

ELISABETE FANTUZZI

**AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR DO EXTRATO AQUOSO
DE *Agaricus blazei* E SUA RELAÇÃO COM A TRANSLOCAÇÃO
BACTERIANA EM MODELO ANIMAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2007

ELISABETE FANTUZZI

**AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR DO EXTRATO AQUOSO
DE *Agaricus blazei* E SUA RELAÇÃO COM A TRANSLOCAÇÃO
BACTERIANA EM MODELO ANIMAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 27 de abril de 2007.

Prof. Jacques Robert Nicoli
(Co-orientador)

Prof. José Mário da Silveira Mezencio
(Co-orientador)

Prof. Sérgio Luis Pinto da Matta

Prof. Sérgio Oliveira de Paula

Prof^a. Maria Cristina Dantas Vanetti
(Orientadora)

"Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos se não fora
A mágica presença das estrelas."

(Das Utopias - Mário Quintana)

A Deus.

Ao meu pai.

À minha mãe.

Aos meus irmãos e sobrinhos,

Com amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia.

Ao CNPq, pelo financiamento do projeto.

A Capes e à Fapemig, pela concessão das bolsas de estudos que permitiram a realização deste trabalho.

À Profa. Maria Cristina Dantas Vanetti, pela orientação acadêmica durante toda a minha trajetória pela UFV - aperfeiçoamento, mestrado e doutorado, que juntos somam quase 10 anos de convivência e constante aprendizado. Muito obrigada, em especial, pela paciência e compreensão nos momentos em que mais necessitei.

Ao Prof. Jacques Robert Nicoli (ICB/UFMG), pela co-orientação, pelas sugestões imprescindíveis durante todo o período experimental, pela valiosa oportunidade de treinamento e troca de experiências com seus estudantes e, em especial, pela receptividade, paciência e boa vontade com as quais sempre me recebeu em seu laboratório.

Ao Prof. José Mário da Silveira Mezêncio (DBG/UFV), pelo aconselhamento, pelos conhecimentos transmitidos e por ter despertado em mim, já durante a graduação, o gosto pela disciplina Imunologia.

Ao Prof. Paulo Roberto Cecon (DPI/UFV), por participar ativamente na montagem de todo o delineamento experimental utilizado.

Ao Prof. Sérgio Luis Pinto da Matta (DBG/UFV), por compor a banca de defesa, por ter aberto as portas de seu laboratório para mim, desde o início das atividades, incluindo o treinamento inicial na vivessecação de animais; pela ajuda e pelas sugestões durante todo o período do curso.

Ao Prof. Sérgio Oliveira de Paula (DBG), por compor a banca de defesa, pelas sugestões no trabalho, pela ajuda imprescindível durante os ensaios imunoenzimáticos e por ser um amigo sempre disposto a ajudar.

À Profa. Rosa Arantes (ICB/UFMG), por tão gentilmente ter realizado as análises histopatológicas de que necessitávamos, para finalizar este trabalho.

A minha mãe, pela paciência, por aceitar minhas eternas idas e vindas da sua casa, por compreender meu mau-humor constante durante os piores momentos dessa trajetória, por ouvir calada todas as minhas reclamações e, mesmo assim, continuar me amando.

Ao meu saudoso pai, sempre presente em minha vida, por meio de meus pensamentos.

Aos meus irmãos, por comemorarem comigo cada pequeno acerto, por agüentarem minha falta de paciência quando tudo dava errado, por tentarem entender todos os obstáculos que eu tentava transpor durante os experimentos e por terem ouvido por mais de quatro e “intermináveis longos” anos a palavra “tese” repetida exaustivamente em nossas conversas.

Aos meus sobrinhos queridos, Larissa, Melissa, Giovanni, Vitória e Vinícius. Aos pequeninos, pela graça característica da infância, aos grandinhos pela paciência comigo e por torcerem para eu “terminar logo de uma vez este doutorado”.

Ao Dr. Exedito Leão, por ter aceitado ser meu “avô” querido e por ter sempre palavras de incentivo e encorajamento para me dizer.

Aos queridos e sempre presentes colegas, ex-colegas e eternos amigos do laboratório de Microbiologia de Alimentos, Patógenos Alimentares e Microbiologia de Anaeróbios - todos, sem exceção, foram especiais e importantes à sua maneira: Adriana Ponce, Adriana Santos, Aline, Ana Andréa, Ana Diolina, André, Andréa, Carol Rezende, Cláudia Lúcia, Eliane, Eliseth, Emilene, Esther, Fernanda, Janaína, Maurílio, Marcelão, Marcelim,

Marília, Rafael, Renata, Rodrigo, Simone Paes, Simone Quintão, Tássia e Uelinton.

A todos os vários amigos dos demais laboratórios do DMB que tive a felicidade de conquistar nesse período.

Aos amigos Lucilene Rezende (estagiária), Rosinéia de Paula, Flávia Floresta, Vinícius Albano, Inês Helena, Leonardo Bhering, Marcos de Lucca, Renato Moreira Nunes e Thiago Santos.

Aos colegas dos laboratórios de Biologia Estrutural do DBG da UFV e de Fisiologia e Ecologia Microbiana do ICB da UFMG.

A todos os queridos funcionários do DMB, pela disposição em ajudar e, especialmente, pelos bate-papos agradáveis, pela amizade e pelo carinho que sempre me dispensaram.

Aos funcionários Pedro (Oficina de Hialotecnia), Pardal (Oficina de Eletrônica) e Marcinho (Laboratório de Biologia e Controle de Protozoários e Vetores/BIOAGRO).

À Profa. Carminha Pelúzio (DNS, UFV), pela amizade e por disponibilizar o Biotério Central para a realização dos experimentos.

Aos funcionários do Biotério Central, Adão e Juliano, pela solicitude e, especialmente, por me tratarem com carinho e respeito.

A todos os professores do sistema público de ensino que participaram da minha formação, em especial, aos meus queridos e eternos mestres, Prof. Gilberto Paixão Rosado (DNS, UFV) e Prof. Jorge Luis Cavalcante Coelho.

A todos os professores do DMB e, em especial, à Profa. Célia Alencar de Moraes, por todos os conhecimentos transmitidos e por acreditar em mim quando nem eu mesma o fazia.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, comigo durante esta etapa de minha vida.

BIOGRAFIA

Elisabete Fantuzzi, filha de Alzira Lima Ramos Fantuzzi e Dante Fantuzzi, nasceu em Viçosa-MG.

Concluiu o segundo grau no Colégio Universitário (COLUNI), em Viçosa-MG.

Em 1992, ingressou no Curso de Nutrição, pela Universidade Federal de Viçosa. Durante parte da graduação, foi bolsista de iniciação científica, no Departamento de Nutrição e Saúde (PIBIC-CNPq). Colou grau em setembro de 1996.

Foi bolsista de aperfeiçoamento do CNPq, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia, no período de agosto de 1996 a fevereiro de 1997.

Em março de 1997, ingressou no Mestrado em Microbiologia Agrícola, na área de Microbiologia de Alimentos, defendendo tese a 7 de julho de 1999.

Foi coordenadora e professora do curso de Nutrição da Universidade Católica Dom Bosco, em Campo Grande, MS, no período de julho de 2000 a fevereiro de 2001.

Iniciou o Curso de Doutorado em Microbiologia Agrícola em setembro de 2002, defendendo a tese em abril de 2007.

SUMÁRIO

RESUMO	XI
ABSTRACT	XIII
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 O sistema imunológico.....	3
2.1.1 Resposta imune.....	3
2.1.2 Tecido linfóide associado ao intestino (GALT)	4
2.1.3 Citocinas.....	6
2.1.4 Imunoglobulina A secretora (IgAs).....	6
2.2 Cogumelos medicinais	8
2.2.1 <i>Agaricus blazei</i>	8
2.2.2 Modificadores da resposta biológica (BRMs)	10
2.3 Translocação bacteriana.....	12
2.3.1 Fatores que induzem a translocação bacteriana	15
2.3.2 Translocação de <i>Salmonella</i>	16
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *Agaricus blazei* EM CAMUNDONGOS IMUNODEPRIMIDOS29

1 INTRODUÇÃO.....29

2 MATERIAL E MÉTODOS.....32

2.1 Camundongos.....32

2.2 Extrato do *A. blazei*.....33

2.3 Administração da ciclofosfamida.....33

2.4 Determinação da dose imunodepressora de ciclofosfamida.....34

2.5 Grupos de estudo e tratamentos.....34

2.6 Eutanásia.....35

2.7 Análise de translocação bacteriana.....35

2.8 Índice esplênico.....35

2.9 Determinação de IgA secretora (IgAs) no conteúdo do intestino delgado.....35

2.10 Determinação de citocinas (TNF- α , IFN- γ e IL-10) no soro.....36

2.11 Análises histopatológicas do intestino delgado, baço e fígado.....36

2.12 Análises estatísticas.....37

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....38

4 CONCLUSÕES.....48

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....49

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *Agaricus blazei* EM CAMUNDONGOS DESAFIADOS COM *Salmonella* TYPHIMURIUM.....54

1 INTRODUÇÃO.....54

2 MATERIAL E MÉTODOS.....57

2.1 Camundongos.....57

2.2 Extrato do *Agaricus blazei*.....58

2.3 Microrganismo.....58

2.4 Grupos de estudo e tratamentos.....	58
2.5 Eutanásia	59
2.6 Análise de translocação bacteriana	59
2.7 Índice esplênico	60
2.8 Determinação de IgA secretora (IgAs) do conteúdo do intestino delgado	60
2.9 Determinação de citocinas (TNF- α , IFN- γ e IL-10) no soro	60
2.10 Análises histopatológicas do intestino delgado, baço e fígado	60
2.11 Análises estatísticas	60
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
3.1 Peso dos animais.....	61
3.2 Índice esplênico	62
3.3 Secreção de IgAs no intestino delgado.....	63
3.4 Secreção de citocinas séricas.....	64
3.5 Translocação de <i>S. Typhimurium</i>	65
3.6 Alterações histopatológicas	67
4. CONCLUSÕES.....	70
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

LISTA DE ABREVIações

- APC – célula apresentadora de antígeno
BRM – modificador da resposta biológica
CP – placa das criptas (*cryptopatches*)
FAE – epitélio associado ao folículo
GALT – sistema linfóide associado ao intestino
GF – livre de germes (*germ-free*)
IEL – linfócitos intraepiteliais
IFN- γ – interferon gamma
IL-10 – interleucina 10
ILF – folículo linfóide isolado
MLN – linfonodo mesentérico
pIgR- receptor de imunoglobulina polimérica
PP – placa de Peyer
SPF – livres de patógenos específicos (*specific-pathogen-free*)
SPI-1 – ilha de patogenicidade 1
SPI-2 – ilha de patogenicidade 2
TNF- α – fator de necrose tumoral alpha

RESUMO

FANTUZZI, Elisabete D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2007.
Avaliação do efeito imunomodulador do extrato aquoso de *Agaricus blazei* e sua relação com a translocação bacteriana em modelo animal. Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-orientadores: Jacques Robert Nicoli e José Mário da Silveira Mezencio.

O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos imunomoduladores do extrato aquoso de *Agaricus blazei* e sua relação com a translocação de bactérias autóctones e a translocação de *Salmonella enterica* Typhimurium (10^6 UFC mL⁻¹), em modelo animal. Extrato aquoso de *A. blazei* foi administrado *ad libitum* e por gavagem intragástrica a camundongos de 6 a 7 semanas, duas semanas antes da primeira dose de ciclofosfamida e até o 23^o dia do experimento. No experimento utilizando *S. Typhimurium* para desafiar os animais, o extrato aquoso de *A. blazei* foi administrado diariamente por 16 dias antes do desafio e até o 22^o dia, quando os animais foram eutanasiados. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) no ganho de peso (g) dos animais entre os grupos testados durante a avaliação semanal, no entanto, observou-se uma redução similar no peso dos animais submetidos ao tratamento dos grupos imunodeprimidos com 200 mg kg⁻¹ de ciclofosfamida na última semana de avaliação, independente da administração ou não do extrato aquoso de *A. blazei ad libitum* e por gavagem intragástrica. Não foi observada translocação de bactérias Gram-negativas autóctones em nenhum dos animais, no experimento envolvendo

imunodepressão. Os animais imunodeprimidos apresentaram índice esplênico inferior aos dos animais controles, mas, não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre aqueles grupos tratados ou não com extrato aquoso de *A. blazei*. Não foram observadas diferenças na secreção de IgAs no intestino delgado nem nas secreções séricas de TNF- α , IFN- γ e IL-10 dos animais submetidos ao tratamento com o extrato aquoso de *A. blazei*, imunodeprimidos ou não. A administração de ciclofosfamida não alterou a histologia do íleo e fígado em comparação com os controles, porém, no baço dos animais imunodeprimidos examinados observou-se redução dos folículos linfóides e depleção linfocitária, sendo que a administração do extrato aquoso de *A. blazei* não alterou esse aspecto. No experimento envolvendo desafio microbiano, os valores de índice esplênicos dos animais desafiados com *S. Typhimurium* não foram diferentes ($P>0,05$) daqueles encontrados em animais não desafiados ou nos animais em que se administrou extrato de *A. blazei*. A secreção de IgAs no intestino delgado dos camundongos assim como as secreções de TNF- α , IFN- γ e IL-10 não foram afetadas ($P>0,05$) pela administração do extrato aquoso de *A. blazei* ou pelo desafio microbiano. Colônias típicas de *S. Typhimurium* foram recuperadas do fígado, baço e linfonodos mesentéricos (MLNs) dos animais desafiados nas análises conduzidas no quinto dia após a inoculação de 10^6 UFC mL⁻¹ por animal. Contudo, não ocorreu diferença significativa ($P>0,05$) na translocação observada nos animais desafiados nos grupos tratados ou não com o extrato aquoso de *A. blazei*. No grupo desafiado com *S. Typhimurium*, as análises histopatológicas evidenciaram pequenos e difusos focos de infiltrado inflamatório misto no parênquima hepático, compatíveis com translocação. O baço dos animais desafiados também apresentou discreta hiperplasia reacional, com discreto aumento dos folículos linfóides e dos centros germinativos. O tratamento com o extrato aquoso não modificou a resposta do baço ou do fígado no grupo desafiado. À semelhança do grupo que recebeu apenas água e gavagem intragástrica com *Salmonella*, o íleo dos animais tratados com o extrato aquoso de *A. blazei* não apresentou alterações significativas. O extrato aquoso de *A. blazei* utilizado neste estudo, portanto, não influenciou nenhuma das variáveis selecionadas para analisar seus efeitos imunomoduladores *in vivo*.

ABSTRACT

FANTUZZI, Elisabete D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April 2007.
Assesment of immunomodulators effects of *Agaricus blazei* water extract and its relation to bacterial translocation in animal model.
Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-Advisers: Jacques Robert Nicoli and José Mário da Silveira Mezencio.

The goal of this work was to investigate the immunomodulator effects of *Agaricus blazei* water extract and its relation with the translocation of autochthonous bacteria as well as of *Salmonella enterica* Typhimurium (10^6 CFU mL⁻¹), in animal model. *A. blazei* water extract was administrated *ad libitum* and by intragastric gavage in mice of six to seven weeks, two weeks before the first dose of cyclophosphamide and until the 23th day of experiment. In the experiment using *S. enterica* Typhimurium to challenge the animals, *A. blazei* water extract was administrated daily for 16 days before the challenge and until the 22th day, when the animals were sacrificed. It was not verified significant difference ($P>0.05$) in the weight gain (g) of the animals among the tested groups during the weekly evaluation; however it was observed a similar reduction in the weight of animals submitted to the treatments of immunodepressive groups with cyclophosphamide 200 mg kg⁻¹ in the last week of evaluation, independently if *A. blazei* water extract was administrated or not *ad libitum* and by intragastric gavage. It was not observed translocation of autochthonous Gram-negative bacteria in none

of the evaluated animals, in the experiment involving immunodepression. The immunodepressed animals exhibited splenic index lower than the control animals, however it was not verified significant difference ($P>0.05$) among the groups treated or not with *A. blazei* water extract. It was not observed differences in the secretion of IgAs in the thin intestine as well as in the serum secretions of TNF- α , IFN- γ and IL-10 of the animals submitted to the treatment with *A. blazei* water extract independent if they were immunodepressed or not. The administration of cyclophosphamide did not change the histology of ileum and liver compared to the control samples, however, in the spleen of the immunodepressed animals evaluated, it was observed a reduction of the lymphoid follicles and lymphocytic depletion, and the administration of *A. blazei* water extract did not change this aspect. In the experiment involving microbial challenge, the values of splenic index of the defied animals with *S. enterica* Typhimurium were not different ($P>0.05$) from that found in animals not defied or in animals witch received the extract of *A. blazei*. The secretion of IgAs in the small intestine of mice as well as the secretions of TNF- α , IFN- γ and IL-10 were not affected ($P>0.05$) by the administration of *A. blazei* water extract or by microbial defy. Typical colonies of *S. enterica* Typhimurium were recovered from liver, spleen and mesenteric linfonods (MLNs) of the defied animals in the analyses conduced in the fifth day after inoculation of 10^6 CFU mL⁻¹ per animal. Nevertheless, significant difference ($P>0.05$) did not occur in the translocation observed in the defied animals of groups treated or not treated with *A. blazei* water extract. In the defied group with *S. enterica* Typhimurium the histopatologic analyses showed small and diffuse focuses of mixed inflammatory infiltrates in the hepatic parenchyma compatible with translocation. The spleen of defied animals also exhibited discreet reactional hyperplasia, with discreet increase lymphoid follicles and discrete increase of the germinal centers. The treatment with water extract did not modify the spleen and liver reply in the defied group. Similar to the group witch received only water and intragastric gavage with *Salmonella*, the ileum of treated animals with *A. blazei* water extract did not exhibit significant changes. The water extract of *A. blazei* used in this study, therefore, did not influence none of the selected variable to analyze its effect immunomodulators *in vivo*.

1 INTRODUÇÃO

O sistema imunológico contribui na homeostase dos vertebrados, por atuar como defesa contra microrganismos invasores e outros agentes agressores. Esse sistema é composto por várias células e moléculas sinalizadoras e pode ser dividido em sistema imune inato e sistema imune adaptativo. A resposta do sistema imune inato envolve o reconhecimento não-específico do agente agressor, enquanto a resposta imune adaptativa inclui o reconhecimento específico de epítopos do agente agressor e o posterior envolvimento de uma série de células e citocinas que, por sua vez, induzirão uma resposta imune celular e, ou humoral.

Os basidiomicetos superiores têm sido estudados com o objetivo não apenas nutricional, mas também medicinal, visando encontrar alternativas para a profilaxia ou terapêutica de doenças de etiologias diversas, como câncer, estresse, hipercolesterolemia, hipertensão, hepatite, dentre outras. Muitos trabalhos relatam que os cogumelos possuem substâncias que podem estimular o mecanismo de defesa do hospedeiro e, assim, podem auxiliar na prevenção e no tratamento das doenças ou de sintomas destas.

Dentre os cogumelos mais estudados, encontra-se o *Agaricus blazei*. Este cogumelo desperta atenção não apenas por suas características nutricionais, mas também por suas propriedades medicinais. Como cogumelo medicinal, *A. blazei* pode ser estudado como substância

modificadora da resposta biológica (BRM) ou imunomoduladora e na profilaxia de potenciais microrganismos invasores da mucosa intestinal, membros da microbiota autóctone ou não. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial imunomodulador do extrato aquoso de *A. blazei* e sua relação com a translocação de bactérias autóctones e *Salmonella* Typhimurium em animais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O sistema imunológico

2.1.1 Resposta imune

O sistema imunológico é um sistema de defesa, em vertebrados, que protege o hospedeiro contra microrganismos patogênicos invasores e outros agentes agressores, por meio de uma variedade de células e moléculas dinâmicas capazes de reconhecer, especificamente, e de eliminar uma grande diversidade de antígenos (ANDERSEN et al., 2006). Após o reconhecimento de um patógeno, ocorre uma resposta apropriada visando à eliminação ou neutralização dessa ameaça por uma série de células e moléculas do sistema imune. A exposição subsequente ao mesmo patógeno, por sua vez, induz uma resposta de memória imunológica, que é caracterizada por ser uma reação imune mais rápida, intensa e específica (ANDERSEN et al., 2006).

A imunidade inclui componentes não-específicos, que compõem a imunidade inata e, específicos, que fazem parte da imunidade adaptativa, que operam juntos para iniciar uma efetiva resposta imunológica (NETEA et al., 2005; ANDERSEN et al., 2006).

2.1.2 Tecido linfóide associado ao intestino (GALT)

O intestino tem um sistema imune mucoso complexo, que torna possível tolerar uma carga massiva de antígenos dietéticos e microrganismos comensais que colonizam o trato gastrointestinal. Ao mesmo tempo, porém, é capaz de reconhecer e rejeitar microrganismos que podem desafiar as defesas do corpo (BOURLIOUX et al., 2003). O tecido linfóide associado ao intestino (GALT) representa a maior massa de tecido linfóide no corpo humano. Conseqüentemente, ele constitui importante elemento da capacidade imunológica total do hospedeiro (ISOLAURI et al., 2001). Aproximadamente, 70% de todos os linfócitos do corpo humano estão dentro do GALT e a maioria dos anticorpos produzidos em indivíduos saudáveis é IgA, que é secretada através da membrana mucosa do intestino (MÜLLER e MacPHERSON, 2006).

O GALT é dividido em sítios indutores e efetores (McCRACKEN e LORENZ, 2001; NAGLER-ANDERSON, 2001; NEWBERRY e LORENZ, 2005). Os sítios indutores incluem as estruturas mais organizadas, tais como linfonodos mesentéricos (MLNs), placas de Peyer (PP), folículos linfóides isolados (ILFs) e placas das criptas (*cryptopatches* - CPs). Os sítios efetores incluem a lâmina própria e linfócitos intraepiteliais (NEWBERRY e LORENZ, 2005). Supõe-se, de acordo com Newberry e Lorenz (2005), que as estruturas organizadas no trato gastrointestinal possam desempenhar a função de órgãos linfóides primários, suportando o desenvolvimento extratímico de linfócitos T (CPs), de órgãos linfóides secundários envolvidos na indução da resposta imune mucosa (PPs) e estruturas linfóides terciárias, cuja função está sob debate, como o caso dos folículos linfóides isolados (ILFs). Assim, a apresentação de antígenos às células imunes efetoras é concentrada em folículos linfóides organizados da mucosa (SPAHN e KUCHARZIK, 2004).

As placas de Peyer são folículos linfóides altamente especializados na parede do intestino delgado que contêm células B virgens, células dendríticas foliculares e áreas ricas em linfócitos T (SPAHN e KUCHARZIK, 2004). As placas de Peyer são cobertas pelo epitélio associado ao folículo (FAE), que contêm células epiteliais especializadas, as células M (SPAHN e

KUCHARZIK, 2004; NEWBERRY e LORENZ, 2005). Assim, as placas de Peyer são diferentes de outras estruturas linfóides secundárias, visto que não possuem vasos linfáticos aferentes e a amostragem de antígeno é controlada pelas células M (NEWBERRY e LORENZ, 2005). O FAE, por sua vez, tem várias diferenças, quando comparado com o epitélio intestinal que cobre os vilos, é deficiente em células caliciformes e células de Paneth, tem mais enterócitos cubóides, além de possuir concentrações reduzidas de enzimas hidrolases digestivas e outras da borda em escova (NEWBERRY e LORENZ, 2005).

As células dendríticas localizadas nas PPs também exercem uma importante função na apresentação de antígenos luminiais. Rescigno et al. (2001) relataram que as células dendríticas são capazes de captar antígenos luminiais, diretamente, através do espaço intercelular. Esses autores verificaram que as células dendríticas são capazes de “abrir” as junções oclusivas entre as células epiteliais e, pelo fato de também expressarem proteínas dessas junções, a integridade da barreira epitelial é preservada.

Os folículos linfóides isolados (ILFs) foram descritos pela primeira vez por Hamada et al. (2002). Esses autores os identificaram como agrupamentos de 100 a 200 linfócitos, localizados ao longo do intestino delgado de camundongos. Segundo esses mesmos autores, os ILFs são compostos por uma grande área de linfócitos B, incluindo centro germinal e uma cobertura de FAE contendo células M. Os ILFs também estão presentes no cólon, mas a maioria dos estudos têm examinado o intestino delgado (NEWBERRY e LORENZ, 2005).

As placas das criptas (CPs) são agrupamentos organizados de aproximadamente 1.000 células localizadas na base das criptas intestinais (NEWBERRY e LORENZ, 2005). A função das CPs é matéria de controvérsia, mas, logo que elas foram identificadas, consideraram-nas como o sítio de desenvolvimento extra-tímico de linfócitos intraepiteliais (NEWBERRY e LORENZ, 2005).

Os linfonodos encontrados no mesentério do intestino delgado são os maiores linfonodos encontrados no corpo e são os primeiros a se desenvolverem durante a embriogênese (NEWBERRY e LORENZ, 2005). Os linfonodos mesentéricos (MLNs) funcionam como uma segunda linha de

defesa dos tecidos linfóides organizados, filtrando o conteúdo dos vasos linfáticos mesentéricos (SPAHN e KUCHARZIK, 2004).

Os tecidos linfóides difusos são compostos de plasmócitos produtores de IgA e células T maduras (BOURLIOUX et al., 2003). As células efectoras encontram-se dispersas pela mucosa intestinal, sendo que a maioria dos linfócitos T intraepiteliais tem o fenótipo CD8 (citotóxicos ou supressores), enquanto os linfócitos T da lâmina própria apresentam o fenótipo CD4 (auxiliares) (BOURLIOUX et al., 2003). A lâmina própria também contém linfócitos da linhagem B, células B de memória e plasmócitos, sendo 70 a 90% desses produtores de IgA (BOURLIOUX et al., 2003).

2.1.3 Citocinas

As citocinas são glicoproteínas, que são reguladoras intercelulares cruciais e mobilizadoras de células engajadas na imunidade bem como na resposta inflamatória adaptativa do hospedeiro, crescimento, diferenciação e morte celular; angiogênese e processos de desenvolvimento e reparo que auxiliam a restauração da homeostase (ECKMANN et al, 2001; OPPENHEIM, 2001). Embora as citocinas sejam ocasionalmente produzidas constitutivamente, elas são, geralmente, produzidas por qualquer tipo celular nucleado em resposta a um estímulo ofensivo (OPPENHEIM, 2001).

2.1.4 Imunoglobulina A secretora (IgAs)

A IgA é a classe de anticorpo predominante em muitas secreções externas e tem muitas funções, diretas e indiretas, que servem para prevenir agentes infecciosos, tais como bactérias e vírus, de romper a barreira mucosa (FAGARASAN e HONJO, 2002; WOOF e MESTECKY, 2005). Além disso, grande parte da IgA secretada na mucosa intestinal, diariamente, é dirigida contra a microbiota comensal, em uma via independente do auxílio

de linfócitos T, sendo também considerada parte do sistema imune inato (MacPHERSON et al., 2000). Os plasmócitos na lâmina própria e outros sítios da mucosa secretam mais de $40 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ de IgA, mais que qualquer outro isotipo de anticorpo no corpo humano (McCRACKEN e LORENZ, 2001). De acordo com Bollinger et al. (2003) e Everett et al. (2004), a IgA secretora (IgAs) é um dos principais fatores que previnem a translocação bacteriana, que pode resultar em sepse e morte no hospedeiro.

A IgA nas secreções é composta de pelo menos dois monômeros de moléculas de IgA covalentemente ligadas por meio da cadeia J e do componente secretor (SC) (PHALIPON et al., 2002). As células epiteliais intestinais são responsáveis por mediar a transcitose da IgA dimérica, através do receptor de imunoglobulina polimérica (pIgR) (FERNANDEZ et al., 2003; WOOF e KERR, 2004). Durante esse processo, o pIgR é clivado e o componente maior permanece covalentemente ligado à IgA dimérica. Dessa forma, o SC é um componente integral da molécula de IgA liberada nas secreções, e acredita-se que ajuda a proteger o anticorpo da degradação (WOOF e KERR, 2004). Por outro lado, por razões que permanecem incertas, a IgA sérica é principalmente monomérica em humanos (e possivelmente em outros primatas), mas é principalmente dimérica em outros animais (WOOF e KERR, 2004).

De acordo com Fernandez et al. (2003), a proteção da barreira epitelial por IgAs pode ser disparada por dois tipos de mecanismos distintos; primeiro por prevenir a infecção bacteriana, que limita a invasão de bactérias por exclusão imune; e, segundo, por prevenção da doença, ou seja, por proteger da inflamação que destrói o tecido. A IgA é relativamente não-inflamatória, pois não ativa o complemento e, dessa forma, previne uma resposta inflamatória excessiva a antígenos microbianos e dietéticos ubíquos (McCRACKEN e LORENZ, 2001).

Wijburg et al. (2006) relataram o papel de IgAs contra infecção por *S. Typhimurium* em experimentos *in vivo* e *in vitro*. Esses autores desafiaram camundongos nocaute para o receptor de imunoglobulina polimérica, que são incapazes de ligar e ativamente transportar IgA dimérica e IgM pentamérica para a mucosa, com 10^7 UFC de *S. Typhimurium*. Uma invasão significativamente maior das placas de Peyer e da mucosa intestinal foi

observada, em comparação com o grupo controle, composto de camundongos selvagens. Em relação à rota oral-fecal de disseminação de *S. Typhimurium*, esses pesquisadores também demonstraram que imunoglobulinas secretoras podem também reduzir a disseminação de patógenos e infecção entre os indivíduos. Esta última observação, segundo os autores, sugere que as imunoglobulinas secretoras têm um papel evolucionário importante, protegendo não apenas o indivíduo, mas também toda a população contra infecções.

2.2 Cogumelos medicinais

Atualmente, os basidiomicetos superiores têm-se tornado assunto de grande interesse, por seu valor nutricional e propriedades farmacológicas. Com fins medicinais, eles têm sido consumidos com objetivo de prevenir câncer e doenças cardíacas, melhorar a circulação sanguínea e reduzir o colesterol (WASSER e WEIS, 1999). Além disso, esses cogumelos são usados para combater o estresse físico e emocional, para estimular a imunidade, melhorar a qualidade de vida de diabéticos, para combater doenças como osteoporose, úlcera gástrica e hepatite crônica (MENOLI et al., 2001; GUTERREZ et al., 2004; ANGELI et al., 2006; CHOI et al., 2006; GRIND et al.; 2006). Porém, estudos científicos sobre suas propriedades biológicas ainda são insuficientes (MENOLI et al., 2001; GUTERREZ et al., 2004).

2.2.1 *Agaricus blazei*

O basidiomiceto *Agaricus blazei* Murrill é um cogumelo comestível nativo do sudeste do Brasil, popularmente conhecido como “cogumelo do sol”, que vem sendo produzido e consumido em grande escala como alimento e, principalmente, como chá (MIZUNO, 1995; MENOLI et al., 2001; DELMANTO et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002; BARBISAN et al., 2002;

BELLINI et al., 2003; RODRIGUES et al., 2003; GUTERREZ et al., 2004). Desde 1965, essa estirpe é exportada do Brasil para o Japão, onde é popularmente conhecida como “Himematsutake” ou “Kawariharatake”, sendo hoje amplamente cultivada e estudada nesse país (MENOLI et al., 2001).

De acordo com Mizuno (1995), o corpo de frutificação de *A. blazei* contém 85 a 87% de água e, quando desidratado, é rico em proteínas (40 a 45%), carboidratos (38 a 45%), fibras (6 a 8%), resíduos totais (5 a 7%), lipídios (3 a 4%) e vitaminas (em mg%), tais como B₁ (0,3 mg), B₂ (3,2 mg) e niacina (49,2 mg). Ele também contém quantidade relativamente grande de ergosterol (0,1 a 0,2%), que é convertido em vitamina D₂ após exposição à luz ou cozimento. Dentre os minerais, o potássio é o principal componente de *A. blazei*. Além desses nutrientes, *A. blazei* também pode ser considerado como fonte de substâncias biológica e fisiologicamente ativas (TSAI et al., 2007).

Kawagish et al. (1989), em um estudo sobre o fracionamento do resíduo insolúvel em água do corpo de frutificação de *A. blazei* e sua atividade antitumoral contra sarcoma 180 em camundongos, encontraram que, dentre as frações obtidas, a mais ativa foi a FIII-2-b, um complexo de carboidratos (50,2%), (1→6)-β-D-glucano, ligado a proteínas (43,3%). Este foi o primeiro trabalho que associou a atividade antitumoral com um glucano contendo somente resíduos β-(1→6) ligados. Posteriormente, Kawagish et al. (1990) tentaram separar a fração FIII-2-b em seus dois componentes e avaliar a atividade antitumoral dos produtos resultantes. Apesar destes autores não terem obtido êxito em conseguir a proteína livre do carboidrato, eles puderam observar que o carboidrato isolado não exibiu uma forte atividade antitumoral e concluíram que o componente protéico era essencial para essa atividade.

Mizuno et al. (1998) observaram aumento nas subpopulações de células T após a administração oral, em camundongos, de α-1,6-glucano e α-1,4-glucano, polissacarídeos isolados de *A. blazei*. Componentes das frações de *A. blazei*, obtidas por extrações com diferentes concentrações de etanol, apresentaram a capacidade de ativar macrófagos *in vitro* e aumentar a expressão de mRNA de IL-8 e TNF-α (SORIMACHI et al., 2001). Estas observações levaram os autores a concluir que o fato de certos pacientes

com câncer, aparentemente, recuperarem da doença, após a ingestão de extratos de *Agaricus*, pode ser devido à ativação do sistema imune, ao invés do efeito direto destes nas células neoplásicas. Nakajima et al. (2002) também investigaram as atividades imunopotencializadoras do extrato solúvel de *A. blazei* em água fervente. Eles observaram aumento na expressão de mRNA de IL-6 e mRNA de IL-1 β nos macrófagos isolados da cavidade peritoneal e nas células de baço dos camundongos que receberam injeção intraperitoneal do extrato de *A. blazei* (25 mg/kg). Esses últimos autores concluíram, então, que o extrato de *A. blazei* Murrill pode ser uma importante substância para aumento do mecanismo de defesa imune e prevenção de várias doenças.

O aumento nas concentrações de citocinas MIP-2 e TNF- α no soro de camundongos que receberam o extrato de *A. blazei* foi constatado e resultou em proteção contra infecção sistêmica por *Streptococcus pneumoniae*, devido ao envolvimento do sistema imune inato (BERNARDSHAW et al., 2005).

Além dos estudos que identificaram a atividade antitumoral dos complexos polissacarídeos-proteína isolados de *A. blazei*, em roedores, a atividade antimutagênica também foi demonstrada nos extratos aquosos deste (DELMANTO et al., 2001; MENOLI et al., 2001; RODRIGUES et al., 2003; GUTERREZ et al., 2004). Takaku et al. (2001) reportaram a ação do ergosterol, isolado da fração lipídica de *A. blazei*, como responsável pela atividade antitumoral contra sarcoma 180 em camundongos. A atividade antitumoral, segundo os mesmos autores, pode ser atribuída à inibição direta da angiogênese, o que resultou na morte das células tumorais.

2.2.2 Modificadores da resposta biológica (BRMs)

Os modificadores da resposta biológica (BRMs) são substâncias que aumentam a resposta imune e podem ser produzidos endogenamente no corpo por células imunes ou podem ser derivados de bactérias, fungos, algas e plantas (LEUNG et al., 2006). Uma substância imunomoduladora, BRMs ou agente bioterapêutico, é importante para o tratamento de câncer e

doenças infecciosas (HARADA et al., 2002a; HARADA, 2002b; HARADA et al., 2006). Entre os BRMs exógenos, os polissacarídeos são de maior ocorrência na natureza e, entre os principais BRMs derivados de fungos, estão o β -glucano e α -mananas (KIM et al., 2006; LEUNG et al., 2006).

Os β -glucanos, carboidratos e principais componentes da parede celular de leveduras, fungos filamentosos e cereais, como aveia e cevada, têm sido extensivamente investigados por suas atividades imunomoduladoras (YUN et al., 2003). β -glucanos com variados pesos moleculares e estruturas secundárias, isolados de várias fontes naturais, são reconhecidos pela sua capacidade de ativar mecanismos de defesa imune contra infecções parasíticas e microbianas (YUN et al., 2003). Burgaleta e Golde (1977) observaram que a administração intraperitoneal de glucano, um produto parcialmente purificado da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, aumentou a produção de granulócitos e monócitos em camundongos, sugerindo que, quando glucano é usado como agente imunoterapêutico, pode ocorrer o aumento no número de células efetoras disponíveis. O glucano isolado de *S. cerevisiae* também foi avaliado quanto à sua capacidade protetora em infecções respiratórias em ratos e camundongos (KIMURA et al., 1983). A administração intravenosa de glucano, em ratos, antes da infecção com aerossóis de *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, aumentou as taxas de morte bacteriana, possivelmente em razão do aumento nas taxas de fagocitose pelos macrófagos pulmonares. No entanto, os efeitos de proteção induzidos pelo glucano foram menos claros em camundongos. Kogan et al. (1989) administraram, por via intravenosa ou subcutânea, em camundongos, diferentes doses de glucano isolado de *S. cerevisiae* e obtidos por diferentes processos. Posteriormente, inocularam esses animais intraperitonealmente com *K. pneumoniae* e observaram aumento do tempo médio de sobrevivência dos camundongos. Com base nos resultados, os autores concluíram que os derivados solúveis do glucano particulado originado da parede celular de *S. cerevisiae*, com pesos moleculares relativamente baixos, podem servir como agentes anti-infecciosos e podem ser usados em terapias veterinária e humana.

O glucano isolado do fungo *Sparassis crispa* exerceu efeitos imunestimuladores diferenciados em várias estirpes de camundongos (HARADA et al., 2002a). Esses autores não observaram indução na secreção de IFN- γ , *in vitro*, em esplenócitos isolados na maioria das estirpes testadas, porém, a concentração de IFN- γ foi significativamente aumentada nos camundongos DBA/2 e DBA/1, na presença do glucano.

O aumento no número de linfócitos intraepiteliais (IEL) e a produção espontânea de IFN- γ no intestino de camundongos, após administração oral e diária de β -glucano, isolado de levedura, durante uma semana (25 mg/dia/camundongo) também foram observados (TSUKADA et al., 2003). Esses resultados sugeriram, portanto, que o β -glucano pode potencializar a imunidade da mucosa do trato digestivo. Yun et al. (2003) constataram aumento da atividade fagocítica em macrófagos isolados da cavidade peritoneal de camundongos, promovida pelo β -glucano extraído de aveia. Por meio dos estudos *in vivo*, eles concluíram que o tratamento oral ou parenteral com β -glucano, isolado de aveia, aumenta a resistência à infecção por *S.aureus* ou *Eimeria vermiciformes*, em camundongos.

2.3 Translocação bacteriana

O trato gastrintestinal adulto abriga um ecossistema complexo composto por um conjunto onde o epitélio gastrintestinal, células imunes subjacentes e a microbiota autóctone interrelacionam-se (McCRACKEN e LORENZ, 2001). Embora cada componente dessa aliança seja capaz de certo grau de desenvolvimento independente dos outros membros, todos os três são essenciais para a função completa e o desenvolvimento da maturidade desse ecossistema. Os fatores ambientais, tais como a composição do alimento e o pH luminal, influenciam a porção transitória da microbiota, porém, a porção autóctone de um adulto consiste de uma comunidade clímax de microrganismos que permanece relativamente estável ao longo da vida (BERG, 1996; WIEST e RATH, 2003). O conhecimento sobre a ecologia microbiana do intestino dos mamíferos, no

entanto, é limitado, sendo fundamentado somente em estudos de microrganismos que podem sobreviver fora do intestino (HOOPER, 2004).

A microbiota intestinal autóctone exerce efeitos pronunciados no desenvolvimento anatômico, fisiológico e imunológico do hospedeiro; estimula o sistema imune a responder mais rapidamente ao desafio de patógenos e, por meio do antagonismo bacteriano, inibe a colonização do trato gastrintestinal por patógenos externos (BERG, 1996). No entanto, na microbiota autóctone também existem patógenos oportunistas que podem translocar através da barreira mucosa, causando infecções sistêmicas em hospedeiros debilitados (BERG, 1996).

O termo translocação foi usado inicialmente por Wolochow et al. (1966) e Fuller e Jaine-Williams (1970) para descrever a passagem de microrganismos do trato gastrintestinal para órgãos extra-intestinais. Berg e Carlington (1979) usaram pela primeira vez o termo translocação bacteriana para descrever a passagem de certas bactérias autóctones do trato gastrintestinal para o complexo de linfonodos mesentéricos e outros órgãos extra-intestinais de camundongos isentos de germes (*GF-germ-free*) que haviam sido previamente inoculados com o conteúdo cecal de camundongos isentos de patógenos específicos (*SPF-especific-pathogen-free*). Dessa forma, o termo translocação bacteriana inicialmente foi empregado para descrever a passagem somente de bactérias autóctones do trato gastrintestinal para órgãos extra-intestinais. Em 1990, Alexander et al. propuseram que o termo fosse redefinido para incluir toda a translocação microbiana, incluindo a passagem de microrganismos viáveis e não viáveis, e também de produtos microbianos, tais como endotoxinas. Portanto, atualmente, de acordo com Wiest e Rath (2003), translocação microbiana engloba a passagem, através do epitélio intestinal, de microrganismos viáveis e não viáveis, bem como de produtos microbianos.

As bactérias classificadas como patógenos intracelulares facultativos, ou seja, aquelas que são capazes de sobreviver dentro de leucócitos e macrófagos após a fagocitose, como por exemplo espécies de *Salmonella*, parecem translocar mais rapidamente (WIEST e RATH, 2003). As bactérias autóctones, por sua vez, translocam continuamente, em baixo número mesmo em hospedeiros saudáveis (BERG, 1992; BERG, 1995;

WIEST e RATH, 2003). No entanto, são inativadas nos órgãos linfóides pelo sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro e, com isso, outros órgãos extra-intestinais permanecem estéreis (BERG, 1992; BERG, 1995; WIEST e RATH, 2003). Portanto, as bactérias autóctones que translocam continuamente do trato gastrointestinal, não são capazes de estabelecer uma infecção persistente nos linfonodos ou outros sítios extra-intestinais de animais saudáveis imunocompetentes. Segundo Berg (1996), essa translocação “fisiológica” seria responsável pela função de imunomodulação que, juntamente com a resistência à colonização e a contribuição nutricional, são as três grandes funções benéficas oferecidas pela microbiota indígena ao hospedeiro que a aloja. Componentes antigênicos provenientes da microbiota seriam assim, continuamente apresentados ao sistema imune, permitindo a sua manutenção em estado de alerta para poder responder mais rapidamente e de forma adequada, em caso de agressão infecciosa.

A função da microbiota intestinal na resistência à colonização e conseqüente redução da translocação foi demonstrado por Berg e Owens (1979). Estes autores inocularam camundongos isentos de germes com a microbiota autóctone antagonista obtida do ceco de camundongos SPF. Posteriormente, desafiaram estes mesmos camundongos com *E. coli* e observaram que a translocação cessou em 24 horas, possivelmente devido à ação da microbiota competidora. Porém, o tratamento de camundongos com penicilina, clindamicina ou metronidazol, por via oral, durante apenas quatro dias, rompeu o equilíbrio ecológico da microbiota, permitindo o supercrescimento de bacilos Gram-negativos no ceco de camundongos SPF, possibilitando a translocação bacteriana (BERG, 1981). Além disso, o efeito sinérgico do supercrescimento bacteriano e da imunodepressão do hospedeiro, obtidos por meio da administração combinada de antibióticos orais e drogas imunodepressoras, promoveu a translocação bacteriana do trato gastrointestinal que resultou em sepse letal em camundongos, após 12 dias (BERG et al., 1988).

A translocação bacteriana para os linfonodos mesentéricos, que são os primeiros órgãos encontrados na rota de translocação a partir do lúmen intestinal, é rapidamente promovida pelo supercrescimento microbiano (BERG, 1995). O grau de translocação de certas espécies de

Enterobacteriaceae para os linfonodos mesentéricos é diretamente relacionado à sua concentração no intestino delgado e ceco (STEFFEN e BERG, 1983). Além disso, das várias espécies de bactérias autóctones nem todas translocam do trato gastrointestinal para os linfonodos mesentéricos ou outros órgãos extra-intestinais com a mesma eficiência (STEFFEN et al. 1988). As bactérias que translocam com mais eficiência, a partir do trato gastrointestinal para os linfonodos mesentéricos de camundongos gnotobióticos monoassociados (*germ-free* colonizados com uma única estirpe bacteriana), são *Pseudomonas aeruginosa* e Enterobacteriaceae Gram-negativas, anaeróbias facultativas, tais como *K. pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* (STEFFEN et al. 1988). Além destas, também translocam, mas com menor eficiência, espécies de *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, como também *Candida albicans* e, possivelmente, *S. aureus* (WELLS, 1990). Curiosamente, esses microrganismos são os mais frequentemente associados com complicações infecciosas em pacientes hospitalizados severamente doentes (WELLS, 1990; WIEST e RATH, 2003). Na ordem decrescente de capacidade de translocação bacteriana encontram-se, portanto, bactérias Gram-negativas anaeróbias facultativas, bactérias Gram-positivas anaeróbias facultativas e, finalmente, bactérias anaeróbias estritas (BERG, 1995).

2.3.1 Fatores que induzem a translocação bacteriana

Existem três mecanismos primários que promovem a translocação bacteriana do trato gastrointestinal: (1) supercrescimento bacteriano no intestino, (2) deficiências nas defesas imunes do hospedeiro e (3) aumento da permeabilidade ou dano na barreira do epitélio intestinal (BERG, 1992; BERG 1995; BERG, 1999; WIEST e RATH, 2003). Vários modelos animais têm sido utilizados para estudar a translocação bacteriana (BERG, 1995; BERG, 1999; WIEST e RATH, 2003). A administração oral de antibióticos a camundongos enquadra-se dentro do modelo de supercrescimento bacteriano, enquanto a injeção de agentes imunossupressores em camundongos é um dos modelos de enfraquecimento das defesas imunes

do hospedeiro (BERG, 1995; BERG, 1999). A ciclofosfamida é uma droga usada para o tratamento de doenças neoplásicas e como agente imunossupressor em diversas doenças como artrite reumatóide, lupus eritematoso sistêmico, glomerulonefrite, esclerose múltipla e outras doenças não-malignas, bem como em transplantes de órgãos, porém, é também carcinogênica e produz tumores secundários (ANDERSON et al., 1995). De acordo com as características imunossupressoras, geralmente, a ciclofosfamida é usada para induzir leucopenia em animais experimentais (HUANG et al., 2007; HOU et al., 2007) e como droga promotora de translocação microbiana em modelos animais (BERG, 1983; SUZUKY et al., 1996; PÉRET FILHO et al., 1996). A ciclofosfamida tem vários efeitos que prejudicam a resistência do hospedeiro, mas o descréscimo no número de granulócitos circulantes é, provavelmente, um dos mais importantes fatores para seu uso em diferentes modelos animais, visto que pode ocasionar infecção severa e sepse nestes (ZULUAGA et al., 2006).

O dano físico à mucosa intestinal constitui uma terceira alternativa para promover a translocação bacteriana em modelos animais e pode ser provocado pela administração oral de ácido ricinoléico, pela indução de endotoxemia e por injúria térmica, dentre outros (BERG, 1995; BERG, 1999). Contudo, em situações clínicas, mais de um mecanismo, freqüentemente, atua para promover a translocação bacteriana a partir do trato gastrintestinal (BERG, 1999).

2.3.2 Translocação de *Salmonella*

As infecções gastrintestinais são um dos principais problemas de saúde pública em vários países, não apenas naqueles em desenvolvimento, mas também em países da Europa e nos Estados Unidos, onde esta incidência atinge valores superiores a 10 % anualmente (BOVEE-OUDEHOVEN et al., 2003). Entre os microrganismos, *Salmonella* se destaca como uma das principais causas de infecções gastrintestinais em humanos (HAPFEILMEIR e HARDT, 2005; KALUPAHANA et al., 2005; LEE et al., 2006; SASHINAMI et al., 2006). Em camundongos, *Salmonella*

enterica sorotipo Typhimurium causa infecção sistêmica, semelhante à patogênese da febre tifóide em humanos (OHL e MILLER, 2001; KALUPAHANA et al., 2005; SASHINAMI et al., 2006). A virulência da *Salmonella* é dada por diversos agrupamentos de genes de virulência, chamados ilhas de patogenicidade, SPI-1 e SPI-2, que são importantes para a adesão à mucosa, invasão das células epiteliais e estimulação da secreção de fluidos, que causa os sintomas diarréicos (SASHINAMI et al., 2006). Após exposição à bactéria, diversas respostas são direcionadas contra a infecção bacteriana e uma delas é a produção de citocinas inflamatórias, como interferon gamma (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alpha (TNF- α) (SASHINAMI et al., 2006).

O uso de antibióticos é a principal estratégia para a erradicação de *Salmonella* e os agentes antimicrobianos são usados rotineiramente como terapêuticos e profiláticos em salmoneloses humana e animal (LEE et al., 2006). Com o aumento da resistência a essas drogas, novas alternativas têm sido pesquisadas contra essa doença, tais como o uso de probióticos (RODRIGUES et al., 1996; LIMA-FILHO et al., 2004; SILVA et al., 2004), plantas medicinais (LEE et al., 2006; STEFANOVA et al., 2007) e modulação dietética por meio de alimentos funcionais (VAN DER MEER e BOVEE-OUDEHOF, 1998; BOVEE-OUDEHOF et al., 2003; TEN BRUGGENCAT et al., 2004).

Alguns estudos também têm avaliado a utilização de substâncias da medicina alternativa no combate à infecção por *Salmonella*. Lee et al. (2006) examinaram o efeito de *Schizandrae fructus* contra infecção por *S. Typhimurium*, em camundongos e concluíram que a administração do extrato metanólico teve efeitos na mortalidade e no número de *S. Typhimurium* viáveis nas fezes dos animais inoculados. Além disso, somente um animal do grupo que recebeu o extrato havia morrido, quatro dias após a infecção, enquanto todos os camundongos do grupo controle sucumbiram pela infecção. Esses autores não detectaram sinais clínicos e danos histológicos nos animais tratados com o extrato de *S. fructus*. Stefanova et al. (2007) observaram redução da contagem de *S. Typhimurium* no fígado e baço de camundongos, 24 horas, três e cinco dias após a inoculação intraperitoneal da bactéria e administração de cumarina. Outras substâncias

imunomoduladoras em potencial, como os extratos de basidiomicetos, também podem ser pesquisadas com o objetivo de protegerem o hospedeiro contra infecção por *Salmonella*.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, J. W., BOYCE, S. T., BABCOCK, G. F., GIANOTTI, L., PECK, M. D., LUNN, D. L., PYLES, T., CHILDRESS, C. P., ASH, S. K. The process of microbial translocation. **Annals of Surgery**, v.212, p.496-512, 1990.

ANDERSEN, M. H., SCHRAMA, D., STRATEN, P. T., BECKER, J. C. Cytotoxic T cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v.126, p.32-41, 2006.

ANDERSON, D., BISHOP, J. B., GARNER, R. C., OSTROSKY-WEGMAN, P., SELBY, P. B. Cyclophosphamide: Review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. **Mutation Research**, v.330, p.115-181, 1995.

ANGELI, J. P. F., RIBEIRO, L. R., GONZAGA, M. L. C., SOARES, S. DE A., RICARDO, M. P. S. N., TSUBOY, M. S., STIDL, R., S., KNASMUELLER, LINHARES, R. E., MANTOVANI, M. S. Protective effects of β -glucan extracted from *Agaricus brasiliensis* against chemically induced DNA damage in humans lymphocytes. **Cell Biology and Toxicology**, v.22, p.285-291, 2006.

BARBISAN, L. F., MYAMOTO, M., SCOLASTICI, C., SALVADORI, D. M. F., RIBEIRO, L. R., EIRA, A. F., CAMARGO, J. V. L. Influence of aqueous extract of *Agaricus blazei* on rat liver toxicity induced by different doses of diethylnitrosamine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.83, p.25-32, 2002.

BELLINI, M. F., GIACOMINI, N. L., EIRA, A. F., RIBEIRO, L. R., MANTOVANI, M. S. Anticlastogenic effect of aqueous extracts of *Agaricus blazei* on CHO-k1 cells, studying different developmental phases of mushroom. **Toxicology in Vitro**, v.17, p.465-469, 2003.

BERG, R. D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract of mice receiving immunosuppressive chemotherapeutic agents. **Current Microbiology**, v.8, p.285-292, 1983.

BERG, R. D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. **Trends in Microbiology**, v.3, p.149-154, 1995.

BERG, R. D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.473, p.11-30, 1999.

BERG, R. D. Promotion of the translocation of enteric bacteria from the gastrointestinal tracts of mice by oral treatment with penicillin, clindamycin, or metronidazole. **Infection and Immunity**, v.33, p.854-861, 1981.

BERG, R. D. The indigenous gastrointestinal microflora. **Trends in Microbiology**, v.4, n.11, p.430-435, 1996.

BERG, R. D. Translocation and the indigenous gut flora. In: FULLER, R. **Probiotic: the scientific basis**. London: Chapman e Hall, p.55-85, 1992.

BERG, R. D., CARLINGTON, A. W. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. **Infection and Immunity**, v.23, p.403-411, 1979.

BERG, R. D., OWENS, W. E. Inhibition of translocation of viable *Escherichia coli* from the gastrointestinal tract of mice by bacterial antagonism. **Infection and Immunity**, v.25, p.820-827, 1979.

BERG, R. D., WOMMACK, E., DEITCH, E. A. Immunosuppression and intestinal bacterial overgrowth synergistically promote bacterial translocation. **Archives of Surgery**, v.123, p. 1359-64, 1988.

BERNARDSHAW, S., JOHNSON, E., HETLAND, G. An extract of the mushroom *Agaricus blazei* Murill administered orally protects against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.62, p.393-398, 2005.

BOLLINGER, R. R., EVERETT, M. L., PALESTRANT, D., LOVE, S. D., LIN, S. S., PARKER, W. Human secretory immunoglobulin A contribute to biofilm formation in the gut. **Immunology**, v.109, p.580-587, 2003.

BOURLIOUX, P., KOLETZKO, B., GUARNER, F., BRAESCO, V. The intestine and its microflora are partners for then protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine", held in Paris, June 14, 2002. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.78, p.675-683, 2003.

BOVEE-LOUDENHOVEN, I. M. J., TEN BRUGGENCATE, S. J. M., LETTINK-WISSINK, M. L. G., VAN DER MEER, R. Dietary fructo-oligosaccharides and lactulose inhibit intestinal colonization but stimulate translocation of salmonella in rats. **Gut**, v.52, p.1572-1578, 2003.

BURGALETA, C., GOLDE, D. W. Effect of glucan on granulopoiesis and macrophage genesis in mice. **Cancer Research**, v.37, p.1739-1742, 1977.

CHOI, Y. H., YAN, G. H., CHAL, O. H., CHOI, Y. H., ZHANG, X., LIM, J. M., KIM, J-H., LEE, M. S., HAN, E-H, KIM, H. T. Inhibitory effects of *Agaricus blazei* on mast cell-mediated anaphylaxis-like reactions. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.29, n.7, p.1366-1371, 2006.

DELMANTO, R. D., DE LIMA, P. L. A., SUGUI, M. M., DA EIRA, A. F., SALVADORI, D. M. F., SPEIT, G., RIBEIRO, L. R. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Mutation Research**, v.496, p.15-21, 2001.

ECKMANN, L., KAGNOFF, M. F. Cytokines in host defense against *Salmonella*. **Microbes and Infection**, v.3, p.1191-1200, 2001.

EVERETT, M. L., PALESTRANT, D., MILLER, S. E., BOLLINGER, R. R., PARKER, W. Immune exclusion and immune inclusion: a new model of host-bacterial infections in the gut. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v.4, p.321-332, 2004.

FAGARASAN, S., HONJO, T. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defenses. **Nature Reviews Immunology**, v.3, p.63-72, 2002.

FERNANDEZ, M. I., PEDRON, T., TOURNEBIZE, R., OLIVO-MARIN, J-C., SANSONETTI, P. J., PHALIPON, A. Anti-inflammatory role for intracellular dimeric immunoglobulin A by neutralization of lipopolysaccharide in the epithelial cells. **Immunity**, v.18, p.739-749, 2003.

FULLER, K. G., JAINE-WILLIAMS, D. J. Resistance of the fowl (*Gallus domesticus*) to invasion by its intestinal flora. II. Clearance of translocated intestinal bacteria. **Research in Veterinary Science**, v.11, p.368-374, 1970.

GRIND, B., HETLAND, G., JOHNSON, E. Effects on gene expression and viral load of medicinal extract from *Agaricus blazei* in patients with chronic hepatitis C infection. **International Immunopharmacology**, v.6, p.1311-1314, 2006.

GUTERREZ, Z. R., MANTOVANI, M. S., EIRA, A. F., RIBEIRO, L. R., JORDÃO, B. Q. Variation of the antimutagenicity effects of water extracts of *Agaricus blazei* Murrill in vitro. **Toxicology in Vitro**, v.18, p.301-309, 2004.

HAMADA, H., HIROI, T., NISHIYAMA, Y., TAKAHASHI, H., MASUNAGA, Y., HACHIMURA, S., KAMINOGAWA, S., TAKAHASHI-IWANAGA, IWANAGA, T., KIYONO, H., YAMAMOTO, H., ISCHIKAWA, H. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. **Journal of Immunology**, v.168, p.57-64, 2002.

HAPFEILMEIR, S., HARDT, W-D. A mouse model for *S. typhimurium* induced enterocolitis. **Trends in Microbiology**, v.13, n.10. p.497-503, 2005.

HARADA, T., KAWAMINAMI, H., MIURA, N. N., ADACHI, Y., NAKAJIMA, M., YADOMAE, T., OHNO, N. Mechanism of enhanced hematopoietic response by soluble β -glucan SGC in cyclophosphamide-treated mice. **Microbiology and Immunology**, v. 50, n.9, p.687-700, 2006.

HARADA, T., MIURA, N. N., ADACHI, Y., NAKAJIMA, M., YADOMAE, T., OHNO, N. IFN- γ induction by SCG, 1,3-D-glucan from *Sparassis crispa*, in DBA/2 mice in Vitro. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v.22, p.1227-1239, 2002a.

HARADA, T., MIURA, N., ADACHI, Y., NAKAJIMA, M., YADOMAE, T., OHNO, N. Effect of SCG, 1,3- β -D-glucan from *Sparassis crispa* on the hematopoietic response in cyclophosphamide induced leukopenic mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.25, n.7, p.931-939, 2002b.

HOOPER, L. V. Bacterial contributions to mammalian gut development. **Trends in Microbiology**, v.12, p.129-134, 2004.

HOU, F. X., YANG, H. F., YU, T., CHEN, W. The immunosuppressive effects of 10 mg/kg cyclophosphamide in Wistar rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 2007, in press.

HUANG, G-C., WU, L-S., CHEN, L-G., YANG, L-L., WANG, C-C. Immuno-enhancement effects of Huang Qi Liu Tang in a murine model of cyclophosphamide-induced leucopenia. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, p.229-235, 2007.

ISOLAURI, E., SÜTAS, Y., KANKAANPÄÄ, P., ARVILOMMI, H., SALMINEN, S. Probiotics: effects on immunity. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.73 (suppl.), 444S-450S, 2001.

KALUPAHANA, R. S., MASTROENI, P., MASKELL, D., BLACKLAWS, B. A. Activation of murine dendritic cells and macrophages induced by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Immunology**, v.115, p.462-472, 2005.

KAWAGISHI, H., INAGAKI, R., KANAO, T., MIZUNO, T. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. **Carbohydrate Research**, v.186, p.267-273, 1989.

KAWAGISHI, H., KANAO, T., INAGAKI, R., MIZUNO, T. Formolysis of a potent antitumor (1 \rightarrow 6)- β -D-glucan-protein complex from *Agaricus blazei* fruiting bodies and antitumor activity of the resulting products. **Carbohydrate Polymers**, v.12, p.393-403, 1990.

KIM, G-Y., LEE, J-Y., LEE, J-O., RYU, C-H., CHOI, B. T., JEONG, Y-K., LEE, K-W., JEONG, S-C., CHOI, Y. H. Partial characterization and immunostimulatory effect of a novel polysaccharide-protein complex extracted from *Phellinus linteus*. **Biosciences Biotechnology and Biochemistry**, v.70, n.5, p.1218-1226, 2006.

KIMURA, A., SHERWOOD, R. L., GOLDSTEIN, E. Glucan alteration of pulmonary antibacterial defense. **Journal of the Reticuloendothelial Society**, v.34, p.1-11, 1983.

KOGAN, G., MASLER, L., SĂNDULA, J., NAVAROVÁ, J., TRNOVEC, T. Recent results on the structure and immunomodulating activities of yeast glucan. In: CRESCENZI, V., DEA, I. C. M., PAOLETTI, S., STIVALA, S. S. e SUTHERLAND, I. W. (Eds). **Biomedical and Biotechnological Advances in Industrial Polysaccharides**. New York: Gordon and Breach, 1989, p.251-258.

LEE, M-H., KWON, H. A., KWON, D-Y., PARK, H., SOHN, Y-C. K., EO, S-K., KANG, H-Y., KIM, S-W., LEE, J. H. Antibacterial activity of medicinal herb extracts against Salmonella. **International Journal of Food Microbiology**, v.111, p.270-275, 2006.

LEUNG, M. Y. K., LIU, C., KOON, J. C. M., FUNG, K. P. Polysaccharide biological response modifiers. **Immunology Letters**, v.105, p.101-114, 2006.

LIMA-FILHO, J. V. M., VIEIRA, L. Q., ARANTES, R. M. E., NICOLI, J. R. Effect of the Escherichia coli EMO strain on experimental infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in gnotobiotic mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p.1005-1013, 2004.

MacPHERSON, A., GATTO, D., SAINSBURY, E., HARRIMAN, G. R., HENGARTNER, H., ZINKERNAGEL, R. M. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. **Science**, v.288, n.23, p.2222-2226, 2000.

McCRACKEN, V. J., LORENZ, R. G. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. **Cellular Microbiology**, v.3, n.1, p.1-11, 2001.

MENOLI, R. C. R. N., MANTOVANI, M. S., RIBEIRO, L. R., SPEIT, G., JORDÃO, B. Q. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murril extracts on V79 cells. **Mutation Research**, v.496, p.5-13, 2001.

MIZUNO, M., MORIMOTO, M., MINATO, K-I, TSUCHIDA, H. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets. **Biosciences Biotechnology and Biochemistry**, v.62, p.434-437, 1998.

MIZUNO, T. Kawariharatake, *Agaricus blazei* Murrill: medicinal and dietary effects. **Food Reviews International**, v.11, p.167-172, 1995.

MÜLLER, C., MacPHERSON, A. J. Layers of mutualism with commensal bacteria protect us from intestinal inflammation. **Gut**, v.55, p.276-284, 2006.

NAGLER-ANDERSON, C. Man the barrier! Strategic defenses in the intestinal mucosa. **Nature Reviews Immunology**, v.1, p.59-67, 2001.

NAKAJIMA, A., ISHIDA, T., KOGA, M., TAKEUCHI, T., MAZDA, O., TAKEUCHI, M. Effect of water extract from *Agaricus blazei* Murrill on antibody-producing cells in mice. **International Immunopharmacology**, v.2, p.1205-1211, 2002.

NETEA, M. G., VAN DER MEER, J. W. M., SUTMULLER, R. P., ADEMA, G. J., KULLBERG, B-J., From the Th1/Th2 paradigm towards a toll-like receptor/T-helper bias. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.10, p.3991-3996, 2005.

NEWBERRY, R. D., LORENZ, R. G. Organizing a mucosal defense. **Immunological Reviews**, v.206, p.6-21, 2005.

OHL, M. E., MILLER, S. I. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. **Annual Review of Medicine**, v.52, p.259-274, 2001.

OLIVEIRA, J. M., JORDÃO, B. Q., RIBEIRO, L.R., EIRA, A. F., MANTOVANI, M. S. Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murrill lineage 99/26) in mammalian cells in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, v.40, p.1775-1780, 2002.

OPPENHEIM, J. J. Cytokines: past, present, and future. **International Journal of Hematology**, v.74, n.1, p.3-8, 2001.

PÉRET FILHO, L. A., PENNA, F. J., BAMBIRRA, E. A., NICOLI, J. R. Dose effect of oral *Saccharomyces boulardii* treatments on morbidity and mortality in immunosuppressed mice. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, p.111-116. 1998.

PHALIPON, A., CARDONA, A., KRAEHENBUHL, J-P., EDELMAN, L., SANSONETTI, P. J., CORTHÉSY, B. Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo. **Immunology**, v.17, p.107-115, 2002.

RESCIGNO, M., URBANO, M., VALZASINA, B., FRANCOLINI, M., ROTTA, G., BONASIO, R., GRANUCCI, F., KRAENBUHL, J-P., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayer to sample bacteria. **Nature Immunology**, v.2, n.4. p.361-367, 2001.

RODRIGUES, A.C.P., NARDI, R.M., BAMBIRRA, E.A., VIEIRA, E.C., NICOLI, J.R. Protective effect of *Saccharomyces boulardii* against experimental oral infection with *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri* in gnotoxenic mice. **Journal of Applied Microbiology**, v.81, p.251-256, 1996.

RODRIGUES, S. B., SOARES, I. A., MARQUES-SILVA, G. G., ROCHA, C. L. M. S. C. Avaliação do potencial antimutagênico do cogumelo do sol (*Agaricus blazei*) no sistema *methG1* em *Aspergillus (=Emericella) nidulans*. **Acta Scientiarum Agronomy**. V.25, n.2, p.513-517, 2003.

SASHINAMI, H., YAMAMOTO, T., NAKANE, A. The cytokine balance in the maintenance of a persistent infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in mice. **Cytokine**, v.33, p.212-218, 2006.

SILVA, A. M., BARBOSA, F. H. F., DUARTE, R., VIEIRA, L. Q., ARANTES, R. M. E., NICOLI, J. R. Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental salmonellosis in mice. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.29-37, 2004.

SORIMACHI, K., AKIMOTO, K., IKEHARA, Y., INAFUKU, K., OKUBO, A., YAMAZAKI, S. Secretion of TNF- α , IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei* Murrill fraction *in vitro*. **Cell Structure and Function**, v.26, p.103-108, 2001.

SPAHN, T. W., KUCHARZIK, T. Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs. **Gut**, v.53, n.3, p.456-465, 2004.

STEFANOVA, T., NIKOLOVA, N., MICHAILOVA, A., MITOV, I., IANCOV, I., ZLABINGER, G. J., NEYCHEV, H. Enhanced resistance to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice after coumarin treatment. **Microbes and Infection**, v.9, n.1, p.7-14, 2007.

STEFFEN, E. K., BERG, R. D., DEITH, E. A. Comparison of the translocation rates of various indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes. **Journal of Infectious Diseases**, v. 157, p.1032-1037, 1988.

STEFFEN, E. K., BERG, R. D. Relationship between cecal population levels of indigenous bacteria and translocation to the mesenteric lymph nodes. **Infection and Immunity**, v.39, p.1225-1259, 1983.

SUZUKY, T., ITOH, K., HAGIWARA, T., NAKAYAMA, H., HONJYO, K., HIROTA, Y., KANEKO, T., SUZUKI, H. Inhibition of bacterial translocation from the gastrointestinal tract of mice injected with cyclophosphamide. **Current Microbiology**, v.33, p.78-83, 1996.

TAKAKU, T., KIMURA, Y., OKUDA, H. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murrill and its mechanism of action. **Journal of Nutrition**, v.131, p.1409-1413, 2001.

TEN BRUGGENCAT, S. J. M., BOVEE-OUDEHOFEN, I. M. J., LETTINK-WISSINK, M. L. G. KATAN, M. B., VAN DER MEER, R. Dietary fructo-oligosaccharides and inulin decrease resistance of rats to salmonella: protective role of calcium. **Gut**, v.53, p.530-535, 2004.

TSAI, S-Y., TSAI, H-L., MAU, J-L. Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*. **Food Science and Technology**. 2007, in press.

TSUKADA, C., YOKOYAMA, H., MIYAJI, C., ISHIMOTO, Y., KAWAMURA, H., ABO, T. Immunopotential of intraepithelial lymphocytes in the intestine by oral administrations of β - glucan. **Cellular Immunology**, v.221, p.1-5, 2003.

VAN DER MEER, R., BOVEE-OUDEHOFEN, I.M.J. Dietary modulation of intestinal bacterial infections. **International of Dairy Journal**, v.8, p.481-486, 1998.

WASSER, S. P., WEIS, A. L. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. **Critical Reviews in Immunology**, v.19, p.65-96, 1999.

WELLS, C. L. Relationship between intestinal microecology and the translocation of intestinal bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.58, p.87-93, 1990.

WIEST, R., RATH, H. C. Bacterial translocation in the gut. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v.17, p.397-425, 2003.

WIJBURG, O. L. C., UREN, T. K., SIMPFENDORFER, K., JOHANSEN, F-E., BRANDTZAEG, P., STRUGNELL, R. A. Innate secretory antibodies protect against natural *Salmonella typhimurium* infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v.23, p.21-26, 2006.

WOLOCHOW, G., HILDEBRAND, G. J., LAMANNA, C. Translocation of microorganisms across the intestinal wall of the rat: effect of microbial size and concentration. **Journal of Infectious Diseases**, v. 116, p. 523-528, 1966.

WOOF, J. M., KERR, M. A. IgA function - variations on a theme - Comment. **Immunology**, v.113, p.175-177, 2004.

WOOF, J. M., MESTECKY. Mucosal immunoglobulins. **Immunological Reviews**, v.206, p.64-82, 2005.

YUN, C-H., ESTRADA, A., KESSEL, A. V., PARK, B-C., LAARVELD, B. β -glucan, extracted from oat, enhances disease resistance against bacterial and parasitic infections. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.35, p.67-75, 2003.

ZULUAGA, A. F., SALAZAR, B. E., RODRIGUEZ, C. A., ZAPATA, M. A., VESGA, O. Neutropenia induced in outbred mice by a simplified low-dose cyclophosphamide regimen: characterization and applicability to diverse experimental models of infectious diseases. **BMC Infectious Diseases**, v.6, p.1-10, 2006.

CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *Agaricus blazei* EM CAMUNDONGOS IMUNODEPRIMIDOS

1 INTRODUÇÃO

Os cogumelos têm sido estudados com finalidades nutricionais e também medicinais e muitas substâncias antitumorais e imunomoduladoras foram identificadas, constituindo-se, em especial, de polissacarídeos (ZHANG et al., 2007). Com fins medicinais, eles têm sido consumidos com objetivo de prevenir câncer e doenças cardíacas, melhorar a circulação sanguínea e reduzir o colesterol (WASSER e WEIS, 1999). Além disso, alguns cogumelos são usados para combater o estresse físico e emocional, para estimular a imunidade, melhorar a qualidade de vida de diabéticos e para combater doenças como osteoporose, úlcera gástrica e hepatite crônica (MENOLI et al., 2001; GUTERREZ et al., 2004; ANGELI et al., 2006; CHOI, et al., 2006; GRIND et al., 2006).

O basidiomiceto *Agaricus blazei* Murrill é um cogumelo comestível, nativo do sudeste do Brasil, popularmente conhecido como “cogumelo do sol”, que é produzido e consumido em grande escala como alimento e,

principalmente, como chá (MIZUNO, 1995; MENOLI et al., 2001; DELMANTO et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002; BARBISAN et al., 2002; BELLINI et al., 2003; RODRIGUES et al., 2003; GUTERREZ et al., 2004). Desde 1965 esta estirpe é exportada do Brasil para o Japão, onde é popularmente conhecida como “Himematsutake” ou “Kawariharatake”, sendo hoje amplamente cultivada e estudada nesse país (MENOLI et al., 2001).

Embora *A. blazei* seja usado popularmente para combater várias doenças, incluindo o câncer, a sua composição química ainda não foi completamente estabelecida. Kawagish et al. (1989) encontraram que, dentre as frações obtidas do corpo de frutificação de *A. blazei*, a mais ativa contra sarcoma 180 em camundongos foi a FIII-2-b, um complexo de carboidratos (50,2%), (1→6)-β-D-glucano, ligado a proteínas (43,3%). Este foi o primeiro trabalho que associou a atividade antitumoral com um glucano contendo somente resíduos β-(1→6) ligados. Mizuno et al. (1998) observaram aumento nas subpopulações de células T após a administração oral de α-1,6-glucano e α-1,4-glucano, polissacarídeos isolados de *A. blazei*, em camundongos. Sorimachi et al. (2001) reportaram que componentes das frações de *A. blazei*, obtidas por extrações com diferentes concentrações de etanol, possuíam a capacidade de ativar macrófagos *in vitro* e aumentar a expressão de mRNA de IL-8 e TNF-α. Essas observações os levaram a concluir que o fato de certos pacientes com câncer, aparentemente, recuperar da doença após tomarem extratos de *Agaricus*, pode ser devido à ativação do sistema imune ao invés do efeito direto destes nas células neoplásicas. O aumento na expressão de mRNA de IL-6 e mRNA de IL-1β foi observado nos macrófagos isolados da cavidade peritoneal e nas células do baço dos camundongos que receberam injeção intraperitoneal do extrato de *A. blazei* (25 mg/kg) (NAKAJIMA et al., 2002). Esses autores sugeriram que o aumento detectado na produção de anticorpos pode ter sido induzido pela produção de IL-1β e IL-6 a partir de células T ativadas e macrófagos, o que resultou em diferenciação das células B. Portanto, de acordo com esses últimos autores, o extrato de *A. blazei* Murrill pode conter substâncias importantes para aumento do mecanismo de defesa imune e prevenção de várias doenças. Bernardshaw et al. (2005) também observaram um aumento nos níveis de citocinas MIP-2 e TNF-α no soro de camundongos que

receberam o extrato de *A. blazei*, o que acarretou uma proteção contra infecção sistêmica por *Streptococcus pneumoniae*, devido ao envolvimento do sistema imune inato. Nesse último trabalho, pioneiro sobre os efeitos antiinfeciosos do *A. blazei in vivo*, os autores sugeriram que o extrato desse cogumelo pode ser útil como tratamento profilático e terapêutico contra infecções bacterianas e possivelmente outras infecções, em humanos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos e Patógenos Alimentares, do Departamento de Microbiologia, e no Biotério Central, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Viçosa-MG.

2.1 Camundongos

Foram utilizados camundongos albinos suíços, machos, com seis a sete semanas de vida, pesando, em média, 29 g. Todos os animais foram obtidos das matrizes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa e foram mantidos sob temperatura e umidade constantes, com um ciclo de 12 horas escuro/ luz, com acesso livre à dieta padrão para roedores (Purina, Brasil) e água *ad libitum*, exceto para os grupos que receberam o extrato aquoso de *A. blazei ad libitum*. Todos os procedimentos envolvendo camundongos foram conduzidos de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA - Brasil).

2.2 Extrato do *A. blazei*

Amostras de *A. blazei* desidratadas foram adquiridas da Associação dos Produtores de Cogumelo do Norte de Minas e Vale do Jequitinhonha (APROCONOVA, Montes Claros, MG, Brasil).

Os extratos aquosos foram preparados segundo modificações nas metodologias descritas por Delmanto et al. (2001) e Barbisan et al. (2002). Os cogumelos desidratados foram triturados até obter-se um pó. O extrato foi preparado acrescentando-se 2,5 g do pó em 100 mL de água destilada (2,5 % p/p), mantendo-o por 2 h em temperatura ambiente. O extrato foi filtrado em papel de filtro. A solução, referida como extrato aquoso de *A. blazei*, foi preparada diariamente antes da administração aos animais. Essa solução é considerada a forma popular de uso para efeitos benéficos na saúde (BARBISAN et al., 2002). Para os grupos experimentais nos quais se oferecia o extrato *ad libitum* aos animais, os recipientes contendo o extrato aquoso foram revestidos com papel alumínio para prevenir decomposição pela luz (BARBISAN et al., 2001). Nos demais grupos, os camundongos receberam 0,6 mL de extrato dia⁻¹ animal⁻¹, por gavagem intragástrica (DELMANTO et al., 2001).

2.3 Administração da ciclofosfamida

A ciclofosfamida (Genuxal[®], ASTA MÉDICA AG, Frankfurt, Alemanha) foi diluída em solução salina 0,85 % estéril, conforme instruções do fabricante, e a dosagem foi calculada como miligrama de ciclofosfamida por quilo de peso corporal dos camundongos de cada grupo. A via de administração foi intraperitoneal, nos dias 15, 17, 19 e 21 do experimento.

2.4 Determinação da dose imunodepressora de ciclofosfamida

As amostras de sangue dos camundongos foram coletadas por punção cardíaca, em tubos heparinizados (Vacutainer® System, Becton, Dickinson e Company, EUA), 24 h após a quarta administração das doses de 100 mg kg⁻¹, 200 mg kg⁻¹ e 300 mg kg⁻¹ de ciclofosfamida, por via intraperitoneal. Os animais do grupo controle receberam injeção intraperitoneal de solução salina 0,85 %. A contagem de leucócitos foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas de Viçosa (Viçosa - MG), em microscópio (ABX Micro 60), utilizando-se o corante Panótico rápido (Laborclin, Paraná, Brasil).

2.5 Grupos de estudo e tratamentos

Os animais foram separados aleatoriamente em oito grupos, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Grupos de estudo e tratamentos experimentais.

GRUPOS DE ESTUDO	TRATAMENTOS
1	Água <i>ad libitum</i> e injeção intraperitoneal (IP) de solução salina 0,85 %
2	Água <i>ad libitum</i> e injeção IP de ciclofosfamida (200 mg Kg ⁻¹)
3	Extrato aquoso de <i>A. blazei ad libitum</i> e injeção IP de solução salina 0,85 %
4	Extrato aquoso de <i>A. blazei ad libitum</i> e injeção IP de ciclofosfamida (200 mg Kg ⁻¹)
5	Água por gavagem intragástrica (0,6 mL dia ⁻¹) e injeção IP de solução salina 0,85 %
6	Água por gavagem intragástrica (0,6 mL dia ⁻¹) e injeção IP de ciclofosfamida (200 mg Kg ⁻¹)
7	Extrato aquoso de <i>A. blazei</i> por gavagem intragástrica (0,6 mL dia ⁻¹) e injeção IP de solução salina 0,85 %
8	Extrato aquoso de <i>A. blazei</i> por gavagem intragástrica (0,6 mL dia ⁻¹) e injeção IP de ciclofosfamida (200 mg Kg ⁻¹)

Todos os animais foram pesados no início do experimento e uma vez a cada semana até o término do período experimental.

2.6 Eutanásia

Os animais foram anestesiados com éter e eutanasiados para coleta dos órgãos e do sangue, no 24^o dia do período experimental.

2.7 Análise de translocação bacteriana

No 24^o dia de experimento, os animais foram eutanasiados e o fígado, o baço e os linfonodos mesentéricos foram removidos assepticamente, pesados e homogeneizados em tubos de vidro com solução salina 0,85 % e, quando necessário, foram feitas diluições seriadas. O plaqueamento foi realizado em ágar MacConkey (Merck, Alemanha) para detecção de enterobactérias Gram-negativas, seguido de incubação a 37° C, por 48 h.

2.8 Índice esplênico

Os baços dos animais eutanasiados foram pesados e os resultados foram expressos como peso do órgão (mg) por unidade de peso corporal (g) (LEE et al., 2003).

2.9 Determinação de IgA secretora (IgAs) no conteúdo do intestino delgado

A IgAs total do intestino delgado dos camundongos foi determinada por ELISA, de acordo com Rodrigues et al. (2000). Os camundongos foram

eutanasiados, o intestino delgado foi removido, os conteúdos foram retirados, pesados e diluídos em tampão salina fosfato (PBS) na proporção de 500 mg de conteúdo intestinal para 2,0 mL de PBS. Após centrifugação a 2000 g, por 30 min, o fluido sobrenadante foi coletado e mantido a -70 °C até o uso. As amostras dos fluidos intestinais foram diluídas 1:10 em PBS e diluições seriadas foram adicionadas em triplicata aos poços de placas de ELISA. A IgAs total do fluido intestinal foi determinada usando IgA de cabra anti-IgA de camundongo (A90-103A, Bethyl Laboratories, Montgomery, EUA) e IgA de cabra anti-camundongo conjugada com peroxidase (A90-103P, Bethyl Laboratories, Montgomery, EUA). O desenvolvimento de cor se deu com o uso de o-fenileno-diamino (1,2-benzenodiamino) (Fast[®] OPD, Sigma, Saint Louis, Missouri) e a medida da absorbância foi realizada a 420 nm em leitor de ELISA (Thermoplater - TP reader). A concentração de IgAs total foi determinada por meio de uma curva-padrão, utilizando-se uma IgA padrão purificada de camundongo (106-01, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, EUA).

2.10 Determinação de citocinas (TNF- α , IFN- γ e IL-10) no soro

As concentrações de TNF- α , IFN- γ e IL-10 no soro dos animais foram determinadas por ELISA de captura. As amostras de sangue dos animais foram coletadas por punção cardíaca e submetidas à centrifugação, a 1000 g, por 10 min. O soro obtido do sobrenadante foi congelado a -70 °C até as análises. As citocinas foram determinadas usando *kits* comerciais e seguindo o protocolo do fabricante (DuoSet, R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA).

2.11 Análises histopatológicas do intestino delgado, baço e fígado

Os fragmentos dos órgãos dos animais, ao final do experimento, foram fixados em solução fixadora Karnovsky e processados por inclusão

em parafina. Seções histológicas de 5 µm foram obtidas em micrótomo, codificadas e examinadas ao microscópio de luz, por um único indivíduo que não teve acesso aos códigos, no laboratório de Histopatologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB - UFMG, Belo Horizonte, MG).

2.12 Análises estatísticas

Os dados foram analisados por meio de análises de variância e regressão. Para o fator qualitativo, as médias foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey, adotando-se o nível de 5 % de probabilidade. Para o fator quantitativo (tempo), os modelos foram escolhidos com base na significância dos coeficientes de regressão, utilizando-se o teste t, adotando-se o nível de até 10 % de probabilidade, no coeficiente de determinação e no fenômeno biológico. Para se proceder às análises estatísticas, foi utilizado o *software* SAEG (Sistema para Análises Estatísticas), versão 8.0 (UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA, 1999). Para análise dos resultados de IgAs no conteúdo intestinal e de citocinas no soro, foi utilizado o *software* Genes (CRUZ, 2006).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não ocorreram variações significativas no peso dos animais submetidos aos diferentes tratamentos, nem ao longo do tempo nem entre os tratamentos, independente da via de administração usada (Figura 1). No entanto, na última semana de avaliação, observou-se redução similar no peso dos animais dos grupos submetidos ao tratamento imunodepressor (grupos 2, 4, 6 e 8), independente da administração ou não do extrato aquoso de *A. blazei ad libitum* ou por gavagem intragástrica. A perda de peso dos animais imunodeprimidos, verificada no 21^o dia do experimento, é um efeito reconhecido da imunodepressão relatada por outros autores. Péret Filho et al. (1998) verificaram que camundongos imunodeprimidos com quatro doses de 100 mg Kg⁻¹ de ciclofosfamida, em dias alternados, perderam peso ao final do período experimental, independente da dose do probiótico *Saccharomyces boulardii*. Hou et al. (2007) observaram que ratos imunodeprimidos com doses diárias de 10 mg Kg⁻¹ de ciclofosfamida também perderam peso ao final de 30 dias de experimento, o que foi um sinal de toxicidade geral da droga, apesar dos animais não terem apresentado sinais de estresse, desnutrição ou mortalidade.

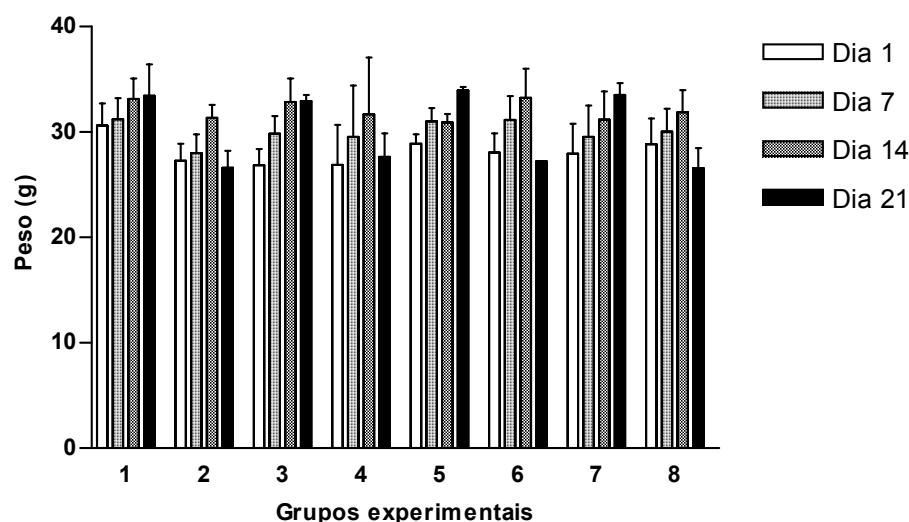


Figura 1 - Variações de peso dos animais submetidos aos tratamentos experimentais durante 21 dias. Os grupos experimentais estão descritos na metodologia. Os dados são médias \pm desvio padrão.

A perda de peso observada nos animais imunodeprimidos neste trabalho também está associada com os valores de índice esplênico (SI) obtidos, o que reforça a constatação do caráter imunossupressor da droga utilizada.

O valor do SI não aumentou nos animais tratados com o extrato aquoso de *A. blazei ad libitum* (grupo 3), quando comparado com os animais do grupo controle (grupo 1), constituídos pelos animais não-imunodeprimidos (Figura 2). Por outro lado, houve um decréscimo significativo ($P < 0,05$) no SI dos animais imunodeprimidos (grupos 2, 4, 6 e 8), independente da administração do extrato aquoso de *A. blazei* e da via de administração usada, em relação aos animais não-imunodeprimidos. Esses resultados estão de acordo com aqueles previamente reportados na literatura. Anton (1993) observou um decréscimo nos valores de SI em camundongos, das estirpes C57BL/6 e DBA/2, um dia após a administração de uma dose de 300 mg kg^{-1} de ciclofosfamida. Chen et al. (2007) também verificaram que a administração de uma dose de 150 mg Kg^{-1} de ciclofosfamida reduziu, significativamente, o SI em camundongos, em relação aos animais do grupo controle não-imunodeprimidos. A redução nos valores de SI foi relacionada com a

redução do número de esplenócitos e não apenas com o resultado da perda de volume fluido ou tecido conectivo desse órgão (HILBURGER et al., 1997).

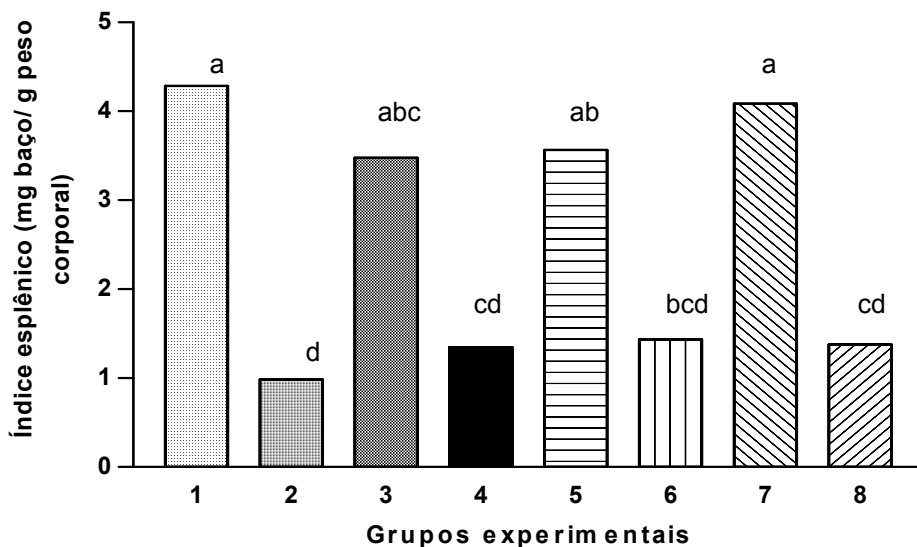


Figura 2 - Índice esplênico dos animais. Os grupos experimentais estão descritos na metodologia. Os dados são médias \pm desvio padrão. Nas barras que apresentam pelo menos uma mesma letra, os tratamentos não diferem entre si, em 5% de probabilidade, pelo Teste Tukey.

Os animais que receberam ciclofosfamida apresentaram número de leucócitos totais entre 450 a 100 mm^{-3} . Esses valores representam entre 2 % e 10 % da faixa normal de leucócitos para camundongos, que é por volta de 1.000 a 5.000 células mm^{-3} (ZULUAGA et al., 2006). Apesar de os animais apresentarem um quadro clínico leucopênico compatível com a imunodepressão, 24 h após a 4ª dose de 200 mg kg^{-1} (Figura 3), não foi detectada translocação de bactérias Gram-negativas autóctones para os MLNs, fígado e baço dos animais, em quaisquer dos grupos avaliados, pela análise microbiológica em ágar MacConkey. Estes resultados não corroboram aqueles encontrados por Berg (1983). Esse autor observou que uma única injeção intraperitoneal de ciclofosfamida, em diferentes doses (100 a 400 mg kg^{-1}), promoveu a translocação de bactérias autóctones da microbiota para os MLNs, o baço e o fígado de camundongos livres de

patógenos específicos (SPF), após uma semana da administração. Berg (1983) ressaltou, contudo, que não existia uma relação direta entre as propriedades imunossupressoras das diferentes drogas usadas em seu estudo, dentre elas a ciclofosfamida, e a capacidade das mesmas em promover a translocação bacteriana. As drogas poderiam ter acarretado manifestações tóxicas no trato intestinal que permitiram a translocação de bactérias autóctones através de lesões na mucosa, segundo esse autor. Porém, mesmo com a imunodepressão constatada nos animais deste estudo, não foram observadas alterações histopatológicas nos fragmentos de íleo coletados. Com base nesses últimos resultados e na inferência de Berg (1983), pode se supor que a ausência de translocação nesta pesquisa poderia ser parcialmente explicada pela ausência de alterações histopatológicas no íleo desses animais, tais como úlceras ou alterações da arquitetura. Outro fato relevante que deve ser apontado é que a metodologia utilizada neste experimento foi diferente daquela usada por Berg (1983). Este autor realizou uma etapa de pré-enriquecimento dos órgãos coletados em caldo BHI (Infusão de cérebro e coração), a 37 °C, por 48 h, antes do plaqueamento em três meios de cultura, todos diferentes do usado nesta pesquisa.

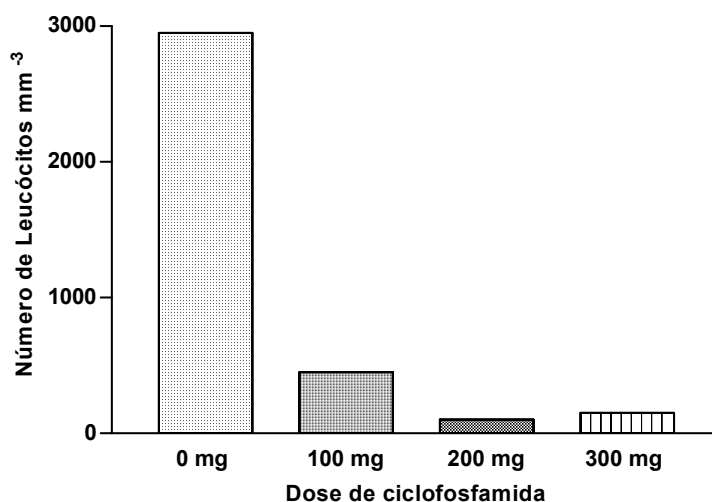


Figura 3 - Número de leucócitos totais mm³ em amostras de sangue de camundongos imunodeprimidos com diferentes doses de ciclofosfamida. Os dados são valores médios.

Suzuky et al. (1996), por sua vez, verificaram a inibição da translocação de *Escherichia coli* C25 para os MLNs de animais SPF, descontaminados com antibióticos, e animais *germ-free* (GF), que receberam diferentes doses de ciclofosfamida, em diferentes esquemas de imunodepressão. Esses autores constataram a redução do número de células linfóides, especialmente células B, nas Placas de Peyer, MLNs e baço dos animais e sugeriram que a inibição da translocação bacteriana pode ter sido o resultado de mudanças morfológicas e fisiológicas nas células M, independente de mudanças na função imunológica dos animais. Neste estudo, não foram avaliadas as Placas de Peyer, contudo, a hipótese levantada por Suzuky et al. (1996) também pode ser umas das supostas explicações para os resultados encontrados.

A administração do extrato aquoso de *A. blazei ad libitum* e por gavagem intragástrica aumentou significativamente ($P < 0,05$) a secreção de IgAs no intestino delgado dos animais não-imunodeprimidos (grupos 3 e 7) somente em comparação com o grupo imunodeprimido tratado com água *ad libitum* (grupo 2). Contudo, o extrato aquoso de *A. blazei* não exerceu uma estimulação na produção de IgAs na mucosa intestinal dos animais, pois a concentração desse anticorpo no conteúdo intestinal dos animais imunodeprimidos (grupos 4, 6 e 8) foi a mesma encontrada nos animais tratados apenas com água (grupos 1 e 5) (Figura 4). Estes resultados demonstram não ter ocorrido uma proteção local da mucosa dos camundongos, pois a IgA é a classe de anticorpo predominante em muitas secreções externas e tem muitas funções, diretas e indiretas, que servem para prevenir agentes infecciosos, tais como bactérias e vírus, de romper a barreira mucosa (FAGARASAN e HONJO, 2002; WOOF e MESTECKY, 2005). Além da proteção contra agentes infecciosos, grande parte da IgA secretada na mucosa intestinal, diariamente, é dirigida contra a microbiota comensal, em uma via independente do auxílio de linfócitos T, sendo também considerada parte do sistema imune inato (MacPHERSON et al., 2000). De acordo com Bollinger et al. (2003) e Everett et al. (2004), a IgA secretora (IgAs) é um dos principais fatores que previnem a translocação bacteriana. Alverdy e Ayos (1991) verificaram aumento na incidência de translocação bacteriana para os MLNs de ratos que tiveram uma redução na

secreção de IgAs causada pela administração de corticóide. O aumento na secreção de IgA também foi relacionado com o aumento da imunidade local em estudos de utilização de probióticos em modelos animais (RODRIGUES et al., 2000; LIMA-FILHO et al., 2004).

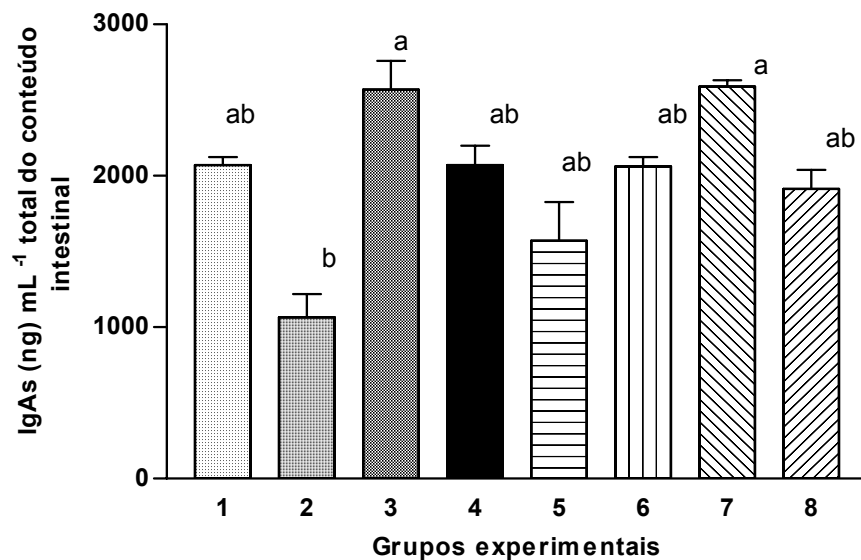


Figura 4 - Concentrações de IgAs totais no conteúdo do intestino delgado dos camundongos. Os grupos experimentais estão descritos na metodologia. Os dados são médias \pm desvio padrão. Os resultados foram expressos como médias da concentração de IgAs (ng) mL⁻¹ do conteúdo intestinal. As barras verticais representam o desvio padrão da média. Nas barras que apresentam pelo menos uma mesma letra, os tratamentos não diferem entre si, em 5% de probabilidade, pelo Teste Tukey.

Não foram detectadas variações significativas ($P < 0,05$) na secreção das citocinas séricas TNF- α , IFN- γ e IL-10 nos animais experimentais (Figura 5). Ellertsen et al. (2006) reportaram que o extrato aquoso de *A. blazeyi* comercial teve efeitos drásticos na expressão gênica em linhagens de células de monócitos humanos. Esses autores observaram que, após 24 h de exposição dos monócitos ao extrato aquoso de *A. blazeyi*, ocorreu uma indução da resposta T_H1, como indicado pelo aumento na expressão de IL-8, IL-1 β , IL-12 β e TNF- α .

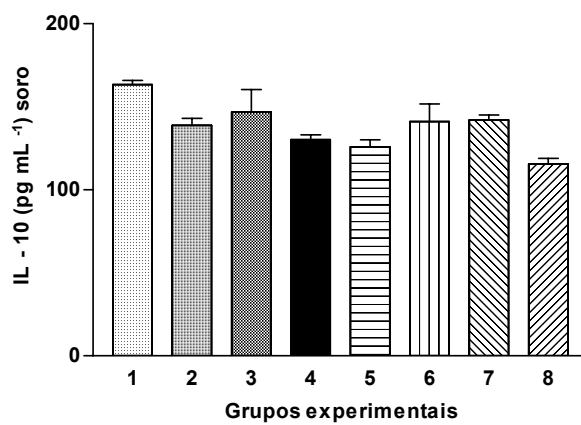
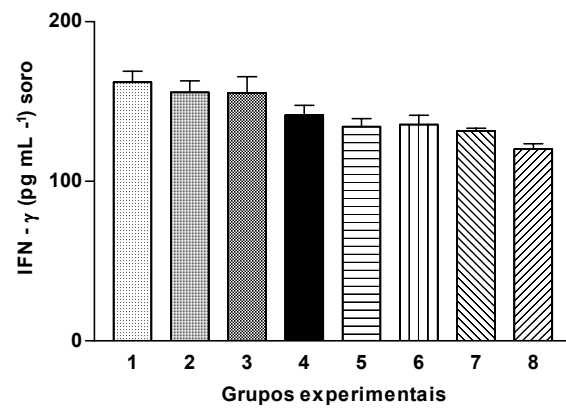
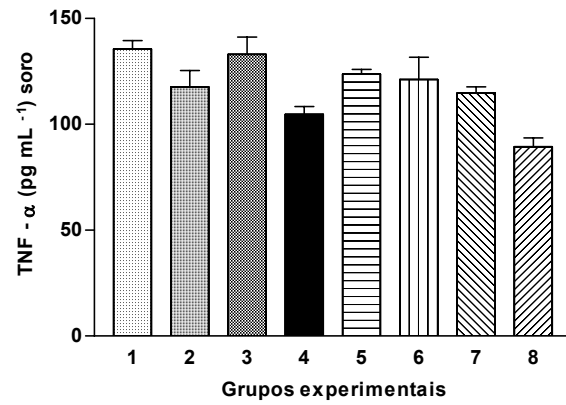


Figura 5 - Concentrações de TNF- α , IFN- γ e IL-10 do soro de camundongos. Os grupos experimentais estão descritos na metodologia. Os resultados foram expressos como médias das concentrações de citocinas (pg mL⁻¹) do soro.

Além disso, nenhuma citocina típica de resposta T_H2 foi expressa. No entanto, os resultados apresentados não confirmam o aumento, *in vivo*, na secreção de citocinas T_H1, como verificado pela dosagem sérica de TNF- α e IFN- γ , nem da citocina reguladora IL-10. Ressalta-se, contudo, que a coleta de sangue dos animais foi feita em apenas um momento do período experimental e pode não ter evidenciado as supostas alterações no padrão de secreção das citocinas. Além disso, os estudos de expressão das citocinas são mais sensíveis e específicos que os de secreção (NAKAJIMA et al., 2003). Outro fator que interfere nos resultados são as variações na forma de extração do *A. blazei* usadas nos experimentos, o que dificulta a comparação de resultados. Por outro lado, Grind et al. (2006) também não observaram efeitos sistêmicos do extrato aquoso de *A. blazei*, administrado oralmente, em pacientes portadores do vírus da hepatite C. Segundo esses últimos autores, possivelmente, isso ocorreu pelo fato do β -glucano, o suposto agente responsável pelos efeitos na secreção de citocinas *in vitro*, não ter sido absorvido pelo intestino dos pacientes.

Não foram detectadas diferenças nas análises histopatológicas entre os grupos de animais tratados com extrato aquoso de *A. blazei ad libitum* ou por gavagem intragástrica, e também nos animais controles que receberam apenas água *ad libitum* ou por gavagem intragástrica. A administração de ciclofosfamida não alterou a histologia do íleo e fígado em comparação com os controles não-imunodeprimidos.

A redução constatada no índice esplênico foi reforçada pela análise histopatológica do baço dos animais imunodeprimidos quando verificou-se uma redução nos folículos linfóides e uma depleção linfocitária, que não foi atenuada pela administração do extrato aquoso de *A. blazei* (Figura 6). Pelo fato do baço ser um órgão linfóide, que produz linfócitos e anticorpos como funções relacionadas ao sistema imunológico (ROSS et al., 1993), as alterações observadas pela análise histopatológica são compatíveis com o quadro de imunodepressão ocasionado pela ciclofosfamida.

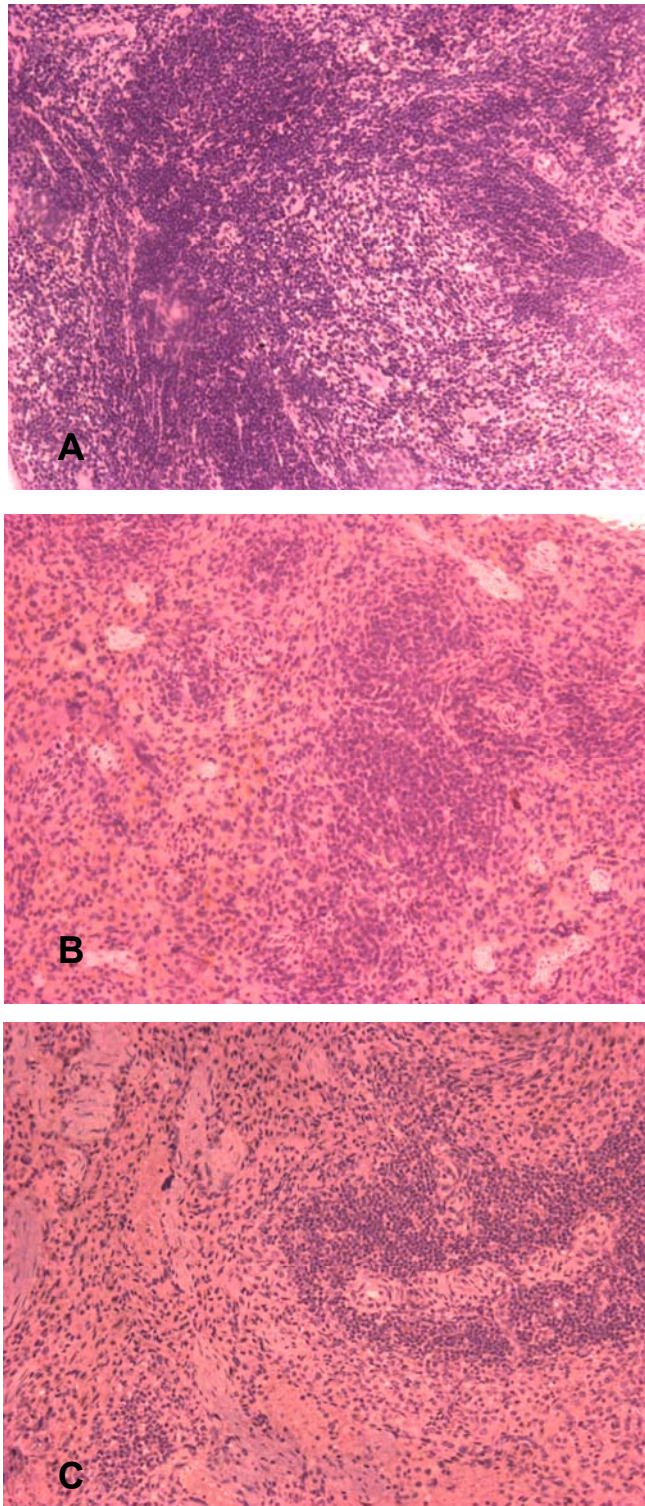


Figura 6 - Aspectos histopatológicos do parênquima esplênico (100 X) dos animais experimentais. **A**, animais não-imunodeprimidos (G1); **B**, animais imunodeprimidos (G2) e **C**, animais imunodeprimidos tratados com o extrato aquoso de *A. blazei* (G4). Hematoxilina-eosina.

Neste trabalho, não foram observados efeitos do extrato de *A. blazei* nos parâmetros avaliados, como índice esplênico, alterações histopatológicas, secreção de IgA e de citocinas no modelo animal estudado. A literatura, por sua vez, descreve efeitos *in vivo* e *in vitro* dos extratos de *A. blazei* em tumores (KAWAGISHI et al., 1989; TAKAKU et al., 2001; LEE et al., 2003), em parâmetros do sistema imunológico (MIZUNO et al., 1998, SORIMACHI et al., 2000, NAKAJIMA et al., 2002, KASAI et al., 2004, ELLERTSEN et al., 2006) e em mutações induzidas (DELMANTO et al., 2001; MENOLI et al., 2001; GUTERREZ et al., 2004). A ausência de efeitos também é relatada em outros trabalhos, como nos de Luiz et al. (2003) e Guterrez et al. (2004), nos quais não foi observada atividade antimutagênica do extrato aquoso de *A. blazei*, *in vitro*, e no de Grind et al. (2006), no qual o extrato aquoso não foi recomendado para o tratamento de paciente portadores de hepatite C. Além disso, foi reportada forte relação causal entre disfunção hepática severa em pacientes com câncer que faziam uso do extrato aquoso de *A. blazei* (MUKAI et al., 2006). Assim, necessita-se de mais estudos visando estabelecer os supostos efeitos do extrato de *A. blazei* *in vivo*, antes de o mesmo ser usado, indiscriminadamente, como terapia complementar e alternativa, especialmente, tratando-se do caso de indicações a pessoas portadoras de enfermidades diagnosticadas pela medicina alopática.

4 CONCLUSÕES

O modelo animal utilizado apresentou-se adequado aos estudos dos fenômenos biológicos propostos. O extrato aquoso de *A. blazei* não imunoestimulou os animais experimentais nem foi verificado aumento na proteção local da mucosa intestinal. As secreções de TNF- α , IFN- γ e IL-10 não foram alteradas, independente do tratamento experimental aplicado aos animais. A dose de ciclofosfamida utilizada foi capaz de imunodeprimir os animais, mas não acarretou a translocação de bactérias Gram-negativas autóctones. O baço dos animais imunodeprimidos apresentou uma redução nos folículos linfóides e uma depleção linfocitária, como resultado dos efeitos imunodepressivos da ciclofosfamida, efeito este que também não foi atenuado pela administração do extrato aquoso de *A. blazei*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVERDY, J., AYOS, E. The effect of glucocorticoid administration on bacterial translocation. **Annals of Surgery**, v.214, n.6, p.719-723, 1991.

ANGELI, J. P. F., RIBEIRO, L. R., GONZAGA, M. L. C., SOARES, S. DE A., RICARDO, M. P. S. N., TSUBOY, M. S., STIDL, R., S., KNASMUELLER, LINHARES, R. E., MANTOVANI, M. S. Protective effects of β -glucan extracted from *Agaricus brasiliensis* against chemically induced DNA damage in humans lymphocytes. **Cell Biology and Toxicology**, v.22, p.285-291, 2006.

ANTON, E. Differential sensitivity of DBA/2 and C57BL/6 mice to cyclophosphamide. **Journal of Applied Toxicology**, v.13, n.6, p. 423-427, 1993.

BARBISAN, L. F., MYAMOTO, M., SCOLASTICI, C., SALVADORI, D. M. F., RIBEIRO, L. R., EIRA, A. F., CAMARGO, J. V. L. Influence of aqueous extract of *Agaricus blazei* on rat liver toxicity induced by different doses of diethylnitrosamine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.83, p.25-32, 2002.

BELLINI, M. F., GIACOMINI, N. L., EIRA, A. F., RIBEIRO, L. R., MANTOVANI, M. S. Anticlastogenic effect of aqueous extracts of *Agaricus blazei* on CHO-k1 cells, studying different developmental phases of mushroom. **Toxicology in Vitro**, v.17, p.465-469, 2003.

BERG, R. D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tracts of mice receiving immunosuppressive chemotherapeutic agents. **Current Microbiology**, v.8, p.285-292, 1983.

BERNARDSHAW, S., JOHNSON, E., HETLAND, G. An extract of the mushroom *Agaricus blazei* Murill administered orally protects against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.62, p.393-398, 2005.

BOLLINGER, R. R., EVERETT, M. L., PALESTRANT, D., LOVE, S. D., LIN, S. S., PARKER, W. Human secretory immunoglobulin A contribute to biofilm formation in the gut. **Immunology**, v.109, p.580-587, 2003.

CHEN, J., HU, T., ZHENG, R. Antioxidant activities of *Sophora subprostrate* polysaccharide in immunosuppressed mice. **International Immunopharmacology**, v.7, p.547-553, 2007.

CHOI, Y. H., YAN, G. H., CHAL, O. H., CHOI, Y. H., ZHANG, X., LIM, J. M., KIM, J-H., LEE, M. S., HAN, E-H, KIM, H. T. Inhibitory Effects of *Agaricus blazei* on Mast Cell-Mediated Anaphylaxis-Like Reactions. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.29, n.7, p.1366-1371, 2006.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: Estatística experimental e matrizes**. Editora UFV. Viçosa, MG. 285p, 2006.

DELMANTO, R. D., DE LIMA, P. L. A., SUGUI, M. M., DA EIRA, A. F., SALVADORI, D. M. F., SPEIT, G., RIBEIRO, L. R. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Mutation Research**, v.496, p.15-21, 2001.

ELLERTSEN, L. K., HETLAND, G., JOHNSON, E., GRINDE, B. Effect of medicinal extract from *Agaricus blazei* Murill on gene expression in human monocyte cell line examined by microarrays and immuno assays. **International Immunopharmacology**, v.6, p.133-143, 2006.

EVERETT, M. L., PALESTRANT, D., MILLER, S. E., BOLLINGER, R. R., PARKER, W. Immune exclusion and immune inclusion: a new model of host-bacterial infections in the gut. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v.4, p.321-332, 2004.

FAGARASAN, S., HONJO, T. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defenses. **Nature Reviews Immunology**, v.3., p.63-72, 2002.

GRIND, B., HETLAND, G., JOHNSON, E. Effects on gene expression and viral load of medicinal extract from *Agaricus blazei* in patients with chronic hepatitis C infection. **International Immunopharmacology**, v.6, p.1311-1314, 2006.

GUTERREZ, Z. R., MANTOVANI, M. S., EIRA, A. F., RIBEIRO, L. R., JORDÃO, B. Q. Variation of the antimutagenicity effects of water extracts of *Agaricus blazei* Murrill in vitro. **Toxicology in Vitro**, v.18, p.301-309, 2004.

HILBURGER, M. E., ADLER, M. W., ROGERS, T. J., EISENSTEIN, T. K. Morphine alters macrophage and lymphocyte populations in the spleen and peritoneal cavity. **Journal of Neuroimmunology**, v.80, p.106-114, 1997.

HOU, F. X., YANG, H. F., YU, T., CHEN, W. The immunosuppressive effects of 10 mg/kg cyclophosphamide in Wistar rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 2007, in press.

KASAI, H., HE, L. M., KAWAMURA, M., YANG, P. T., DENG, X. W., MUNKANTA, M., YAMASHITA, A., TERUNUMA, H., HIRAMA, M., HORIUCHI, I., NATORI, T., KOGA, T., AMANO, Y., YAMAGUCHI, N. IL-12 production induced by *Agaricus blazei* fraction H (ABH) involves Toll-like receptor (TLR). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, n.3, p.259-267, 2004.

KAWAGISHI, H., INAGAKI, R., KANAO, T., MIZUNO, T. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. **Carbohydrate Research**, v.186, p.267-273, 1989.

LEE, Y-L., KIM, H-J., LEE, M-S., KIM, J-M., HAN, J-S., HONG, E-K., KWON, M-S., LEE, M-J. Oral administration of *Agaricus blazei* (H1 strain) inhibited tumor growth in a sarcoma 180 inoculation model. **Experimental Animals**, v.52, n.5, p.371-375, 2003.

LIMA-FILHO, J. V. M.; VIEIRA, L. Q.; ARANTES, R. M. E.; NICOLI, J. R. Effect of the *Escherichia coli* EMO strain on experimental infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in gnotobiotic mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p.1005-1013, 2004.

LUIZ, R. C., JORDÃO, B. Q., EIRA, A. F., RIBEIRO, L. R., MANTOVANI, M. S. Non-mutagenic or genotoxic effects of medicinal aqueous extracts from the *Agaricus blazei* mushroom in V79 cells. **Cytologia**, v.68, p.1-6, 2003.

MacPHERSON, A., GATTO, D., SAINSBURY, E., HARRIMAN, G. R., HENGARTNER, H., ZINKERNAGEL, R. M. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. **Science**, v.288, n.23, p.2222-2226, 2000.

MENOLI, R. C. R. N., MANTOVANI, M. S., RIBEIRO, L. R., SPEIT, G., JORDÃO, B. Q. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murril extracts on V79 cells. **Mutation Research**, v.496, p.5-13, 2001.

MIZUNO, M., MORIMOTO, M., MINATO, K-I., TSUCHIDA, H. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets. **Biosciences Biotechnology and Biochemistry**, v.62, p.434-437, 1998.

MIZUNO, T. Kawariharatake, *Agaricus blazei* Murrill: medicinal and dietary effects. **Food Reviews International**, v.11, p.167-172, 1995.

MUKAI, H., WATANABE, T., ANDO, M., KATSUMATA, N. An alternative medicine, *Agaricus blazei*, may have induced severe hepatic dysfunction in cancer patients. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 36, n.12, p.808-810, 2006.

NAKAJIMA, A., ISHIDA, T., KOGA, M., TAKEUCHI, T., MAZDA, O., TAKEUCHI, M. Effect of water extract from *Agaricus blazei* Murrill on antibody-producing cells in mice. **International Immunopharmacology**, v.2, p.1205-1211, 2002.

OLIVEIRA, J. M., JORDÃO, B. Q., RIBEIRO, L.R., EIRA, A. F., MANTOVANI, M. S. Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murrill lineage 99/26) in mammalian cells in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, v.40, p.1775-1780, 2002.

PÉRET FILHO, L. A., PENNA, F. J., BAMBIRRA, E. A., NICOLI, J. R. Dose effect of oral *Saccharomyces boulardii* treatments on morbidity and mortality in immunosuppressed mice. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, p.11-116, 1998.

RODRIGUES, A. C. P., CARA, D. C., FRETEZ, S. H. G. G., CUNHA, F. Q., VIEIRA, E. C., NICOLI, J. R., VIEIRA, L. Q. *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, p.404-414, 2000.

RODRIGUES, S. B., SOARES, I. A., MARQUES-SILVA, G. G., ROCHA, C. L. M. S. C. Avaliação do potencial antimutagênico do cogumelo do sol (*Agaricus blazei*) no sistema *methG1* em *Aspergillus (=Emericella) nidulans*. **Acta Scientiarum. Agronomy**. V.25, n.2, p.513-517, 2003.

ROSS, M. H., REITH, E. J., ROMRELL, L. J. **Histologia: texto e atlas**. Tradução por Gerson Cotta-Pereira. 2ed. São Paulo: Panamericana, 1993, 799p.

SORIMACHI, K.; AKIMOTO, K.; IKEHARA, Y.; INAFUKU, K.; OKUBO, A.; YAMAZAKI, S. Secretion of TNF- α , IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei* Murrill fraction *in vitro*. **Cell Structure and Function**, v.26, p.103-108, 2001.

SUZUKI, T., ITOH, K., HAGIWARA, T., NAKAYAMA, H., HONJYO, K., HIROTA, Y., KANEKO, T., SUZUKI, H. Inhibition of bacterial translocation from the gastrointestinal tract of mice injected with cyclophosphamide. **Current Microbiology**, v.33, p.78-83, 1996.

TAKAKU, T., KIMURA, Y., OKUDA, H. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murrill and its mechanism of action. **Journal of Nutrition**, v.131, p.1409-1413, 2001.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. **Sistema de análises estatísticas - SAEG**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. Manual do usuário (versão 8.0), 138 p, 1999.

WASSER, S. P., WEIS, A. L. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. **Critical Reviews in Immunology**, v.19, p.65-96, 1999.

WOOF, J. M., MESTECKY. Mucosal immunoglobulins. **Immunological Reviews**, v.206, p.64-82, 2005.

ZHANG, M., CUI, S. W., CHEUNG, P. C. K., WANG, Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, p.4-19, 2007.

ZULUAGA, A. F., SALAZAR, B. E., RODRIGUEZ, C. A., ZAPATA, M. A., VESGA, O. Neutropenia induced in outbred mice by a simplified low-dose cyclophosphamide regimen: characterization and applicability to diverse experimental models of infectious diseases. **BMC Infectious Diseases**, v.6, p.1-10, 2006.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *Agaricus blazei* EM CAMUNDONGOS DESAFIADOS COM *Salmonella* TYPHIMURIUM

1 INTRODUÇÃO

Entre os microrganismos, *Salmonella* se destaca como uma das principais causas de infecções gastrintestinais em humanos (HAPFEILMEIR e HARDT, 2005; KALUPAHANA et al., 2005; LEE et al., 2006; SASHINAMI et al., 2006). Em camundongos, *S. enterica* sorotipo Typhimurium causa infecção sistêmica semelhante à patogênese da febre tifóide em humanos (KALUPAHANA et al., 2005; SASHINAMI et al., 2006, STEFANOVA et al., 2007). Essa bactéria resiste ao pH baixo do estômago, penetra na barreira intestinal, via células M, coloniza as placas de Peyer (STEFANOVA et al., 2007) e, subseqüentemente, vai para os linfonodos de drenagem e pode se disseminar, via circulação sangüínea para o baço e fígado e, neste último, pode ser encontrada dentro de hepatócitos e células fagocíticas (RICHTER-DAHLFORS et al., 1997). A virulência da *Salmonella* é dada por diversos agrupamentos de genes de virulência, chamados ilhas de patogenicidade, SPI-1 e SPI-2, que são importantes para a adesão à mucosa, invasão das

células epiteliais e estimulação da secreção de fluidos, que causa os sintomas diarreicos (SASHINAMI et al., 2006). Após exposição à bactéria, diversas respostas são direcionadas do hospedeiro contra a infecção bacteriana e uma delas é a produção de citocinas inflamatórias como interferon gamma (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alpha (TNF- α). (SASHINAMI et al., 2006). Os mecanismos de defesa do hospedeiro contra *Salmonella* são complexos e envolvem a imunidade inata e adaptativa (STEFANOVA et al., 2007)

O uso de antibióticos é a principal estratégia para a erradicação de *Salmonella* e os agentes antimicrobianos são usados rotineiramente como terapêuticos e profiláticos em salmoneloses humana e animal (LEE et al., 2006). Com o aumento da resistência a essas drogas, novas alternativas têm sido pesquisadas contra essa doença, tais como o uso de probióticos (RODRIGUES et al., 1996; LIMA-FILHO et al., 2004; SILVA et al., 2004) e plantas medicinais (LEE et al., 2006; STEFANOVA et al., 2007). Substâncias imunomoduladoras, como modificadores da resposta biológica (BRMs), também têm o potencial para serem usados na terapia de doenças infecciosas (OHNO et al., 2001).

A modulação da secreção de citocinas pode se constituir em um procedimento para tratamento de diversas doenças e uma forma estratégica potencial para essa modulação pode ser por meio da utilização de plantas medicinais. Segundo Spelman et al. (2006), os imunomoduladores fitoterápicos podem ser definidos como produtos originários de plantas que alteram a atividade do sistema imune por meio da regulação dinâmica de moléculas informacionais, como citocinas, hormônios, neurotransmissores e outros peptídeos. Os fungos são comumente usados com essa função na fitoterapia, apesar de não serem plantas.

Os BMRs são substâncias que aumentam a resposta imune e podem ser produzidos endogenamente no corpo por células imunes, ou podem ser derivados de bactérias, fungos, algas e plantas (LEUNG et al., 2006). Entre os BMRs exógenos, os polissacarídeos possuem a maior ocorrência na natureza e, entre os principais BMRs derivados de fungos, estão o β -glucano e α -mananas (LEUNG et al., 2006).

Segundo Zhang et al. (2007), os cogumelos têm sido avaliados quanto a suas funções nutricionais e também medicinais, e os polissacarídeos presentes no corpo de frutificação são as substâncias mais reconhecidas por possuírem atividade antitumoral e imunomoduladora. Porém, apesar de o processo de isolamento, caracterização e atividade antitumoral desses polissacarídeos ter sido bastante investigado nas últimas três décadas, a relação entre a atividade antitumoral e a composição química e estrutural desses componentes ativos ainda não são bem estabelecidas.

O basidiomiceto *Agaricus blazei* Murrill é um cogumelo comestível e vem sendo produzido e consumido em grande escala como alimento e, principalmente, como chá (MIZUNO, 1995; MENOLI et al., 2001; DELMANTO et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002; BARBISAN et al., 2002; BELLINI et al., 2003; RODRIGUES et al., 2003; GUTERREZ et al., 2004). Esse cogumelo possui o potencial para ser estudado como BRM em infecções por microrganismos patogênicos, com finalidades medicinais (BERNARDSHAW et al., 2005).

Alguns estudos também têm avaliado a utilização de substâncias alternativas no combate à infecção por *Salmonella*. Lee et al. (2006) examinaram o efeito de *Schizandrae fructus* contra infecção por *S. Typhimurium*, em camundongos. Esses pesquisadores verificaram que a administração do extrato metanólico de *S. fructus* teve efeitos marcantes na mortalidade e no número de *S. Typhimurium* viáveis nas fezes dos animais inoculados. Além disso, somente um animal do grupo que recebeu o extrato havia morrido quatro dias após a infecção, enquanto todos os camundongos do grupo controle sucumbiram pela infecção. Lee et al (2006) também não detectaram sinais clínicos e danos histológicos nos animais tratados com o extrato de *S. fructus*. Stefanova et al. (2007), em um estudo sobre os efeitos imunomoduladores de cumarina, observaram redução da contagem de *S. Typhimurium* no fígado e baço de camundongos, 24 horas, três e cinco dias após a inoculação intraperitoneal da bactéria.

O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito imunomodulador do extrato aquoso de *A. blazei* em aspectos do sistema imunológico de animais experimentais desafiados com *Salmonella Typhimurium*, considerando o interesse da utilização do mesmo na profilaxia ou terapêutica de diversas condições patológicas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos e Patógenos Alimentares, do Departamento de Microbiologia, e no Biotério Central, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Viçosa-MG.

2.1 Camundongos

Foram utilizados camundongos albinos suíços, machos, recém-desmamados, pesando, em média, 18 g. Todos os animais foram obtidos das matrizes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa e foram mantidos sob temperatura e umidade constantes, com um ciclo de 12 h escuro/luz, com acesso livre à dieta padrão para roedores (Purina, Brasil) e água *ad libitum*. Todos os procedimentos envolvendo camundongos foram conduzidos de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA - Brasil).

2.2 Extrato do *Agaricus blazei*

Amostras de *A. blazei* desidratadas foram obtidas da Associação dos Produtores de Cogumelo do Norte de Minas e Vale do Jequitinhonha (APROCONOVA, Montes Claros, MG, Brasil). A metodologia de extração foi realizada como descrito no capítulo 1, item 2.2.

2.3 Microrganismo

Esse estudo foi conduzido com *S. enterica* sorotipo Typhimurium, de origem humana, isolada na fundação Ezequiel Dias (FUNED, Belo Horizonte, MG), gentilmente cedida pelo Prof. Jacques Robert Nicoli, do Laboratório de Ecologia e Fisiologia Microbiana, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB - UFMG, Belo Horizonte, MG). A bactéria foi mantida a - 80° C em meio BHI (Infusão de Cérebro e Coração, Oxoid) contendo glicerol 20%.

2.4 Grupos de estudo e tratamentos

Os animais receberam 0,6 mL⁻¹ dia⁻¹ de extrato aquoso de *A. blazei* e 10⁶ UFC mL⁻¹ de *Salmonella* Typhimurium, ambos por gavagem intragástrica. Os animais foram separados aleatoriamente em quatro grupos, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 - Grupos de estudo e tratamentos

Grupos de estudo	Tratamentos
1	Água (0,6 mL dia ⁻¹)
2	Água (0,6 mL dia ⁻¹) e 0,1 mL de solução salina contendo 10 ⁶ UFC mL ⁻¹ de <i>S. Typhimurium</i>
3	Extrato aquoso de <i>A. blazei</i>
4	Extrato aquoso de <i>A. blazei</i> (0,6 mL dia ⁻¹) e 0,1 mL de solução salina contendo 10 ⁶ UFC mL ⁻¹ <i>S. Typhimurium</i>

Todos os animais foram pesados no início do experimento e uma vez a cada semana até o término do período experimental.

2.5 Eutanásia

Os animais foram anestesiados com éter e eutanasiados no 22^o dia do período experimental.

2.6 Análise de translocação bacteriana

No quinto dia após o desafio microbiano e 17 dias após o início da administração do extrato aquoso de *A. blazei*, os animais foram eutanasiados e o fígado, o baço e os linfonodos mesentéricos foram removidos assepticamente, pesados e homogeneizados em tubos de vidro com solução salina 0,85 %. Quando necessário, foram feitas diluições seriadas em solução salina. O plaqueamento foi realizado em ágar MacConkey (Merck) para detecção de colônias típicas de *Salmonella*, seguido de incubação a 37 °C, por 48 h.

Com objetivo de confirmar a translocação de *Salmonella* para os órgãos dos animais experimentais, as colônias típicas de *Salmonella* em ágar MacConkey foram transferidas, pela técnica de plaqueamento de réplica (MADIGAN et al., 2004), para placas de ágar BPLS (ágar verde brilhante vermelho de fenol, lactose, sacarose, Merck). As colônias típicas em ágar BPLS foram transferidas para placas de ágar TSA (ágar tripticase de soja, Oxoid) e incubadas a 37 °C, por 48 h. Posteriormente, foi realizada análise sorológica (soro polivalente de *Salmonella*, Probac, Brasil) dessas colônias subcultivadas em ágar TSA.

2.7 Índice esplênico

Os baços dos animais eutanasiados, no 22^o dia do experimento, foram pesados, e os resultados foram expressos como peso do órgão (mg) por unidade de peso corporal (g) (LEE et al., 2003).

2.8 Determinação de IgA secretora (IgAs) do conteúdo do intestino delgado

Os camundongos foram eutanasiados, o intestino delgado foi removido e os conteúdos foram retirados, pesados e diluídos em tampão salina fosfato (PBS) na proporção de 500 mg de conteúdo intestinal para 2,0 mL de PBS, de acordo com Rodrigues et al. (2000), conforme descrito no capítulo 1, item 2.9.

2.9 Determinação de citocinas (TNF- α , IFN- γ e IL-10) no soro

As concentrações de TNF- α , IFN- γ e IL-10 no soro dos animais foram determinadas por ELISA de captura, conforme descrito no capítulo 1, item 2.10.

2.10 Análises histopatológicas do intestino delgado, baço e fígado

A metodologia de análise foi realizada conforme descrito no capítulo 1, item 2.11.

2.11 Análises estatísticas

As análises foram realizadas conforme apresentado no capítulo 1, item 2.12.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Peso dos animais

O peso de, em média, 11 g por animal ao longo de 21 dias de duração do experimento, não variou ($P>0,05$) entre os animais dos diferentes grupos experimentais (Figura 1). Van der Meer e Bovee-Oudenhoven (1998) também não verificaram alterações significativas no ganho de peso em ratos desafiados com 10^9 UCF mL⁻¹ de *S. enteritidis*, ao longo de 12 dias. Nesta pesquisa, também não foram verificados sinais de infecção nos animais desafiados com *Salmonella*. Porém, em outros trabalhos, foram encontrados resultados diferentes do reportado neste. Bovee-Oudenhoven et al. (2003) verificaram perda de peso, como manifestação da infecção sistêmica, em ratos desafiados com *S. enteritidis* e tratados com frutooligossacarídeos. Lee et al. (2006) observaram que a inoculação de 10^5 UFC de *Salmonella*, em camundongos, causou sinais clínicos de infecção, como letargia. Portanto, a ausência de sinais de infecção e a manutenção da taxa de ganho de peso nos animais deste estudo indicam que o número de células de *Salmonella* pode não ter sido suficiente para causar sintomas da doença, como diarreia e letargia. Contudo, a dose de *Salmonella* utilizada para desafiar animais experimentais varia entre os autores, em função da estirpe bacteriana avaliada; da espécie

de roedor estudada; das condições de criação dos animais, *germ free* ou convencional e do BRM em estudo, entre outros (RODRIGUES et al., 1996; VAN DER MEER e BOVEE-OUDEHNOVEN, 1998; BOVEE-OUDEHNOVEN et al., 2003; LIMA-FILHO et al., 2004; SILVA et al., 2004; TEN BRUGGENCAT et al., 2004; LEE et al., 2006).

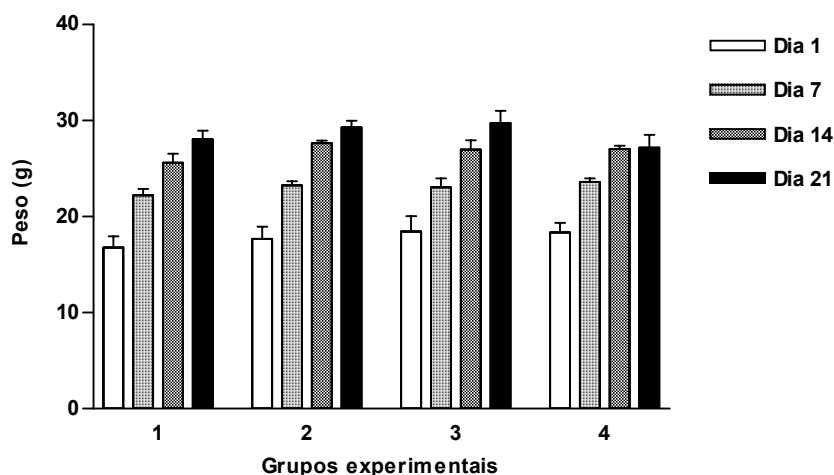


Figura 1 - Variações de peso dos animais submetidos aos tratamentos experimentais, durante 21 dias. Os grupos experimentais estão descritos na metodologia. Os dados são médias \pm desvio-padrão.

3.2 Índice esplênico

Não ocorreram variações significativas no índice esplênico (SI) dos animais experimentais ($P > 0,05$), mas pode-se observar que houve uma tendência dos animais dos grupos desafiados (2 e 4) apresentarem um valor superior aos demais, indicando que ocorreu uma resposta imunológica do animal à *Salmonella*, independente da administração do extrato aquoso de *A. blazei*. Alterações nos valores de SI se devem às funções desempenhadas pelo baço, como órgão imune. O baço é um órgão linfóide, que produz linfócitos e anticorpos como funções relacionadas ao sistema imunológico (ROSS et al., 1993), além de agir como um filtro do sangue para microrganismos e antígenos circulantes (SILVA et al., 2004). Bin Hafeez

(2003), apesar de ter encontrado efeitos imunoestimulatórios do extrato da planta fenogrego em camundongos, como aumento da atividade fagocítica de macrófagos, também não verificaram efeitos significativos nos valores de SI dos animais. Com isso, pode-se inferir que o discreto aumento detectado nos valores de SI nos animais desafiados, pode estar relacionado à resposta fisiológica dos animais, visto que, nem sempre há a associação direta entre aumento da imunidade, verificado por algum indicador de função imunológica, e aumento significativo neste índice.

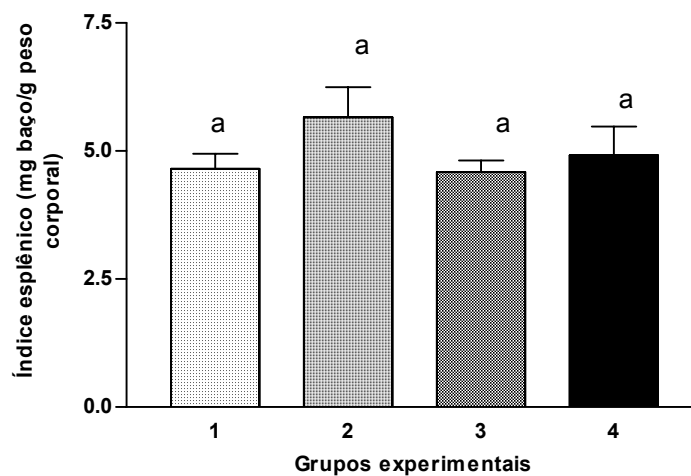


Figura 2 - Índice esplênico dos animais. Os grupos experimentais estão descritos na metodologia. Os dados são médias \pm desvio-padrão. Nas barras que apresentam pelo menos uma mesma letra, os tratamentos não diferem entre si, em 5% de probabilidade, pelo Teste Tukey.

3.3 Secreção de IgAs no intestino delgado

A secreção de IgAs no intestino delgado dos camundongos não foi afetada pela administração do extrato aquoso de *A. blazei* ou pelo desafio microbiano (Figura 3). Estes resultados demonstram, portanto, não ter ocorrido uma proteção local da mucosa dos camundongos, pois a IgA é a classe de anticorpo predominante em muitas secreções externas e tem muitas funções, diretas e indiretas, que servem para prevenir agentes infecciosos, tais como bactérias e vírus, de romper a barreira mucosa (FAGARASAN e HONJO, 2002; WOOF e MESTECKY, 2005). De acordo

com Bollinger et al. (2003) e Everett et al. (2004), a IgA secretora (IgAs) é um dos principais fatores que previne a translocação bacteriana, que pode resultar em sepse e morte no hospedeiro. O aumento na secreção de IgA também foi relacionado com o aumento da imunidade local contra *S. Typhimurium* em animais tratados com probióticos (RODRIGUES et al., 1996; LIMA-FILHO et al., 2004; SILVA et al., 2004), um efeito que não foi verificado nesta pesquisa.

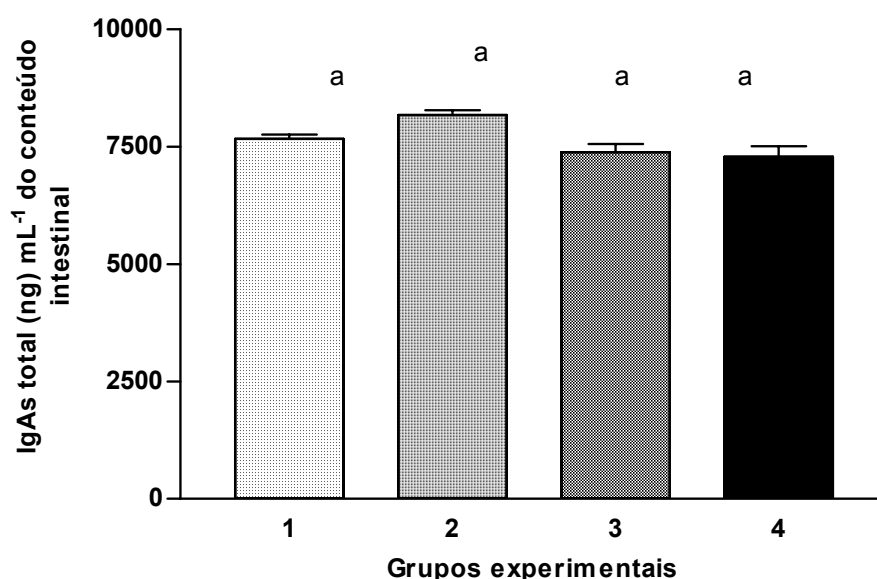


Figura 3 - Concentração de IgAs no conteúdo do intestino delgado dos camundongos. Os grupos experimentais estão descritos na metodologia. Os dados são médias \pm desvio-padrão. Nas barras que apresentam pelo menos uma mesma letra, os tratamentos não diferem entre si, em 5% de probabilidade, pelo Teste Tukey.

3.4 Secreção de citocinas séricas

Os valores de TNF- α , IFN- γ e IL-10 foram similares em todos os animais avaliados ($P > 0,05$). Estes resultados são diferentes dos obtidos por Bernardshaw et al. (2005), que verificaram um aumento de citocinas MIP-2 e TNF- α no soro de camundongos aos quais foi administrado extrato de *A. blazei*. Porém, esses mesmos autores não verificaram efeito na secreção de

IL-10 e IL-4 nas mesmas condições experimentais. Com esses resultados, esses pesquisadores sugeriram que o extrato deste cogumelo pode ser útil como tratamento profilático e terapêutico contra infecções bacterianas e, possivelmente, outras infecções.

As razões para as diferenças nos resultados encontrados neste experimento e àqueles reportados na literatura podem ser várias, como diferenças na forma de determinação da suposta imunoestimulação, diferenças na metodologia de preparo do extrato do cogumelo, diferenças nas estratégias experimentais, entre outras. Em geral, os experimentos que visam caracterizar o potencial imunomodulador de *A. blazei* pela detecção de citocinas são realizados *in vitro* (SORIMACHI et al., 2001; NAKAJIMA et al., 2003; ELLERTSEN et al., 2006) e não por meio de estudos de secreção como os realizados na presente pesquisa. Considera-se que condições *in vitro* asseguram mais sensibilidade e especificidade (NAKAJIMA et al., 2003). A via de administração do extrato de *A. blazei* utilizada também varia (NAKAJIMA et al., 2003) e, como ressaltaram Grind et al. (2006), o suposto agente responsável pelos efeitos na secreção de citocinas *in vitro* pode não ser absorvido pelo intestino e, assim, não atingir a circulação sanguínea, onde exerceria efeito. Além disso, as variações na forma de extração do *A. blazei* também dificultam a comparação de resultados, sendo que, em várias pesquisas o extrato é adquirido comercialmente e não há informações sobre a forma em que foi produzido (BERNARDSHAW et al., 2006; ELLERTSEN et al., 2006).

3.5 - Translocação de *S. Typhimurium*

Colônias típicas de *S. Typhimurium* foram recuperadas do fígado, baço e MLNs dos animais desafiados nas análises conduzidas no quinto dia após a inoculação de 10^6 UFC mL⁻¹ por animal (Figura 4). Esses resultados confirmam a ocorrência de infecção por *Salmonella*, pois, segundo Stefanova et al. (2007), esta infecção é caracterizada por colonização do fígado e baço. Contudo, não ocorreu diferença significativa ($P > 0,05$) na translocação de *Salmonella* entre os animais do grupo tratado ou não com o

extrato aquoso de *A. blazei* (Figura 4). As colônias típicas de *Salmonella* observadas no ágar MacConkey e que foram transferidas, pela técnica de plaqueamento em réplica, para placas de ágar BPLS, apresentaram também características culturais típicas dessa bactéria. Além disso, todas as colônias, subcultivadas em ágar TSA, também, apresentaram sorologia positiva para *Salmonella*.

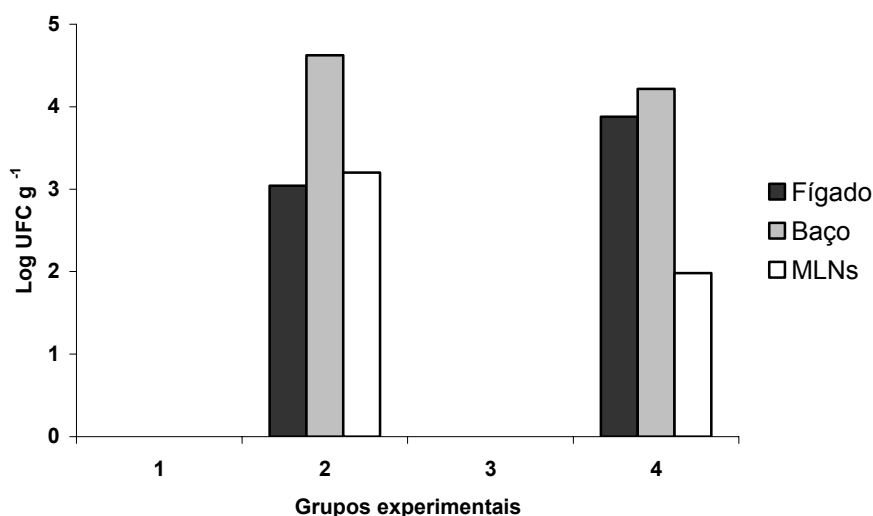


Figura 4 - Translocação de *S. Typhimurium* para órgãos dos animais. Os grupos experimentais estão descritos na metodologia. Os dados são médias \pm desvio-padrão.

Os resultados obtidos nas análises de translocação bacteriana, com a utilização de modelos animais desafiados com *Salmonella* e a associação com algum tipo prévio de tratamento supostamente profilático, são variáveis e mesmo conflitantes entre os autores. Bovee-Oudenhoven et al. (2003) administraram 10^9 células mL⁻¹ de *S. enteritidis*, em ratos, e observaram aumento significativo da translocação bacteriana para fígado, baço e MLNs, após o tratamento prévio dos animais com frutooligossacarídeos. Stefanova et al. (2007), por outro lado, observaram um efeito profilático da administração oral de cumarina, isolada de planta, em camundongos desafiados intraperitonealmente com *S. Typhimurium*. Esses autores verificaram uma redução da contagem bacteriana de *Salmonella* no fígado e

baço dos animais desafiados tratados com a substância. Outras variáveis, além da utilização de estirpes, doses e rotas infecciosas diferentes, podem ter contribuído para obtenção de resultados profiláticos aparentemente paradoxais entre os autores.

Ainda como alternativa aos agentes antimicrobianos usuais, o uso de probióticos também tem sido investigado quanto à prevenção de infecção por *S. Typhimurium* (RODRIGUES et al., 1996; LIMA-FILHO et al., 2004; SILVA et al., 2004).

3.6 Alterações histopatológicas

As análises morfológicas do fígado, do baço e do íleo dos animais experimentais não indicaram diferenças entre o grupo 1, tratado apenas com água, e o grupo 3, tratado com extrato aquoso de *A. blazei*. No grupo desafiado com *S. Typhimurium* (grupo 2), as análises histopatológicas evidenciaram pequenos e difusos focos de infiltrado inflamatório misto (granulo e mononuclear) no parênquima hepático, compatíveis com translocação (Figuras 5 A-D).

O baço dos animais desafiados (grupo 2) também apresentou discreta hiperplasia reacional, com discreto aumento dos folículos linfóides e dos centros germinativos. Estes resultados estão de acordo com aqueles reportados por Lee et al. (2006) que observaram alterações histológicas nos rins, no fígado e baço de animais desafiados com 10^5 células de *S. Typhimurium*, como infiltrados de leucócitos polimorfonucleados (PMNs) no fígado dos animais.

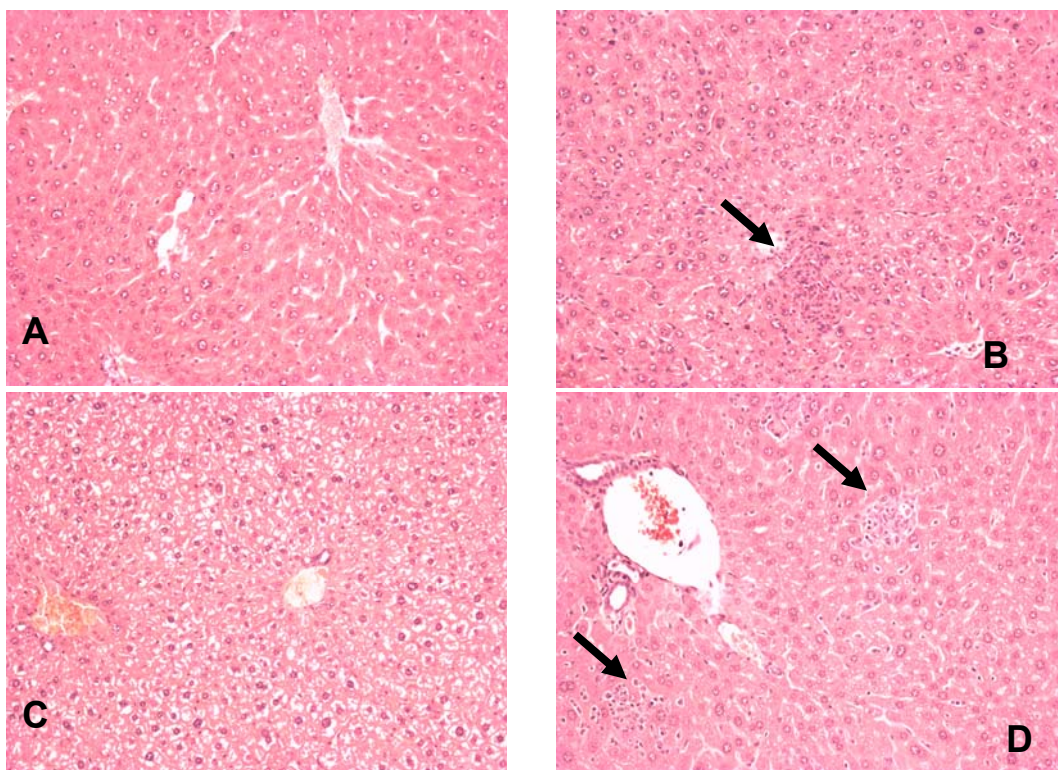


Figura 5 - Aspectos histológicos do fígado (100 X) dos animais experimentais. **A**, grupo 1 (controle tratado com água); **B**, grupo 2 (desafiado com *S. Typhimurium*); **C**, grupo 3 (tratado com *A. blazei*) e **D**, grupo 4 (desafiado com *S. Typhimurium* e tratado com *A. blazei*). As setas em B e D indicam os focos de infiltrado inflamatório misto, difusos. Hematoxilina-eosina.

O tratamento com o extrato aquoso não modificou a resposta do baço ou do fígado no grupo desafiado (Figuras 5 C e D). À semelhança do grupo que recebeu apenas água e gavage intragástrica com *Salmonella*, o íleo dos animais tratados com o extrato aquoso de *A. blazei* não apresentou alterações significativas. Lee et al. (2006), por outro lado, observaram destruição e necrose isquêmica na mucosa do intestino delgado nas análises histopatológicas realizadas em camundongos desafiados com *S. Typhimurium*.

4. CONCLUSÕES

O modelo animal utilizado apresentou-se adequado aos estudos dos fenômenos biológicos propostos. O extrato aquoso de *A. blazei* não promoveu imunoestimulação no modelo animal estudado, visto que não afetou os valores das variáveis selecionadas para essa aferição, bem como não exerceu efeito profilático na infecção por *Salmonella*. Não foi verificado efeito significativo no aumento do índice esplênico dos animais desafiados ou não-desafiados com *S. Typhimurium*, após administração do extrato aquoso de *A. blazei*. Não ocorreu uma proteção local da mucosa intestinal nos animais, como verificado pela ausência de diferença significativa na secreção de IgAs no intestino delgado dos camundongos desafiados ou não-desafiados, submetidos ao tratamento com o extrato aquoso de *A. blazei*. A secreção de citocinas também não foi alterada pela administração do extrato aquoso de *A. blazei*, conforme determinações das concentrações de TNF- α , IFN- γ e IL-10 séricas. O extrato aquoso de *A. blazei* não foi capaz de prevenir a infecção sistêmica nos animais desafiados com *Salmonella*, como detectado pelas análises de translocação. As análises histopatológicas do baço e do fígado dos animais apresentaram-se compatíveis com o quadro de translocação bacteriana nos animais dos grupos desafiados com *Salmonella*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBISAN, L. F., MYAMOTO, M., SCOLASTICI, C., SALVADORI, D. M. F., RIBEIRO, L. R., EIRA, A. F., CAMARGO, J. V. L. Influence of aqueous extract of *Agaricus blazei* on rat liver toxicity induced by different doses of diethylnitrosamine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.83, p.25-32, 2002.

BELLINI, M. F., GIACOMINI, N. L., EIRA, A. F., RIBEIRO, L. R., MANTOVANI, M. S. Anticlastogenic effect of aqueous extracts of *Agaricus blazei* on CHO-k1 cells, studying different developmental phases of mushroom. **Toxicology in Vitro**, v.17, p.465-469, 2003.

BERNARDSHAW, S., JOHNSON, E., HETLAND, G. An extract of the mushroom *Agaricus blazei* Murill administered orally protects against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.62, p.393-398, 2005.

BIN-HAFEEZ, B., HAQUE, R., PARVEZ, S., PANDEY, S., SAYEED, I., RAISUDDIN, S. Immunomodulatory effects of fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) extract in mice. **International Immunopharmacology**, v.3, p.257-265, 2003.

BOLLINGER, R. R., EVERETT, M. L., PALESTRANT, D., LOVE, S. D., LIN, S. S., PARKER, W. Human secretory immunoglobulin A contribute to biofilm formation in the gut. **Immunology**, v.109, p.580-587, 2003.

BOVEE-OUDEHNOVEN, I. M. J., TEN BRUGGENCATE, S. J. M., LETTINK-WISSINK, M. L. G., VAN DER MEER, R. Dietary fructo-oligosaccharides and lactulose inhibit intestinal colonization but stimulate translocation of salmonella in rats. **Gut**, v.52, p.1572-1578, 2003.

DELMANTO, R. D., DE LIMA, P. L. A., SUGUI, M. M., DA EIRA, A. F., SALVADORI, D. M. F., SPEIT, G., RIBEIRO, L. R. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Mutation Research**, v.496, p.15-21, 2001.

ELLERTSEN, L. K., HETLAND, G., JOHNSON, E., GRINDE, B. Effect of medicinal extract from *Agaricus blazei* Murill on gene expression in human monocyte cell line examined by microarrays and immuno assays. **International Immunopharmacology**, v.6, p.133-143, 2006.

EVERETT, M. L., PALESTRANT, D., MILLER, S. E., BOLLINGER, R. R., PARKER, W. Immune exclusion and immune inclusion: a new model of host-bacterial infections in the gut. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v.4, p.321-332, 2004.

FAGARASAN, S., HONJO, T. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defenses. **Nature Reviews Immunology**, v.3., p.63-72, 2002.

GRIND, B., HETLAND, G., JOHNSON, E. Effects on gene expression and viral load of medicinal extract from *Agaricus blazei* in patients with chronic hepatitis C infection. **International Immunopharmacology**, v.6, p.1311-1314, 2006.

GUTERREZ, Z. R., MANTOVANI, M. S., EIRA, A. F., RIBEIRO, L. R., JORDÃO, B. Q. Variation of the antimutagenicity effects of water extracts of *Agaricus blazei* Murrill in vitro. **Toxicology in Vitro**, v.18, p.301-309, 2004.

HAPFEILMEIR, S., HARDT, W-D. A mouse model for *S. typhimurium* induced enterocolitis. **Trends in Microbiology**, v.13, n.10. p. 497-503, 2005.

KALUPAHANA, R. S., MASTROENI, P., MASKELL, D., BLACKLAWS, B. A. Activation of murine dendritic cells and macrophages induced by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Immunology**, v.115, p.462-472, 2005.

LEE, M-H., KWON, H. A., KWON, D-Y., PARK, H., SOHN, D-H, KIM, Y-C., EO, S-K., KANG, H-Y., KIM, S-W., LEE, J. H. Antibacterial activity of medicinal herb extracts against *Salmonella*. **International Journal of Food Microbiology**, v.11, p.270-275, 2006.

LEE, Y-L., KIM, H-J., LEE, M-S., KIM, J-M., HAN, J-S., HONG, E-K., KWON, M-S., LEE, M-J. Oral administration of *Agaricus blazei* (H1 strain) inhibited tumor growth in a sarcoma 180 inoculation model. **Experimental Animals**, v.52, n.5, p.371-375, 2003.

LEUNG, M. Y. K., LIU, C., KOON, J. C. M., FUNG, K. P. Polysaccharide biological response modifiers. **Immunology Letters**, v.105, p.101-114, 2006.

LIMA-FILHO, J. V. M., VIEIRA, L. Q., ARANTES, R. M. E., NICOLI, J. R. Effect of the Escherichia coli EMO strain on experimental infection by Salmonella enterica serovar Typhimurium in gnotobiotic mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p.1005-1013, 2004.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. Tradução de Cynthia Maria Kyaw. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 10 ed., 2004. 608p.

MENOLI, R. C. R. N., MANTOVANI, M. S., RIBEIRO, L. R., SPEIT, G., JORDÃO, B. Q. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill extracts on V79 cells. **Mutation Research**, v.496, p.5-13, 2001.

MIZUNO, T. Kawariharatake, *Agaricus blazei* Murrill: medicinal and dietary effects. **Food Reviews International**, v.11, p.167-172, 1995.

NAKAJIMA, A., ISHIDA, T., KOGA, M., TAKEUCHI, T., MAZDA, O., TAKEUCHI, M. Effect of water extract from *Agaricus blazei* Murrill on antibody-producing cells in mice. **International Immunopharmacology**, v.2, p.1205-1211, 2002.

OHNO, N., FURUKAWA, M., MIURA, N. N., ADACHI, Y., MOTOI, M., YADOMAE, T. Antitumor β -glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.24, n.7, p.820-828, 2002.

OLIVEIRA, J. M., JORDÃO, B. Q., RIBEIRO, L.R., EIRA, A. F., MANTOVANI, M. S. Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murrill lineage 99/26) in mammalian cells in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, v.40, p.1775-1780, 2002.

RICHTER-DAHLFORS, A., BUCHAN, A. M. J., FINLAY, B. B. Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella typhimurium* resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. **Journal of Experimental Medicine**, v.186, n.4, p.569-580, 1997.

RODRIGUES, A. C. P., CARA, D. C., FRETEZ, S. H. G. G., CUNHA, F. Q., VIEIRA, E. C., NICOLI, J. R., VIEIRA, L. Q. *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, p.404-414, 2000.

RODRIGUES, A.C.P., NARDI, R.M., BAMBIRRA, E.A., VIEIRA, E.C., NICOLI, J.R. Protective effect of *Saccharomyces boulardii* against experimental oral infection with *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri* in gnotoxenic mice. **Journal of Applied Microbiology**, v.81, p.251-256, 1996.

RODRIGUES, S. B., SOARES, I. A., MARQUES-SILVA, G. G., ROCHA, C. L. M. S. C. Avaliação do potencial antimutagênico do cogumelo do sol (*Agaricus blazei*) no sistema *methG1* em *Aspergillus (=Emericella) nidulans*. **Acta Scientiarum. Agronomy**. v.25, n.2, p.513-517, 2003.

SASHINAMI, H., YAMAMOTO, T., NAKANE, A. The cytokine balance in the maintenance of a persistent infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in mice. **Cytokine**, v.33, p.212-218, 2006.

SILVA, A. M., BARBOSA, F. H. F., DUARTE, R., VIEIRA, L. Q., ARANTES, R. M. E., NICOLI, J. R. Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental salmonellosis in mice. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.29-37, 2004.

SORIMACHI, K., AKIMOTO, K., IKEHARA, Y., INAFUKU, K., OKUBO, A., YAMAZAKI, S. Secretion of TNF- α , IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei* Murrill fraction *in vitro*. **Cell Structure and Function**, v.26, p.103-108, 2001.

SPELMAN, K., BURNS, J. J., NICHOLS, D., WINTERS, N., OTTERSBERG, S., TENBORG, M. Modulation of cytokines expression by traditional medicines: a review of herbal immunomodulators. **Alternative Medicine Review**, v.11, n.2, p.128-150, 2006.

STEFANOVA, T., NIKOLOVA, N., MICHAILOVA, A., MITOV, I., IANCOV, I., ZLABINGER, G. J., NEYCHEV, H. Enhanced resistance to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice after coumarin treatment. **Microbes and Infection**, v.9, n.1, p.7-14, 2007.

TEN BRUGGENCATE, S. J. M., BOVEE-LOUDENHOVEN, I. M. J., LETTINK-WISSINK, M. L. G., KATAN, M. B., VAN DER MEER, R. Dietary fructo-oligosaccharides and inulin decrease resistance of rats to salmonella: protective role of calcium. **Gut**, v.53, p.530-535, 2004.

VAN DER MEER, R., BOVEE-LOUDENHOVEN, I.M.J. Dietary modulation of intestinal bacterial infections. **International of Dairy Journal**, v.8, p.481-486, 1998.

WOOF, J. M., MESTECKY. Mucosal immunoglobulins. **Immunological Reviews**, v.206, p.64-82, 2005.

ZHANG, M., CUI, S. W., CHEUNG, P. C. K., WANG, Q. Antitumor polysaccharide from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, p.4-19, 2007.