suggested that *A. blazei* activates macrophages and B-cells, but not helper T-cells, due to induced nitric oxide production and interleukin-1 [beta] [38,39]. Alveolar macrophages are the first cells to make contact with foreign particles and are responsible for maintain lung homeostasis by stimulation and inhibition of inflammatory responses [40]. They produce IL-12,

TNF, and NO, but also produce IL-10 and E₂ prostaglandins that are strong inhibitors of alveolar macrophage functions and of production of inflammatory cytokines. These changes can contribute to increase of lung cancer incidence and pulmonary infection seen in smokers and second smokers [41,42,21]. Padilha [8] suggests that the *A. blazei* should be used as a prophylactic agent, because its immunomodulatory activity. Activation of macrophages by beta-glucan and inhibition of pro-inflammatory mediators by NNK, produced by alveolar macrophages, put in question a site of match between beta-glucan and NNK next to receptors in alveolar macrophages. While an agent acts to stimulate cells that fight against progression of tumors and bacterial invasion, another one acts inhibiting these protecting factors and stimulating polarized type 2 responses responsible to growing and progression of inflammations and tumors [43, 44].

Cancer-related inflammation represents a target for innovative diagnostic and therapeutic strategies [36]. But, remains uncertain if the present model with more time waiting could be able to arise tumors from inflammation areas and if the dose of *A. blazei* used, would be able to inhibit or attenuate the growing and development of tumors as it seems to do with pulmonary inflammations.

Acknowledgments

I thank the direct and indirect support of FAPERJ and CAPES.

REFERENCES

1. Chang, R: Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition Review*. 1996; 54: S91-S93.
2. Mallita P, Suonpää K, Pironen V: Functional property of edible mushrooms. *Nutrition*. 2000; 16: 694-696.

3. James A Talcott, Jack A Clark, Insu P Lee: Measuring perceived effects of drinking an extract of basidiomycetes *Agaricus blazei* Murrill: a survey of Japanese consumers with cancer. BCM Complementary and alternative medicine. 2007; v.7 32-40.

4. Eisenberg DM, Kessler RC, Foster C, Norlock FE, Calkins DR, Debanco TL: Unconventional medicine in the United States. Prevalence, costs and patterns of use. N Engl. J. Med. 1993; v.328: 246-252. Ministério Da Saúde. Instituto Nacional Do Câncer. Coordenação Nacional de Controle do Tabagismo – CONTAPP. “Falando sobre o Câncer e seus Fatores de Risco”. Rio de Janeiro, 1996.

5. Cassileth BR, Lusk EJ, Staouse TB, Bodenheimer BJ: Contemporary unorthodox treatments and practitioners. Ann Intern Med. 1984; v.101: 105-112.

6. Takaku T, Kimura Y, Okuda H: Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanisms of action. J.Nutr. 2001; 131: 1409-1413.

7. Higaki M, Abe K, Kikukawa T, Ekuchi F, Yoshimoto H: *Agaricus blazei* Murr extracts as immunoregulators and anti-inflammatory drugs. Jpn Kokai Tokkyo Koho 1999; 13.

8. Marina M. Padilha, Ana A.L. Avila, Pergentino J.C. Sousa, Luis Gustavo V. Cardoso, Fábio F. Perazzo, José Carlos T. Carvalho: Anti-Inflammatory Activity of Aqueous and Alkaline Extracts from Mushrooms (*Agaricus blazei* Murill). Journal of Medicinal Food. 2009; 12(2): 359-364.

9. Eynde BJ, Bruggen P: Curr. Opin. Immunol. 1997; 9: 684-693.

10. Stone BB, Clarke AE: Chemistry and Biology of (1-3)- β -glucans, La Trobe University Press, Australia, 1992.
11. Battle J, Ha T, Li C, Della Beffa V, Rice P, Kalbfleisch J: Ligand binding to the (1-3)- β - D-glucana receptor stimulates NF κ B activation, but not apoptosis in U937 cells. *Biochem Biophys Res commun.* 1998; 249: 499-504.
12. Diluzio NR: *Springer Semin. Immunopathol.* 1999; 8: 387-400.
13. Mohagheghpour N, Dawson M, Hobbs P, Judd A, Winant R, Dousman L, Waldeck N, Hokama L, Tuse D, Kos F: *Adv. Exp. Med. Biol.* 1995; 383: 13-22.
14. Rios-Hernandez M, Dos-Santos NJ, Silvia-Cardoso, Bello-Garciga JL, Pedroso M: *Arch. Méd. Res.* 1994; 25: 179-180.
15. Hecht SS: Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines. *Chem. Res. Toxicol.* 1998; 11: 559-603.
16. Travis WD, Travis LB, Devesa SS: Lung cancer. *Cancer.* 1995; 75: 191-202.
17. Higashimoto Y, Shimada Y, Fukuchi Y, Ishida K, Shu C, Teramoto S, Sudo E, Matsuse T, Orimo H: Inhibition of mouse alveolar macrophage production of tumor necrosis factor alpha by acute *in vivo* and *in vitro* exposure to tobacco smoke. *Respiration.* 1992; 59: 77-80.
18. Yamaguchi E, Itoh A, Furuya K, Miyamoto H, Abe S, Kawakami Y: Release of tumor necrosis factor-alpha from human alveolar macrophages is decreased in smokers. *Chest.* 1993; 103: 479-483.

19. Hendrzak JA, and Brunda MJ: Interleukin-12. Biologic activity, therapeutic utility and role in disease. *Lab. Invest.* 1995; 72: 619-637.
20. Van der Pouw Kraan TC, Boeije LC, Snijders A, Smeenk RJ, Wijdenes J, Aarden LA: Regulation of IL-12 production by human monocytes and the influence of prostaglandin E₂. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1996; 795: 147-157.
21. Proulx LI, Castonguay A, Bissonnette EY: Cytokine production by alveolar macrophages is down regulated by the α -methylhydroxylation pathway of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). *Carcinogenesis.* 2004; vol.25, 6: 997-1003.
22. Barbisan FL, Spinardi-Barbisan TLA, Moreira LE, Salvadori FMD, Ribeiro RL, Eira FA, De Camargo VLJ: *Agaricus blazei* (Himematsutake) does not alter the development of rat diethylnitrosamine-initiated hepatic preneoplastic foci. *Cancer Sci.* 2003; 94: 188-192.
23. da Silva Sousa João Rodrigo Ferreira, Silva Aristófanés Corrêa, de Paiva Anselmo Cardoso, Nunes Rodolfo Acatauassú: Methodology for automatic detection of lung nodules in computerized tomography images. *Computer Methods and Programs in Biomedicine.* 2010; v. 98, p. 1-14.
24. Nunes Rodolfo Acatauassú, Corrêa Silva Aristófanés, Higa Cláudio, Saito Eduardo Haruo: Nódulo pulmonar solitário. *Pulmão RJ.* 2009; v. 1, p. 6-11.

25. Silva Aristófanés Corrêa, Silva Erick Corrêa, Paiva Anselmo Cardoso de, Nunes Rodolfo Acatauassú: Diagnosis of Lung Nodule using Moran's Index and Geary's Coefficient in Computerized Tomography Images. *Pattern Analysis and Applications*. 2008; v. 11, p. 89-99.
26. Silva Aristófanés Corrêa, Silva Erick Corrêa, Paiva Anselmo Cardoso de, Nunes Rodolfo Acatauassú, Gattass Marcelo: Diagnosis of Solitary Lung Nodules using the local form of Ripley's K function applied to three-dimensional CT data. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. 2008; v. 90, p. 230-239.
27. Silva Aristófanés Corrêa, Gattass Marcelo, Carvalho Paulo Cezar Pinto: Analysis of spatial variability using geostatistical functions for diagnosis of lung nodule in computerized tomography images. *Pattern Analysis and Applications*. 2005; v. 7, n. 3, p. 227-234.
28. Silver M: *Estatística para Administração*. São Paulo: Atlas, 2000.
29. Levine DM, *et al*: *Estatística: Teoria e Aplicações*. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A. – LTC, 2000.
30. Hecht SS, Lin D, Castoguy A: Effects of α -deuterium substitution on the mutagenicity of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). *Carcinogenesis (Lond.)*. 1984; 4:305-310.

31. Junqueira LCU, Carneiro J: Histologia básica. 10^a ed. 2004.
32. Liu Y, Fukuwatari Y, Okomura K, Takeda K, Ishibashi K, Furukawa M, Ohno N, Mori K, Gao M, Motoi M: Immunomodulating activity of *Agaricus brasiliensis* KA21 in mice and human volunteers. *eCAM*. 2008; 5(2): 205-219.
33. Kodama N, Asakawa A, Inui A, Masuda Y, Nanba H: Enhancement of cytotoxicity of NK cells by D-Fraction, a polysaccharide from *Grifola frondosa*. *Oncol Rep*. 2005; 13: 497-502.
34. Masaki K, Hirotake K: Delayed cell cycle progression and apoptosis induced by hemicellulase-treated *Agaricus blazei*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2006; in press, available on-line.
35. Ministério Da Saúde. Instituto Nacional Do Câncer. Coordenação Nacional de Controle do Tabagismo – CONTAPP. “Falando sobre o Câncer e seus Fatores de Risco”. Rio de Janeiro, 1996.
36. Mantovani A: Molecular pathways linking inflammation and cancer. *Curr. Mol. Med*. 2010; 10(4): 369-373.
37. Franklin WA: Diagnosis of lung cancer-pathology of invasive and preinvasive neoplasia. *Chest*. 2000; 117: 80-89.

38. Mizuno M, Morimoto M, Minato K, Tsuchida H: Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1998; 62:434-437.
39. Nagata J, Higashiuesato Y, Maeda G, et al.: Effects of water-soluble hemicellulose from soybean hull on serum antibody levels and activation of macrophages in rats. *JAgric Food Chem.* 2001; 49: 4965-4970.
40. Thepen T, Kraal G, Holt PG: The role of alveolar macrophages in regulation of lung inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1994; 28: 200-206.
41. Meyaard L, Hovenkamp E, Otto SA, Miedema F: IL-12-induced IL-10 production by human T cells as a negative feedback for IL-12-induced immune responses. *J. Immunol.* 1996; 156: 2776-2782.
42. Isler P, de Rochemonteix BG, Songeon F, Boehringer N, Nicod LP: Interleukin-12 production by human alveolar macrophages is controlled by the autocrine production of interleukin-10. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1999; 20: 270-278.

43. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A: Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002; 23: 549-555.

44. Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L: The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol. Today.* 1992; 13: 265-270.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

Author: Carolina Croccia

Address: 28 de Setembro Avenue, rear , Biomedic Center, FCM, 1st floor.

Vila Isabel. Zipcode: 20561-030. Rio de Janeiro. Brazil.

E-mail: ccroccia@gmail.com

AGRADECIMENTOS TÉCNICOS

Ao técnico em radiologia Horácio José Tavares Laxe pela criação do protocolo de exame de tomografia computadorizada em ratos e pela realização dos exames de tomografia nos animais experimentais.

À técnica em radiologia Kátia Valéria Lima Barreto pela realização dos exames de tomografia computadorizada nos animais experimentais.

Ao bioterista Cláudio Sérgio Corrêa Lau pela ajuda e colaboração no cuidado dos animais durante todo o experimento.

À Nutricionista Marcela Cardoso pela ajuda no cuidado dos animais durante todo o experimento.

Ao Dr. Davy Carlos Mendes Rapozo pelo treinamento e manipulação da droga NNK.

Ao técnico em anatomia patológica Antônio Corrêa pela confecção das lâminas histopatológicas.

À FAPERJ, CAPES pelo suporte direto e/ou indireto.

CONFLITO DE INTERESSES

Não há conflito de interesses.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)