

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Juliana Lauar Gonçalves

IMUNOESTIMULAÇÃO PELO FUNGO *AGARICUS BLAZEI*:
do alimento à inflamação



Belo Horizonte
2011

Juliana Lauar Gonçalves

**IMUNOESTIMULAÇÃO PELO FUNGO *AGARICUS BLAZEI*:
do alimento à inflamação**

Versão final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Imunologia.

Orientadora: Jacqueline I. Alvarez-Leite

Orientador: Mauro Martins Teixeira

Belo Horizonte

2011

043 Gonçalves, Juliana Lauer.
Imunoestimulação pelo fungo *Agaricus blazei*: do alimento à inflamação
[manuscrito] / Juliana Lauer Gonçalves. – 2011.

128 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite. Coorientador: Prof.
Dr. Mauro Martins Teixeira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. *Agaricus blazei*. 2. Inflamação. 3. Aterosclerose. 4. Artrite Experimental. 5.
Dieta. I. Alvarez-Leite, Jacqueline Isaura. II. Teixeira, Mauro Martins. III.
Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV.
Título.

CDU: 577.1



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE JULIANA LAUAR GONÇALVES. Aos vinte dias do mês de dezembro de 2011, às 13:30 horas reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Imunoestimulação pelo fungo *Agaricus blazei*: do alimento à inflamação”, requisito final para a obtenção do grau de *Doutor em Ciências: Imunologia*. Abrindo a sessão a Presidente da Comissão, Profa. Jacqueline Isaura Alvarez Leite, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Carla de Oliveira Barbosa Rosa da Universidade Federal de Viçosa, aprovada; Dra. Renata Nascimento de Freitas da Universidade Federal de Ouro Preto, aprovada; Dra. Adaliene Versiani Matos Ferreira da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dra. Lucíola da Silva Barcelos da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dr. Mauro Martins Teixeira, co-orientador, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite, orientadora, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 20 de dezembro de 2011.

Dra. Carla de Oliveira Barbosa Rosa – UFV

Dra. Renata Nascimento de Freitas – UFOP

Dra. Adaliene Versiani Matos Ferreira – UFMG

Dra. Lucíola da Silva Barcelos – UFMG

Dr. Mauro Martins Teixeira – co-orientador – UFMG

Dra. Jacqueline
- UFMG

Isaura

Alvarez

Leite

-

orientadora

A todos que também se dedicam para o desenvolvimento da ciência da nutrição, para que a opção por um alimento signifique primordialmente uma opção por saúde.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e à Pró-reitoria de pesquisa da UFMG pelo financiamento de meus estudos e produção dos manuscritos.

À minha orientadora, Prof. Jacqueline I. Alvarez-Leite, que me iniciou na ciência e continuou presente na minha formação científica em todos os momentos. Obrigada pelos valiosos ensinamentos durante todos esses anos e pela inestimada oportunidade que você me deu de encontrar o que me realiza profissionalmente.

Ao meu orientador, Prof. Mauro Martins Teixeira, por me abrir as portas do seu laboratório e por toda a gentileza com que me mostrou novas perspectivas na ciência.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia, pelas reflexões que me instigaram.

*Ao Prof. Wiliam César Bento Regis e à Minasfungi do Brasil®, por terem nos oferecido o cogumelo *Agaricus blazei* para estudo e pela seriedade da empresa ao incentivar a pesquisa científica garantindo a segurança do seu produto frente aos consumidores. Wiliam, obrigada também pelo apoio nas discussões dos projetos. Que nossa parceria com o *A. blazei* se prolongue!*

À Prof. Ana Maria Faria Caetano pelo suporte no experimento de dosagem de imunoglobulina e acima de tudo pela fundamental motivação científica que sempre me trouxe.

Ao Prof. Valbert Nascimento Cardoso, pelo suporte nos experimentos com radioisótopos e contribuição em minha formação científica.

À Maria Helena Alves de Oliveira, que por ser tão competente no que faz, tornou meu trabalho muito mais eficiente e seguro.

À Celise, Poliana e Grazi por me socorrerem sempre que precisei! Muito obrigada pela atenção!

Ao Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional, Labin, do qual eu faço parte à 10 anos. Foram muitas gerações que se formaram no Labin e que eu vi passar. Obrigada a todos vocês que contribuíram em cada experimento, cada sacrifício, cada lavagem de biotério, cada cafezinho, cada limpeza de laboratório, cada reunião científica! Em especial a turma que dividiu comigo o período do doutorado: Alda, Ana Cecília, Daniela, Fabíola, Carmen Zita, Gisele, Lana, Lilian, Lorryne, Rachel, Sabrina, Solange, Maria Carmen, Tatiana e Thalita. Obrigada por tudo!

Ao laboratório de Imunofarmacologia; um grande e competente grupo de pesquisa que sempre me acolheu muito bem! Obrigada a todos pelas valiosas contribuições.

Ao laboratório de Imunobiologia, em especial à Thaís e Archimedes, pelo suporte técnico, teórico e “fechou aqui”.

À Prof. Leda e aos (sensacionais) integrantes do laboratório de Gnotobiologia sempre disponíveis em qualquer necessidade.

Aos meus colaboradores, que dividiram comigo cada etapa da realização desse trabalho e que me proporcionaram momentos de grande crescimento científico:

Lu Fernandes, uma amiga que esteve comigo desde o princípio. Foi muito gratificante crescer junto com você. Obrigada por todas as contribuições nesses 10 anos, impossíveis de listar!

Daniel Cisalpino, seu modo particular de ver a ciência no mínimo me “infectou”. Obrigada pelo auxílio com a biologia molecular e o inglês nosso de cada dia.

Diogo Valadares, parceiro de A. blazei; apesar de somente no final do doutorado ter tido você como meu colaborador, nossa parceria foi um grande encontro.

Edenil Costa Aguilar, Ed! Obrigada por me emprestar sua paciência quando eu não tive. Obrigada também pelo auxílio na avaliação histológica e em todos os momentos que você esteve presente.

Celso Queiroz, aprendi muito sobre articulações com você. Obrigada pelo auxílio nas avaliações histológicas.

Gustavo Menezes e Sylvia, muito obrigada a vocês dois por me ensinarem a microscopia intravital.

Livia Tavares, Kátia D. Silveira e Vivian Vasconcelos, muito obrigada por todo auxílio com o modelo de artrite. A experiência de vocês acrescentou muito na execução e desenvolvimento da tese.

Gostaria também de deixar registrado meu agradecimento pela fundamental participação de três importantes colaboradores; Ana Cristina Gomes Santos, Angélica Thomaz Vieira e Eric H. Roma de Lima. Exemplos de pesquisadores em todos os aspectos e que tornaram extremamente profunda e valiosa cada discussão sobre esse trabalho. Cada discordância foi essencial. Cada concordância foi um alívio. Muito obrigada a vocês por toda orientação, todo o conhecimento e sabedoria que me dedicaram. Seguramente posso falar que sem vocês três essa tese não existiria.

Agradecimento especial ao Laboratório de Imunologia de LAJ, que foi uma das melhores coisas que me aconteceu no doutorado! Vou agradecê-lo sem definições, porque não existe maneira para fazê-lo. Obrigada por cada momento que foi vivido! Teria a metade da graça se não houvesse o LILAJ!

E finalmente à minha família, que me deu o suporte emocional e moral para seguir em frente a cada dificuldade. Os valores que vivencio com vocês são os pilares da minha formação, são o modo como eu vejo o mundo e a ciência. Obrigada à minha avó Isaura, ao meu pai Marcio, minha mãe Namira, meus irmãos Renata e Filipe, meus sobrinhos Raissa e Pedro, à Marisa e ao Marco Antônio, aos meus tios e tias, primos e primas, ao meu amor Eric (que como se não bastasse já ser um excelente colaborador, também é um excelente namorado) e à sua família.

*“A resposta certa, não importa nada: o essencial é
que as perguntas estejam certas.”*

Mário Quintana

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XIII
RESUMO	XVI
ABSTRACT	XVIII
1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 AGARICUS BLAZEI	23
2.2 ATEROSCLEROSE.....	27
2.2.1 Aterosclerose: Início e desenvolvimento da lesão	27
2.2.2 Aterosclerose e sistema imunológico	29
2.3 ARTRITE.....	32
3. OBJETIVOS	36
3.1.1 <i>Objetivos específicos</i>	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 ANIMAIS	40
4.2 SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM AGARICUS BLAZEI	40
4.3 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	43
4.3.1 <i>Parte I – Imunoestimulação pelo Agaricus blazei</i>	43
4.3.2 <i>Parte II – Agaricus blazei na resposta inflamatória crônica da aterosclerose no camundongo apoE nocaute</i>	44
4.3.3 <i>Parte III – Agaricus blazei na resposta inflamatória da artrite induzida por antígeno em camundongo (modelo agudo)</i>	45
4.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	47
4.4.1 <i>Teste de permeabilidade intestinal</i>	47
4.4.2 <i>Determinação de IgA secretória</i>	47
4.4.3 <i>Atividade da mieloperoxidase (MPO)</i>	48
4.4.4 <i>Atividade da n-acetilglicosaminidase (NAG)</i>	48
4.4.5 <i>Citometria de fluxo</i>	49
4.4.5.1 <i>Análise da citometria de fluxo</i>	50
4.4.6 <i>Histologia das lesões ateroscleróticas</i>	54
4.4.7 <i>Determinação de citocinas por ELISA</i>	54
4.4.8 <i>Real time PCR</i>	55
4.4.8.1 <i>Extração do RNA</i>	55
4.4.8.2 <i>Quantificação do RNA</i>	55
4.4.8.3 <i>Preparo do cDNA por Transcrição Reversa</i>	56
4.4.8.4 <i>PCR específica</i>	56
4.4.9 <i>Avaliação da migração de neutrófilos para a cavidade articular</i>	56
4.4.10 <i>Contagem total dos leucócitos</i>	57
4.4.11 <i>Contagem diferencial dos leucócitos</i>	57
4.4.12 <i>Avaliação da morte celular no lavado da cavidade articular</i>	57
4.4.13 <i>Teste de pressão crescente na pata de camundongo</i>	58
4.4.14 <i>Análise histopatológica da articulação do joelho</i>	60
4.4.14.1 <i>Quantificação da perda de proteoglicanos</i>	60
4.4.15 <i>Microscopia intravital na microvasculatura do joelho</i>	60
4.4.16 <i>Cultura de esplenócitos e ensaios de dosagem de citocinas</i>	62
4.4.17 <i>Análises Estatísticas</i>	62
5. RESULTADOS.....	64
5.1 PARTE I - IMUNOESTIMULAÇÃO COM AGARICUS BLAZEI.....	65

5.1.1 <i>Agaricus blazei</i> estimula elementos da resposta imune inata e adaptativa sem provocar perda da função de barreira no intestino.	65
5.1.2 <i>Agaricus blazei</i> aumenta o percentual de linfócitos CD4 ⁺ CD8 ⁺ duplo positivos, células CD4 ⁺ CD44 ^{high} e a frequência de células CD49b ⁺ CD3 ⁺ (NKT) no baço.	66
5.2 PARTE II - AGARICUS BLAZEI NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA CRÔNICA DA ATEROSCLEROSE NO CAMUNDONGO APOE NOCAUTE.	68
5.2.1 <i>Agaricus blazei</i> agrava a lesão aterosclerótica.	68
5.2.2 <i>Agaricus blazei</i> aumenta a expressão de genes pró-aterogênicos no arco aórtico.	70
5.2.3 <i>Agaricus blazei</i> aumenta a atividade de MPO em diferentes locais anatômicos no camundongo apoE ^{-/-}	71
5.2.4 <i>Agaricus blazei</i> aumenta a atividade de NAG na aorta torácica e abdominal no camundongo apoE ^{-/-}	73
5.2.5 <i>Agaricus blazei</i> amplifica a resposta inflamatória no camundongo apoE ^{-/-} através da ativação de células da imunidade inata e adaptativa.	74
5.2.6 <i>Agaricus blazei</i> promove a secreção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ no baço.	79
5.3 PARTE III - AGARICUS BLAZEI NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DA ARTRITE INDUZIDA POR ANTÍGENO (MBSA) EM CAMUNDONGO.	80
5.3.1 <i>Agaricus blazei</i> não altera o número de leucócitos totais, neutrófilos e células mononucleares circulantes de animais com artrite.	80
5.3.2 <i>Agaricus blazei</i> aumenta a expressão do receptor de quimiocina CXCR2 nos neutrófilos circulantes de animais com artrite.	81
5.3.3 <i>Agaricus blazei</i> diminui o infiltrado de neutrófilos em animais com artrite e aumenta o número de células mononucleares em animais não desafiados na cavidade articular.	82
5.3.4 <i>Agaricus blazei</i> não altera dor e atividade de MPO mas melhora parcialmente os níveis percentuais de proteoglicanos da cartilagem e diminui o aspecto do infiltrado inflamatório no joelho.	83
5.3.5 <i>Agaricus blazei</i> diminui a adesão de leucócitos na microvasculatura da cavidade articular.	86
5.3.6 <i>Agaricus blazei</i> diminui a produção de quimiocinas e IL-1 β , importantes para o recrutamento de neutrófilos no tecido periarticular.	87
5.3.7 <i>Agaricus blazei</i> diminui a secreção de TNF- α em esplenócitos de animais com artrite.	88
5.3.8 <i>Agaricus blazei</i> aumenta a morte celular no pool de células da cavidade articular.	90
6. DISCUSSÃO	91
7. RESULTADOS SUPLEMENTARES	104
7.1 RESULTADO SUPLEMENTAR I – EFEITO DO <i>AGARICUS BLAZEI</i> NA PRODUÇÃO DE IGA SECRETÓRIA EM ANIMAIS TLR2 ^{-/-}	105
7.2 RESULTADO SUPLEMENTAR II - <i>AGARICUS BLAZEI</i> NO MODELO DE MUCOSITE INDUZIDA POR QUIMIOTERÁPICO (CLORIDRATO DE IRINOTECANO) EM CAMUNDONGO BALB/C.	106
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
9- ANEXOS	120
ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UFMG (CETEA/UFMG) I (ATEROSCLEROSE)	121
ANEXO B – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UFMG (CETEA/UFMG) II (ARTRITE).....	122
ANEXO C – CERTIFICADO DE QUALIDADE DO PRODUTO <i>AGARICUS BLAZEI</i> UTILIZADO NO ESTUDO .	123
ANEXO D – ARTIGO PRO-INFLAMMATORY EFFECTS OF THE MUSHROOM <i>AGARICUS BLAZEI</i> AND ITS CONSEQUENCES ON ATHEROSCLEROSIS DEVELOPMENT	128

LISTA DE QUADROS

<i>Quadro 1 - Compostos bioativos do A. blazei descritos na literatura até 2011.</i>	25
<i>Quadro 2. Composição qualitativa – Dieta AIN-93G modificada, controle e suplementada com Agaricus blazei.</i>	41
<i>Quadro 3. Composição qualitativa – Ração comercial para roedores, Labina®- Purina, (Nestlé, Brasil)*, controle e suplementada com Agaricus blazei.</i>	41
<i>Quadro 4. Composição química das dietas utilizadas</i>	42
<i>Quadro 5: Anticorpos utilizados</i>	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Agaricus blazei</i> ²⁵ _____	23
Figura 2: Componentes do sistema imune na placa aterosclerótica ⁸¹ . _____	31
Figure 3: Eventos inflamatórios envolvidos na artrite. _____	35
Figura 4: Esquema experimental – Imunoestimulação pelo <i>A. blazei</i> . _____	43
Figura 5: Esquema experimental – <i>A. blazei</i> na aterosclerose. _____	44
Figura 6: Esquema experimental – <i>A. blazei</i> na artrite. _____	46
Figura 7: Estratégia de análise de células linfóides por citometria de fluxo. _____	52
Figura 8: Estratégia de análise de células mielóides por citometria de fluxo. _____	53
Figura 9: Foto do equipamento utilizado no teste de pressão crescente na pata de camundongo. _____	59
Figura 10: Foto no momento do teste de pressão crescente na pata de camundongo. _____	59
Figura 11: Foto da microscopia intravital da microvasculatura do joelho. _____	61
Figura 12: Homeostase intestinal e ativação de células inatas em camundongos C57BL/6. _____	65
Figura 13: Perfil de células da imunidade inata no baço de camundongos C57BL/6. _____	66
Figura 14: Perfil de linfócitos no baço de camundongos C57BL/6. _____	67
Figura 15: Avaliação da área de lesão e deposição de colágeno na lesão aterosclerótica da válvula aórtica de camundongos apoE ^{-/-} . _____	68
Figure 16: Aspecto histológico da área de lesão e deposição de colágeno na lesão aterosclerótica da válvula aórtica de camundongos apoE ^{-/-} . _____	69
Figura 17: Expressão de moléculas pro-aterogênicas no arco aórtico de camundongos apoE ^{-/-} . _____	70
Figura 18: Atividade de MPO em diferentes locais anatômicos no camundongos apoE ^{-/-} . _____	72
Figura 19: Atividade de macrófagos no intestino, aorta e coração em camundongos apoE ^{-/-} . _____	73
Figura 20: Perfil de células da imunidade inata no baço de camundongos apoE ^{-/-} . _____	75
Figura 21: Perfil de linfócitos no baço de camundongos apoE ^{-/-} . _____	76
Figura 22: Perfil de células da imunidade inata no baço de camundongos apoE ^{-/-} . _____	77
Figura 23: Perfil de células da imunidade inata circulantes de camundongos apoE ^{-/-} . _____	78
Figura 24: Perfil das citocinas pró-inflamatórias, IFN- γ e TNF- α , no baço de camundongos apoE ^{-/-} . _____	79
Figura 25: Efeito do <i>A. blazei</i> nas células circulantes de camundongos C57BL/6 com artrite induzida por antígeno. _____	80
Figura 26: Efeito do <i>A. blazei</i> nos neutrófilos circulantes de camundongos C57BL/6 com artrite induzida por antígeno. _____	81
Figura 27: Efeito do <i>A. blazei</i> na artrite induzida por antígeno em camundongos C57BL/6. _____	82
Figura 28: Efeito do <i>A. blazei</i> na hipernocicepção, níveis de MPO e conteúdo de proteoglicanos da cartilagem de camundongos C57BL/6 submetidos à artrite induzida por antígeno (AIA). _____	84
Figura 29: Efeito do <i>A. blazei</i> sobre a histologia das articulações de camundongos C57BL/6 submetidos à artrite induzida por antígeno (AIA). _____	85
Figura 30: Efeito do <i>A. blazei</i> sobre a interação leucócito-endotélio na microvasculatura sinovial de camundongos C57BL/6 submetidos à artrite induzida por antígeno (AIA). _____	86
Figura 31: Efeito do <i>A. blazei</i> na produção de citocinas e quimiocinas na artrite induzida por antígeno (AIA) em camundongos C57BL/6. _____	87

<i>Figura 32: Efeito do A. blazei na produção de TNF-α e IL-10 em esplenócitos de camundongos C57BL/6 submetidos à artrite induzida por antígeno (AIA).</i>	89
<i>Figura 33: Efeito do A. blazei na produção na morte de células da cavidade articular de camundongos C57BL/6 submetidos à artrite induzida por antígeno (AIA).</i>	90
<i>Figura 34: Ação do A. blazei no intestino.</i>	94
<i>Figure 35: Ação do A. blazei no baço.</i>	96
<i>Figure 36: Ação do A. blazei na aterogênese.</i>	99
<i>Figure 37: Ação do A. blazei na artrite.</i>	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitros
µm	Micrômetros
°C	Grau centígrado
ABCA-1	Cassete de transporte-1 ligado a adenosina trifosfato
AIA	Artrite induzida por Antígeno
AIN	Instituição Americana de Nutrição
ANOVA	Análise de Variância
APC	Célula apresentadora de antígeno
Apo	Apoproteína
ApoE	Apoproteína E
ApoE ^{-/-}	Deficiência para apoE
AR	Artrite Reumatóide
ATP	Adenosina trifosfato
BHT	.Butil hidróxitolueno
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAM	Molécula de adesão celular
CFA	Adjuvante completo de Freund
CXCL-1	Proteína Químioatraente de Neutrófilos
DCV	Doenças cardiovasculares
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IASP	International Association for the Study of Pain
ICAM-1	Molécula-1 de adesão intercelular
IFN-γ	Interferon γ
iNOS	Óxido nítrico sintase indutível
i.p.	Intraperitoneal
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-2β	Interleucina 2 β
IL-4	Interleucina 4

IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LDLr ^{-/-}	Deficiência para receptor de LDL
mBSA	Albumina Bovina Metilada
<i>M. butiricum</i>	<i>Micobacterium butiricum</i>
MCP-1	Proteína 1 quimiotática para monócito
MCSF	Fator estimulatório de colônia de macrófago
mmLDL	Lipoproteína de baixa densidade minimamente oxidada
MMPs	Metaloproteinases
MIP-1 α	Proteína inflamatória para macrófagos 1 α
MIP-1 β	Proteína inflamatória para macrófagos 1 β
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade classe II
MPO	Mieloperoxidase
MPP	Metaloproteinases
Na ₃ PO ₄	Fosfato de Sódio
NK	Células matadoras naturais ou <i>natural killer</i>
NF- κ B	Fator de Transcrição Nuclear kapa B
NO	Óxido nítrico
PAMPs	Moléculas padrão associadas a patógenos
PBS	Tampão fosfato salina
PRRs	Receptores padrão de reconhecimento
Rag ^{-/-}	Deficiência para células B e T
RNA	Ácido ribonucléico
RANTES	Regulador da ativação normal de expressão e secreção em células T
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SRA	Receptor <i>scavenger A</i>
SMC	Células musculares lisas
TGF β	Fator de transformação e crescimento β
Th1	Resposta celular do tipo 1
Th2	Resposta celular do tipo 2
Th3	Resposta celular do tipo 3

Th17	Resposta celular do tipo 17
TLR	Receptores <i>toll like</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
VCAM-1	Molécula de adesão vascular 1
VE	Veículo

RESUMO

Extratos do fungo *Agaricus blazei* (*A. blazei*), um cogumelo comestível, tem sido descritos como agentes imunoestimuladores e por isso, usados como terapia alternativa para o tratamento de muitas doenças, incluindo neoplasias malignas. No entanto, os efeitos do *A. blazei* como um alimento funcional ainda não estão completamente elucidados. O objetivo do presente estudo foi investigar as ações do tratamento dietético com o *A. blazei* em modelos experimentais de aterosclerose e artrite. Para isso, camundongos apoE^{-/-} e camundongos submetidos ao protocolo de artrite induzida por antígeno (AIA), foram alimentados com dieta suplementada com 5% de *A. blazei* desidratado e processado em pó. Os tratamentos decorreram por 6 e 12 semanas no modelo de aterosclerose, e por uma semana, no modelo de AIA. Análises de fenótipo celular, mostraram um aumento na população de células CD4⁺CD8⁺, CD49b⁺CD3⁺, CD11b⁺CD86⁺ e linfócitos CD4⁺CD44^{high}, no baço de animais apoE^{-/-} após 6 semanas de tratamento dietético. A extensão do tratamento para 12 semanas, permitiu detectar adicionalmente aumento da população de células CD49b⁺CD3⁻ no baço. Na circulação, a população de neutrófilos Gr1⁺/Ly6G, também foi aumentada. Essas populações celulares em conjunto, possivelmente contribuíram na aterogênese, uma vez que o tratamento com *A. blazei*, agravou de forma pronunciada a área de lesão na válvula aórtica, inclusive tornando-a mais instável, pela redução do conteúdo de colágeno intraplaca. Genes pró-aterogênicos, incluindo os genes relacionados à captação de LDL oxidada (SRA-2, CD36 e TLR4), relacionados à vulnerabilidade da placa (MMP9 e CXCL-1) e à adesão de leucócitos (VCAM-1), tiveram também sua expressão estimulada pelo tratamento com o *A. blazei*, no arco aórtico. Quanto aos dados obtidos no modelo de artrite, o *A. blazei* diminuiu expressivamente o infiltrado de neutrófilos para cavidade articular, como também o número de leucócitos aderidos na microvasculatura do joelho, e as quimiocinas responsáveis pela migração de neutrófilos, CXCL-1, sua homóloga CXCL-2 e a citocina IL-1 β , mesmo tendo sido detectado um aumento em neutrófilos expressando maior quantidade do receptor de quimiocina CXCR2 na circulação. Apesar da menor atividade inflamatória no local do desafio antigênico, não houve redução de parâmetros como dor e atividade de MPO no tecido periarticular. Inversamente ao observado em animais não desafiados, o *A. blazei* diminuiu a produção de TNF- α em cultura de esplenócitos, o que é um indício de efeitos diferenciados dependendo do grau de ativação celular. Por fim, detectamos um aumento da morte celular na cavidade articular, o que nos indica uma provável ação do *A. blazei* em diminuir alguns parâmetros da resposta inflamatória nesse modelo. Diante dos achados do presente estudo, podemos concluir que o *A. blazei* leva a uma imunoestimulação celular, que na aterosclerose assume repercussões pró-aterogênicas, mas que no modelo de AIA, tem um claro efeito de inibição da produção local de quimiocinas e diminuição do infiltrado de neutrófilos. Estudos posteriores são necessários para esclarecer os mecanismos de ação do *A. blazei* na artrite.

Palavras-chave: *Agaricus blazei*; inflamação; aterosclerose; artrite induzida por antígeno; dieta.

ABSTRACT

Extracts of the mushroom *Agaricus blazei* (*A. blazei*), an edible mushroom, have been described as possessing immunostimulatory activities and is used as an alternative medicine for the treatment of many diseases. However, these effects of *A. blazei* as a functional food stuff have not been fully investigated *in vivo*. The aim of the present study was to investigate the effects of the *A. blazei* dietary treatment in experimental models of arthritis and atherosclerosis. Cellular phenotype analysis showed an increase in the splenic CD4⁺CD8⁺, CD49b⁺CD3⁺, CD11b⁺CD86⁺ populations and CD4⁺CD44^{high} lymphocytes after six weeks of dietary treatment in apoE^{-/-} mice. Extending the treatment to the twelfth week allowed detection of a systemic and splenic increase in CD49b⁺CD3⁻ cells and Gr1⁺/Ly6G neutrophil population was also increased. Together, these cellular populations possibly contributes to atherogenesis, as treatment with *A. blazei* severely aggravated the injured area on the aortic valve and even increasing its instability by decreasing the intra-plaque collagen content. Pro-atherogenic genes, including the ones related to oxidized LDL uptake (SRA-2, CD36 and TLR4), the ones related to plaque vulnerability (MMP9 and CXCL-1) and to leukocyte adhesion (VCAM-1) were up regulated in the aortic arch by the treatment with *A. blazei*. However, in the arthritis model, treatment with *A. blazei* reduced dramatically neutrophil infiltration to the articular cavity as well as the number of leukocytes adhered to the knee microvasculature. Moreover, chemokines responsible for neutrophil (CXCL-1, CXCL-2) migration and also the cytokine IL-1 β was significantly reduced, even though an increase in neutrophils CXCR-2^{high} was detected. Although there was a decrease of the inflammatory activity in the antigen injection site, there was no change in parameters like hyper nociception or MPO activity in the periarticular tissue. Inversely to what is observed in non-challenged animals, treatment with *A. blazei* decreases the release of TNF- α in cultured splenocytes, what seems to indicate that the observed effects vary accordingly to the degree of cellular activation. Additionally, we detected an increase in cell death in the articular cavity, which points to a possible way through which *A. blazei* reduces the inflammatory response in this model. Taking all this into account, we can conclude that *A. blazei* causes a cellular immunostimulation, and, in the atherosclerosis model it assumes pro-atherogenic consequences but in the AIA model, it clearly displays an inhibitory effect in the local production of chemokines and in a decrease of the neutrophil infiltrate. Further studies are required to clarify the mechanisms through which *A. blazei* causes its effects in the arthritis model.

Keywords: *Agaricus blazei*; inflammation, diet; antigen-induced arthritis; atherosclerosis, diet.

1. INTRODUÇÃO

Historicamente, evidências de que a nutrição tem impacto direto na resposta imunológica ou inflamatória, foram primeiramente observadas em investigações clínicas e modelos experimentais que mostraram que deficiências nutricionais podem causar susceptibilidade a infecções respiratórias e gastrointestinais, aumentando a gravidade dos sintomas e duração da doença ^{1; 2}. No Brasil esta situação é particularmente relevante, uma vez que existe uma alta prevalência de desnutrição hospitalar, próxima a 48% ³, e que essa está diretamente relacionada com prejuízos no funcionamento do sistema imunológico.

Doenças com um componente inflamatório reconhecido são tratadas em geral com fármacos específicos e anti-inflamatórios. No entanto, desde que componentes nutricionais são capazes de exercer funções na inflamação², a dietoterapia deve ser parte integrante do tratamento e pensada de forma criteriosa, baseada em evidências científicas, pois pode acarretar benefícios^{4; 5} ou malefícios⁶ dependendo do balanço entre os nutrientes, presentes nos alimentos, escolhidos.

Nesse sentido, os recentes avanços em nutrição tentam buscar alimentos/nutrientes com funções na modulação do estado imune/inflamação, com potenciais ações terapêuticas. O entendimento da relação entre estado imunológico e a nutrição progrediu nas últimas décadas, e os estudos atuais focam nos mecanismos pelos quais nutrientes são capazes de modular o sistema imune na saúde e na doença.

Entre os alimentos com potenciais efeitos terapêuticos está o fungo *Agaricus blazei*, uma espécie nativa do Brasil, que pertence à família dos fungos basidiomicetos (cogumelos), e tem sido utilizada em várias partes do mundo por suas alegações funcionais⁷. Cogumelos têm sua história bem estabelecida nas terapias orientais, como *Ganoderma lucidum* (Reishi), *Lentinus edodes* (Shiitake), *Inonotus obliquus* (Chaga) e muitos outros que têm sido cultivados e usados na Coreia, China, Japão e Rússia⁸. O número de diferentes espécies de fungos na Terra é estimado em 140.000, dentre as quais somente 10% são conhecidas. Das 14.000 espécies, cerca de 50% são comestíveis e aproximadamente 700 espécies tem atribuições de propriedades terapêuticas⁸. Além de ser consumido *in natura*, seco ou como infusão, o *A. blazei* é também comercializado em cápsulas, comprimidos ou tabletes.

Popularmente, esse cogumelo é utilizado na proteção ao câncer, diabetes, hiperlipidemia, aterosclerose e hepatite crônica ⁹. Embora clamado por possuir estes benefícios, faltam estudos conclusivos na literatura que reforcem ou refutem seus efeitos na maioria das doenças mencionadas.

Diversos trabalhos tem focado na capacidade imunoestimulatória do *A. blazei* ^{10; 11; 12}. Outras evidências sugerem, que em modelos de neoplasias malignas ou em células tumorais o *A. blazei* possui efeito benéfico, diminuindo o crescimento dos tumores e causando a apoptose nas células tumorais^{13; 14; 15; 16; 17}. No entanto, existe ainda uma lacuna sobre o entendimento da atuação

desse cogumelo em doenças caracterizadas tipicamente como inflamatórias, e adicionalmente, dos efeitos do seu consumo oral, principal forma de uso popular.

Por essa razão, foi despertado o interesse por nosso grupo, que estuda diversos modelos de doenças inflamatórias, a investigação da administração do *A. blazei* em alguns desses modelos, por entendermos que a patogênese na resposta inflamatória é peculiar a cada doença. A presente tese tem como principal foco, os modelos murinos de aterosclerose e artrite.

A aterosclerose, como mencionado, é uma doença inflamatória crônica e que é induzida por distúrbios do metabolismo lipídico, sendo responsável por uma grande proporção de doenças cardiovasculares¹⁸. A aterosclerose acomete os vasos sanguíneos e resulta em doença cardíaca coronária (infarto agudo do miocárdio, IAM) e doença cerebrovascular (acidente vascular encefálico, AVE). De acordo com a OMS¹⁹, em 2008, as doenças cardiovasculares representaram 17,3 milhões das mortes em todo o mundo, e dessas, 7,3 milhões foram por IAM e 6,2 milhões foram por AVE, consequências diretas da aterosclerose. Projeta-se que em 2030 o número de mortes por doenças cardiovasculares atinjam 23.6 milhões de pessoas em todo o mundo¹⁹.

Estudos anteriores do nosso grupo analisaram a ação do *A. blazei* nos fatores de risco, e diretamente na formação da aterosclerose e mostraram que o *A. blazei* não foi capaz de influenciar de forma determinante os fatores como a dislipidemia, hiperglicemia e a e marcadores de estresse oxidativo em camundongos apoE nocaute. Apesar dessa constatação, houve aumento significativo da lesão aterosclerótica. Sendo assim, provavelmente, a ação do *A. blazei* sobre a resposta inflamatória no camundongo apoE pode ter sido o que desencadeou o agravamento da aterogênese, uma vez que outros fatores de risco tradicionais não foram agravados. A partir desse primeira constatação, tornou-se nosso interesse investigar os mecanismos inflamatórios celulares, pelos quais o *A. blazei* interfere na progressão da lesão aterosclerótica.

Paralelo ao estudo da aterosclerose, surgiu também o interesse na artrite reumatóide, uma condição que atinge aproximadamente 1% da população mundial, caracterizada por um estado inflamatório sistêmico que envolve diversos órgãos, incluindo articulações, pele, olhos, pulmão e vasos sanguíneos^{20; 21}. Esse processo inflamatório afeta outras doenças inflamatórias crônicas e em particular, a artrite reumatóide, é considerada um fator de risco independente para a aterosclerose^{22; 23; 24}. A escolha dos dois modelos justifica-se pela possibilidade de complementação do entendimento das alterações da resposta inflamatória geradas pelo *A. blazei*.

Portanto, nossa hipótese é que o *A. blazei*, **oferecido na dieta, é capaz de induzir ativação de componentes da resposta inflamatória de forma sistêmica e isso pode acarretar no agravamento da aterosclerose e da artrite.**

Espera-se que esse trabalho possa contribuir para o estabelecimento de uma referência do efeito da suplementação dietética do *A. blazei* em doenças inflamatórias.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Agaricus blazei*

2.1.2 *Agaricus blazei* e sua composição nutricional.

Cogumelos comestíveis são popularmente conhecidos por suas características nutricionais, usados principalmente nas dietas vegetarianas, sendo alimentos de baixa caloria, com altas concentrações de minerais, vitaminas e fibras. O *Agaricus blazei* (**Figura 1**) é uma espécie de cogumelo comestível, nativo do Brasil, que pertence à família dos fungos basidiomicetos e tem sido utilizada significativamente em várias partes do mundo por suas prováveis alegações funcionais⁷.

Também conhecido popularmente como “Cogumelo do Sol” é natural das regiões serranas da Mata Atlântica do sul do estado de São Paulo, mais especificadamente do município de Piedade. Nas décadas de 60 e 70 foi coletado para a investigação das suas possíveis propriedades funcionais e então enviado para o Japão, onde é conhecido como “Himematsutake” ou “Kawariharatake⁷. A partir de então, começou-se sua comercialização em larga escala para todo o mundo.

A composição nutricional do *A. blazei*, assim como outros alimentos, sofre influencia de vários fatores como técnicas de cultivo, porção consumida e tamanho do cogumelo. Os Cogumelos geralmente são compostos por cerca de 90% de água. Quando desidratado, o *A. blazei* tem um valor energético aproximado de 400 kcal/100g. Quanto a sua composição de macronutrientes, possui cerca de 40% de carboidratos, 40% de proteínas e 1% de lipídeos. Fibras representam 9% do peso seco e dentre as fibras solúveis estão as β -glucanas (dados do produtor, Anexo C).

O *A. blazei* fornece 2 vezes a recomendação para adultos (IDR 2005) de Niacina e Riboflavina. A concentração de ferro nesse cogumelo, merece destaque, chegando a 25mg por 100g de peso seco. Além desses micronutrientes, o *A. blazei* contém Cálcio, Vitamina D entre outras vitaminas do Complexo B, porém as mesmas não estão presentes em quantidades significativas.



Figura 1: *Agaricus blazei*²⁵

Quanto aos compostos bioativos, alguns metabólicos podem ser isolados dos corpos frutíferos ou de culturas puras do micélio. Dentre os componentes do *A. blazei* destacam-se as proteoglicanas e β -glucanas, que podem ser definidas como polissacarídeos não digeridos, que são os principais componentes da parede celular de leveduras e cogumelos²⁶. As glucanas podem ter ligações do tipo α ou β . No corpo frutífero do *A. blazei* as α -glucanas e β -glucanas estão presentes em concentrações diferentes nos diversos estados de maturação.

Kawagishi e colaboradores²⁷, separaram os compostos do corpo frutífero do *Agaricus blazei* para a avaliação da sua atividade anti-tumoral. Uma das frações, denominada FIII-2b, composta de proteínas e de (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana foi a mais eficiente quanto à ação antitumoral.

Outro composto bioativo que já foi identificado nos corpos frutíferos do *Agaricus blazei* é a Agaritina (N- γ -L-(+)glutamil-4-hidroximetilfenilhidrazina), que está presente no gênero *Agaricus*. Quando metabolizada, forma um composto que parece ter atividade antimutagênica, o 4-(hidroximetil) benzenodiazônio. A Agaritina, pode variar suas concentrações dependendo do cultivo e processamento do *Agaricus blazei*. Os estudos que analisam o potencial anticarcinogênico desse composto ainda são controversos²⁸.

Em relação à composição lipídica de cogumelos e especificamente do *Agaricus blazei*, o ergosterol é o esteroide que constitui a membrana celular desses organismos e é similar ao colesterol em mamíferos. Ele é também o precursor da vitamina D₂. Takaku, *et al.*,²⁹ isolaram um ergosterol do *A. blazei* e testaram sua capacidade antitumoral no modelo murino de sarcoma 180. Foi demonstrado que o ergosterol inibe o crescimento tumoral por impedir a angiogênese.

O Quadro 1 sumariza os compostos bioativos do *Agaricus blazei*.

Quadro 1 - Compostos bioativos do *A. blazei* descritos na literatura até 2011.

COMPOSTO	POSSIVEL ATIVIDADE	REFERENCIA
β -D-GLUCANA	Anti-tumoral e imunoestimuladoras	Kawagishi, 1989 ²⁷ ; Itoh, 1994 ¹⁶
AGARATINA	Anti-mutagênica	Liu, 2008 ²⁸
ERGOSTEROL	Anti-angiogênica	Takaku, 2001 ²⁹
LECTINA	Anti-tumoral	Kawagishi, 1988 ²⁷
PROTEOGLUCANAS	Imunoestimuladora	Kim, 2005 ³⁰
PIROGLUTAMATO DE SÓDIO	Anti-angiogênica	Kimura, 2004 ⁹

Os extratos derivados do *A. blazei* são comercialmente disponíveis, no entanto, não é bem definida a composição dos mesmos, o que influencia nas funções atribuídas a esse fungo.

A variação da composição dos extratos se dá pelos diferentes métodos de cultivos, como também, pela produção de metabólicos secundários dos cogumelos tais quais as micotoxinas. Além disso, a composição dos extratos também depende do tipo de extração, se aquosa, alcoólica ou das frações lipídicas.

2.1.3 *Agaricus blazei* e ações descritas no sistema imunológico

A capacidade do *Agaricus blazei*, em induzir a expressão ou secreção de citocinas pró-inflamatórias tem sido estudada^{31; 32; 33; 34} e já foi demonstrada a capacidade do *Agaricus blazei* em estimular a secreção de IL-8 e TNF- α , em macrófagos murinos *in vitro*³². Outro exemplo de ação do *Agaricus blazei* sobre a secreção de citocinas, é o estudo de Kasai e colaboradores³¹ mostrando o aumento da secreção de IL-12 em células mononucleares periféricas humanas. Nesse estudo, ainda foi demonstrado que a secreção de IL-12, estimulada por *Agaricus blazei* é dependente do receptor do tipo Toll 4 (TLR4). O *Agaricus blazei* também aumentou o número de células *Natural killer* no baço de camundongos C57BL/6³¹.

O efeito de *Agaricus blazei* na secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e da citocina anti-inflamatórias IL-10 foi também avaliado em células endoteliais e em monócitos¹². Houve aumento na secreção de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α em cultura de monócitos e, de forma menos pronunciada, em cultura de células endoteliais, sem modificação nos níveis de IL-10. Foi também demonstrado que o *Agaricus blazei* inibe a expressão gênica das interleucinas IL-2, IL-4 e IFN- γ em células mononucleares periféricas humanas³⁵.

Além do efeito sobre a produção de citocinas em leucócitos e células endotélias, o *Agaricus blazei* também foi capaz de aumentar a apresentação de antígenos por células dendríticas^{30; 36}.

Trabalhos de Choi *et al.*,³⁷ sugerem que *Agaricus blazei* pode reduzir a reação anafilática tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Estes autores mostraram que a administração intradérmica de um extrato aquoso de *Agaricus blazei* inibiu a resposta alérgica local ao composto 48/80, indutor de anafilaxia. Além disso, o *Agaricus blazei* foi capaz de inibir a liberação de histamina por mastócitos estimulados em cultura celular, também característico de alergia. Esses efeitos sugerem um efeito do *Agaricus blazei* na atenuação de respostas alérgicas.

As várias frações do *Agaricus blazei* atuam como descrito de muitas maneiras biológicas e em diversos aspectos modulando as respostas imunológicas, podendo levar a atividades funcionais diversas. Não há dúvidas de que o *Agaricus blazei* tem grande potencial imunoestimulador no entanto seus mecanismos de ação em diversas condições inflamatórias ainda não estão claramente demonstrados.

A orientação da utilização racional de alimentos em especial daqueles que concorrem à denominação de alimentos funcionais é de grande importância para a saúde pública, uma vez que os mesmos irão fazer parte do consumo normal da população com o intuito de proteção auxiliar nas diversas desordens relacionadas ao sistema imunológico.

2.2 Aterosclerose

2.2.1 Aterosclerose: Início e desenvolvimento da lesão

Aterosclerose, como anteriormente mencionado, é uma doença inflamatória crônica da parede arterial, induzida por distúrbios do metabolismo lipídico, com presença de células (macrófagos, células T, células B, células *Natural Killer*, células musculares lisas e células dendríticas) e elementos fibróticos das médias e grandes artérias^{38; 39; 40}.

A hipótese oxidativa da aterosclerose sugere que o processo aterosclerótico possa ser iniciado por danos no endotélio vascular, produzido por modificações oxidativas da LDL⁴¹.

Altas concentrações de LDL no plasma podem levar a altas concentrações de LDL no espaço subendotelial. Essa LDL aprisionada na íntima pode tornar-se modificada oxidativamente por espécies reativas de oxigênio (ROS), produzidas por células endoteliais, macrófagos residentes e células musculares lisas⁴².

A oxidação da LDL parece ocorrer em dois estágios: o primeiro, ocorre antes que os monócitos sejam recrutados e resulta da oxidação dos lipídeos da LDL, com pequena alteração na apoB⁴³. Neste estágio, a LDL apresenta-se minimamente oxidada (mmLDL), e ainda pode ser reconhecida pelos receptores de LDL das células⁴⁴. A LDL, quando minimamente oxidada, é capaz de provocar dano no endotélio, podendo induzir a expressão da proteína-1 quimiotática para monócitos (MCP-1) pelas células endoteliais e macrófagos, e do fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) pelas células endoteliais; além de aumentar a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais^{43; 45}. O segundo estágio de oxidação, formando LDL oxidada, começa quando monócitos são recrutados para a lesão e convertidos em macrófagos, onde contribuem com sua enorme capacidade oxidativa. Nesta fase, os lipídeos da LDL são adicionalmente oxidados e a parte protéica da LDL também é modificada, o que impede o reconhecimento da lipoproteína pelo receptor de LDL, tornando-a reconhecível apenas pelos receptores *scavengers* presentes nos macrófagos e células musculares lisas^{43; 46}.

Estes receptores *scavengers* tais como SRA1, SRA2 e CD36, estão presentes na superfície dos macrófagos e células musculares lisas da parede arterial e não sofrem regulação negativa, isto é, sua expressão não é regulada pelo conteúdo intracelular de colesterol. A interação de LDL oxidada (LDLox) com os receptores *scavengers* resulta na rápida captação dessa lipoproteína pelas células musculares lisas e macrófagos. A LDLox é degradada intracelularmente, o colesterol livre é esterificado pela acil CoA: colesterol aciltransferase-1 (ACAT-1) e em seguida armazenado nas gotas lipídicas, conferindo às células o aspecto de espuma^{47; 48}. O acúmulo de células espumosas,

unidade básica da lesão aterosclerótica, leva à formação da primeira lesão da aterosclerose: a estria gordurosa ⁴⁸.

A migração de monócitos para a parede arterial é um dos eventos iniciais na patogênese da aterosclerose ^{49 50}. Embora seu recrutamento para a parede arterial e subsequente diferenciação em macrófagos possa inicialmente servir como função protetora por remover partículas de LDL oxidada ou células apoptóticas, o acúmulo progressivo de macrófagos na parede do vaso e a captação de formas modificadas de LDL via receptores *scavengers* são responsáveis pela formação de lesões ateroscleróticas ^{43; 51; 52}.

Após a migração, a interação entre monócitos, linfócitos T e as células endoteliais vasculares acontece por moléculas de adesão expressas na superfície das células endoteliais e células musculares lisas ativadas, que se ligam a receptores (integrinas) na superfície das células mononucleares circulantes ^{53; 54}. As moléculas de adesão pertencem a várias classes, como selectinas, molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e moléculas de adesão vascular -1 (VCAM-1).

A expressão dessas moléculas pode ser aumentada por citocinas inflamatórias tais como IL-1b, TNF- α e IFN- β ^{54; 55}, porém ICAM-1 pode ter sua expressão aumentada por outros mediadores inflamatórios, tais como estresse oxidativo ⁵⁶ força de cisalhamento; LDL nativa e oxidada ^{57; 58}; microrganismos, incluindo *Chlamydomphila pneumoniae* ⁵⁹ e *T. cruzi* ⁶⁰. Elas são minimamente expressas no endotélio normal; contudo em estágios precoces da aterosclerose, aumentam significativamente sua expressão ⁶¹.

A transição de estria gordurosa, relativamente simples, para lesão mais complexa, é caracterizada pela migração de células musculares lisas (SMC) da camada média da parede arterial para a íntima ou espaço subendotelial. As SMC podem proliferar e captar lipoproteínas modificadas, contribuindo para formação de células espumosas. Essas células também podem sintetizar proteínas da matriz extracelular, levando a formação da capa fibrosa ^{42; 49; 50}. A proliferação e a migração de SMC é provocada por fatores de crescimento e citocinas produzidos por macrófagos, células T e células endoteliais ⁶². Todavia, SMC também são fontes de mediadores inflamatórios tais como MCP-1 ⁶³. Assim, a estria gordurosa pode progredir para uma lesão intermediária e finalmente para lesão complexa com calcificação, acúmulo de plaquetas, podendo ocorrer ruptura do endotélio e trombose ^{38; 39}.

A lesão fibrogordurosa, ou intermediária, contém os mesmos elementos celulares da estria gordurosa. Entretanto, a proporção relativa dos macrófagos carregados de lipídeos, células T e células musculares lisas pode variar de lesão para lesão. Geralmente, a lesão fibrogordurosa alcança uma aparência mais complexa, consistindo de camadas alternadas de células espumosas e células musculares lisas, com uma grande quantidade de tecido conjuntivo. Esta fase de desenvolvimento

da lesão é influenciada por interações entre monócitos/macrófagos e células T que resultam na aquisição de características de estado inflamatório crônico. As células T da lesão estão ativadas expressando citocinas do tipo 1 (pró-inflamatórias) e do tipo 2 (anti-inflamatórias) ⁶⁴. Similarmente, macrófagos, células endoteliais e SMC apresentam-se ativadas produzindo produtos inflamatórios, tais como TNF- α , IL-6 e MCP-1 ⁶⁵.

A placa fibrosa ou placa avançada ou lesão complicada, possui uma superfície coberta por uma capa de espessura variada, consistindo de várias camadas de células musculares lisas cercadas por uma matriz densa de tecido conjuntivo que contém colágeno, fibras elásticas e proteoglicanos. As células musculares lisas que compõem esta lesão tomam uma característica plana ⁶⁶. A formação da lesão avançada é usualmente associada com uma contínua diminuição da espessura da camada média da artéria, resultante da migração das células musculares lisas para a camada íntima e multiplicação das células musculares na íntima durante o desenvolvimento e progressão da lesão ⁶⁷.

Este estágio de desenvolvimento da lesão pode apresentar um centro necrótico que consiste de *debris* de células, material lipídico extracelular como cristais de colesterol e células espumosas. Estudos com humanos e modelos animais de aterosclerose sugerem que a apoptose tem papel importante na formação do centro necrótico ⁶⁵.

Embora lesões avançadas possam proporcionar sintomas de isquemia como resultado de estreitamento progressivo do lúmen do vaso, eventos cardiovasculares agudos que resultam em infarto agudo do miocárdio podem ser gerados por ruptura da placa ou trombose ⁶⁸.

O processo de ruptura da placa pode ser determinado pela estabilidade das lesões. Lesões estáveis que são caracterizadas por SMC embebidas de densa matriz de colágeno, com baixo conteúdo de células inflamatórias e lipídeos no centro necrótico são mais resistentes à ruptura ⁶⁸.

Já as regiões onde as lesões apresentam um grande infiltrado de células inflamatórias e centro necrótico, capa fibrosa frágil e fina, com pouca quantidade de colágeno, são regiões mais suscetíveis à ruptura, caracterizando lesões instáveis ⁶⁸.

A presença de metaloproteinases já foi detectada na região de ruptura de placa. Essas enzimas são secretadas por macrófagos e influenciam a estabilidade das lesões por degradarem as proteínas da matriz extracelular, proporcionando lesões mais instáveis ⁶⁹.

2.2.2 Aterosclerose e sistema imunológico

A resposta inflamatória é controlada pelo sistema imunológico, cujos componentes são abundantes na placa aterosclerótica. Imunidade inata pode ser representada por macrófagos, também necessários para iniciação da aterosclerose. Na imunidade adaptativa, as respostas imunes

são iniciadas quando células B e T reconhecem antígenos específicos envolvidos no processo da doença^{70; 71}.

Em relação à imunidade inata, são grandes as evidências da ativação pró-inflamatória, por antígenos inespecíficos, que podem influenciar no curso da aterosclerose. Essa ativação pró-inflamatória, envolve muitos tipos celulares, os mais importantes macrófagos e células dendríticas, que expressam um repertório de receptores altamente conservados conhecidos por receptores padrão de reconhecimento (PRRs), tais como os receptores *scavenger* e *toll-like*, que reconhecem moléculas padrão associadas à patógenos (PAMPs)⁷².

Evidências da participação da imunidade adaptativa na aterosclerose foram demonstradas por DANKY *et al.*⁷³ e REARDON *et al.*⁷⁴ que relataram que o cruzamento de camundongos apo-E^{-/-} com camundongos deficientes em células B e T (Rag^{-/-}) revelaram redução na lesão aterosclerótica inicial quando comparados com controles apo-E^{-/-} imunocompetentes. Contudo, o impacto do defeito imune não era detectado nos casos de hipercolesterolemia grave.

A análise dos componentes celulares do ateroma de camundongos apo-E^{-/-} mostrou que linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ têm sido detectados nas lesões e que a infiltração de linfócitos T é mais proeminente na fase inicial da lesão e diminui à medida que as lesões progridem⁷⁵, porém em todos os estágios de desenvolvimento da lesão há predominância de linfócitos T CD4⁺ e macrófagos⁷⁶. A migração de monócitos e linfócitos para o espaço subendotelial ocorre em resposta a um gradiente de fatores quimiotáticos, tal como MCP-1, produzidos pelas células inflamatórias e pelas células presentes na parede vascular, incluindo células endoteliais e células musculares lisas⁷⁷.

Macrófagos da placa expressam IL-12 e IFN- γ , duas citocinas pró-inflamatórias, que têm papel ativo nas fases iniciais da aterosclerose, implicando no envolvimento da resposta imune do tipo Th1 na patogênica da doença^{78; 79}. Outras citocinas, como TNF- α , TNF- β , IL-2, IL-1 β aumentam a aderência de monócitos no endotélio e têm papel na formação de estrias gordurosas. Dessa forma, a interação de um ou mais fatores como citocinas, moléculas de adesão e quimiocinas podem promover o recrutamento de linfócitos e monócitos para a íntima das artérias⁸⁰ local em que se acumulam e dão sequência ao processo inflamatório.

Na **Figura 2**, estão representados os componentes do sistema imune presentes na lesão aterosclerótica.

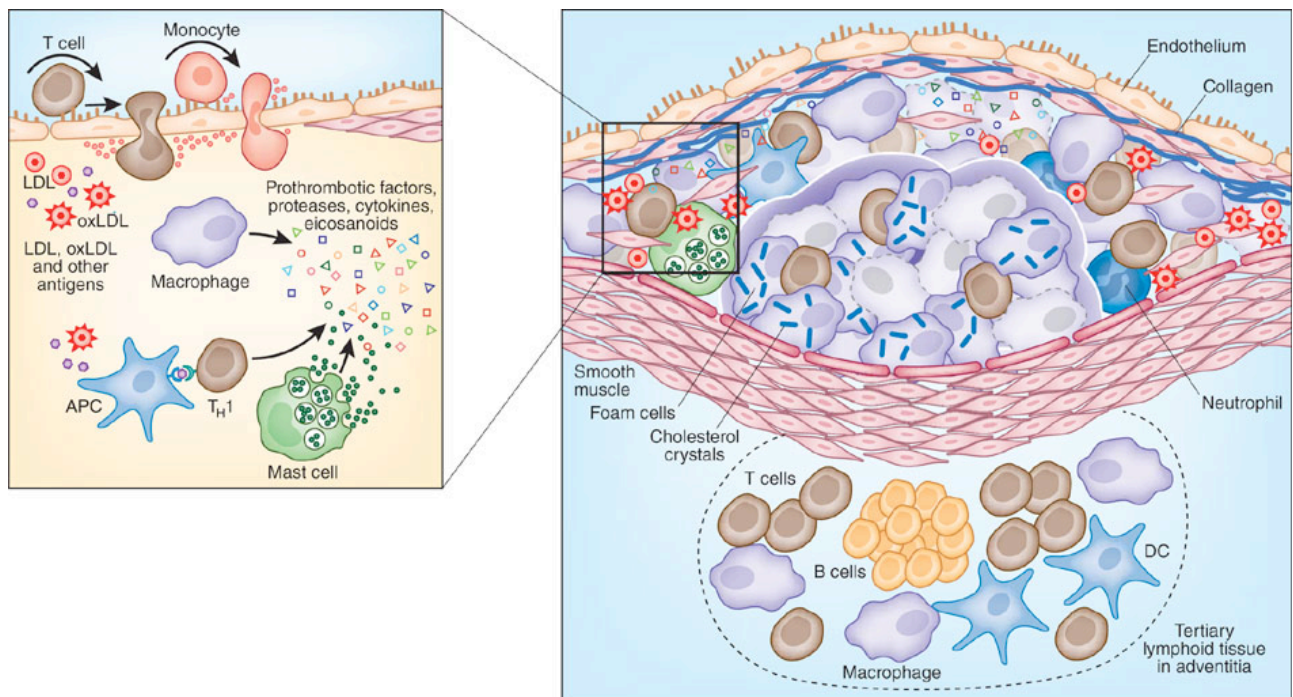


Figura 2: Componentes do sistema imune na placa aterosclerótica⁸¹.

O ateroma apresenta um centro lipídico, incluindo cristais de colesterol, células vivas a apoptóticas e uma capa fibrosa com células musculares lisas e colágeno. Vários tipos de células da resposta imune estão presentes em todo o ateroma, incluindo macrófagos, células T, mastócitos e células dendríticas. Do lado externo à íntima a adventícia envolve o tecido conectivo, neste local as células da resposta imune se acumulam causando a progressão da placa, podem também alcançar estruturas linfóides terciárias com centros germinativos. APC- célula apresentadora de antígeno.

2.3 Artrite

A Artrite Reumatóide (AR) é uma doença inflamatória crônica que acomete cerca de 1% da população mundial ⁸² e está associada a uma alta taxa de morbidade e de mortalidade, principalmente em decorrência de eventos cardiovasculares ^{83; 84}.

A Artrite é uma doença complexa e multifatorial na qual, vários fatores estão envolvidos, sejam eles fatores genéticos, ambientais ou auto-ímmunes ⁸². No entanto, a hierarquia dos eventos inflamatórios que causam a artrite ainda não está bem estabelecida.

A patologia da artrite é caracterizada por acometer primariamente articulações das mãos e dos pés ⁸⁵. A resposta inflamatória ocorre na membrana sinovial com a formação de *pannus* (crescimento excessivo de tecido conjuntivo sobre a superfície articular), em que há invasão e destruição das estruturas articulares ⁸⁵. A cavidade sinovial torna-se hiperplásica em decorrência de um aumento dos sinoviócitos e nesta região intersticial, ocorre intensa angiogênese, com presença de infiltrado inflamatório de diversos tipos celulares, incluindo linfócitos T, B, neutrófilos e macrófagos ⁸⁵. Na **Figura 3**, estão representados os eventos inflamatórios e tipos celulares envolvidos na patogênese da artrite.

O envolvimento de células T na artrite reumatóide, é evidenciado uma vez que, a apresentação de antígenos para linfócitos pelo complexo de histocompatibilidade II (MHCII) pode afetar a predisposição à doença dependendo do alelo de MHCII expresso ⁸⁶. No entanto, apesar da detecção de linfócitos T na inflamação sinovial, a participação de células T parece ser coadjuvante às inatas, uma vez que tratamentos com ciclosporina, imunossupressor de células T, anticorpos anti-CD4 e anti-CD52 surtem poucos efeitos benéficos ao paciente ⁸⁵. Mesmo diante dessa evidência, a resposta do tipo TH1 é característica na artrite, por as citocinas IFN- γ , linfotóxina- β (LT β) e TNF estarem presentes ⁸⁵. Mais recentemente, o envolvimento da resposta inflamatória TH17, tem sido descrita como uma resposta efetora crucial em modelos murinos ^{87; 88}.

Células B, participam da patogênese da artrite pela produção de diversas citocinas e quimiocinas tais como IL-6, IL-10 e LT β ⁸⁵. Drogas direcionadas para agirem sobre células B, como a rituximabe, apresentam eficiência maior no controle da artrite quando compara às drogas que tem como alvo, linfócitos T ^{89; 90}.

Os neutrófilos são as células mais abundantes nas articulações de pacientes com AR em fase ativa ⁹¹. Essas células são capazes de liberar diversos mediadores inflamatórios, como citocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS), além das proteases podendo causar danos articulares, diretamente à cartilagem e ossos, como também, a amplificação da resposta inflamatória ⁹².

Dentre os mediadores inflamatórios produzidos pelos neutrófilos, várias citocinas como, TNF- α , IL-8, IL-1 β e IL-6 tem sido relatadas como mediadores importantes na patogênese da

artrite⁸⁵. Elas assumem papéis em todas as fases da doença por promoverem auto-imunidade, contribuírem com a manutenção da inflamação e direcionarem a destruição dos tecidos adjacentes⁸⁵. A citocina TNF- α apresenta um papel chave em diversos processos, como inflamação, imunomodulação, crescimento, angiogênese e citotoxicidade^{93; 94}, estando esta, envolvida na maior expressão de moléculas de adesão tanto em polimorfonucleares circulantes, quanto em células endoteliais⁹⁵. Além disso, o TNF- α estimula também a síntese de outras citocinas, ativando células endoteliais, fibroblastos, osteoclastos e condrócitos^{96; 97}. O TNF- α tem sido demonstrado por atuar na migração de neutrófilos, na artrite induzida por adjuvante, bem como, na artrite reumatóide em humanos^{97; 98}. O TNF- α induz a ativação leucocitária e endotelial, ativação e sobrevida de fibroblastos sinoviais, sensibilização de receptores nociceptivos e angiogênese^{85; 99}. Outra ação do TNF- α é o direcionamento da formação de osteoclastos, mobilizando seus precursores da medula óssea¹⁰⁰.

A IL-1 β também é detectada no soro de pacientes com artrite¹⁰¹. A IL-1 β tem uma papel chave na gênese de osteoclastos e na perda óssea, mediado por TNF- α , uma vez que o TNF- α pode induzir a expressão de IL-1 β principalmente por células mesenquimais^{102; 103} que tem um papel central no processo de degradação da cartilagem por inibir a síntese de matriz, bem como por induzir a expressão de enzimas (MMPs -metaloproteinases) que a degradam¹⁰⁴. Injeções intra-articulares de IL-1 β geram uma redução de proteoglicanos, estimulam a apoptose de condrócitos e a degradação da matriz óssea¹⁰⁵.

O acúmulo e a permanência dos neutrófilos no sitio inflamatório aumenta a resposta inflamatória, uma vez que, esses neutrófilos são capazes de produzir mais mediadores inflamatórios amplificando assim, a resposta inflamatória⁹². A apoptose de neutrófilos, seja essa, natural ou induzida, está associada com o a indução de mediadores antiinflamatórios e com a resolução da resposta inflamatória¹⁰⁶. Recentemente, nosso grupo demonstrou, que a produção endógena ou mesmo a administração de peróxido de hidrogênio, levou a resolução da resposta inflamatória em um modelo experimental agudo de artrite induzida por mBSA em camundongos. Essa resolução estava associada com diminuição dos fatores que levam a sobrevida dos neutrófilos, induzindo a apoptose dessas células¹⁰⁷.

Além disso, os neutrófilos são células relevantes na produção de mediadores que irão induzir a hipernocicepção (sensação de dor)¹⁰⁸. Isso ocorre, através da liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas¹⁰⁸, da ativação da produção PGE2 e LTB4¹⁰⁸ bem como, da produção de radicais livres (superóxidos, peroxidonitrito) que contribuem para a gênese da hipernocicepção¹⁰⁹. A dor é um dos mais importantes sintomas que acompanham a artrite reumatóide, sendo esta, a principal causa das limitações funcionais dos pacientes.

Estratégias farmacológicas que inibam o recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório demonstraram efeitos positivos com relação a patologia da artrite. Trabalhos do nosso grupo demonstraram que estratégias que possam inibir o receptor CXCR2 (um importante receptor para quimiocinas que induzem o recrutamento de neutrófilos, como para, CXCL2/KC) reduzem os parâmetros inflamatórios observados tanto em um modelo murino de artrite induzida por antígeno²⁰, quanto em um modelo experimental de artrite induzida por adjuvante em rato¹¹⁰. Esta quimiocina, CXCL2 ou interleucina-8 humana, está presente do fluido sinovial de pacientes com a doença ativa ou na articulação de animais com artrite induzida^{111; 112; 113}.

Em relação à participação de macrófagos na patogênese da artrite, é sabido que drogas como metotrexato e inibidores de citocinas, agem primariamente inibindo a produção de citocinas por macrófagos¹¹⁴. Dessa maneira essas células agem como importante fonte de citocinas pró-inflamatórias que vão levar ao agravamento da artrite. A sinalização das funções efetoras de macrófagos na sinóvia, parece ser mediada pela ativação de receptores do tipo toll 2, 3, 4 e 6⁸⁵. Em relação ao tipo de ativação de macrófagos na patogênese da artrite, é sabido que macrófagos que apresentam um fenótipo pró-inflamatório, denominados M1, são a maioria nas articulações com artrite e agravam a doença, enquanto macrófagos alternativamente ativados, denominados M2, apresentam um perfil anti-inflamatório na artrite e um balanço favorecendo a presença de macrófagos M2 podem ser úteis no controle da doença¹¹⁴. Além disso, sabe-se da fundamental contribuição de macrófagos na resolução do processo inflamatório induzido na artrite. Macrófagos são as células responsáveis pelo clareamento dos neutrófilos e falhas nesse processo, amplificam a resposta inflamatória na artrite¹⁰⁷.

Com relação às citocinas e quimiocinas responsáveis pelo agravamento da artrite, podemos dizer que essas também acarretam em repercussões sistêmicas como a função alterada de adipócitos (incluindo a liberação de adipocinas pró-inflamatórias como a adiponectina e resistina), a resistência à insulina e podem culminar na síndrome metabólica, além disso, é observado um efeito no sistema vascular e aceleração da aterosclerose⁸⁵.

Como já pontuado, o tratamento da artrite reumatóide é realizado em especial pelo uso de fármacos, e entre os fármacos de escolha, estão o Tocilizumabe¹¹⁵, anticorpo monoclonal anti-receptor de IL-6¹¹⁶, como também o metotrexato¹¹⁷, potente inibidor do ciclo celular, o Anakinra, uma versão recombinante do antagonista do receptor de IL-1 humana, inibidor competitivo da IL-1 que demonstrou alguns efeitos sobre a erosão óssea presente em pacientes com artrite reumatóide¹¹⁸ e agentes bloqueadores de TNF- α , tais como Infliximabe (anti-TNF quimérico)¹¹⁹. No entanto, por seus alvos serem tipos celulares diversos e alterarem a competência imunológica, esses tratamentos farmacológicos desencadeiam efeitos adversos consideráveis, como aumento da susceptibilidade à infecções, neutropenia e também hepatotoxicidade.

Diante disso, terapias adjuvantes, como a dietoterapia direcionada para o controle da resposta inflamatória, assumem um caráter importante, pois podem acarretar em menores efeitos adversos, além do baixo custo, que pode também repercutir na diminuição do gasto com o tratamento farmacológico caso a dietoterapia seja eficaz.

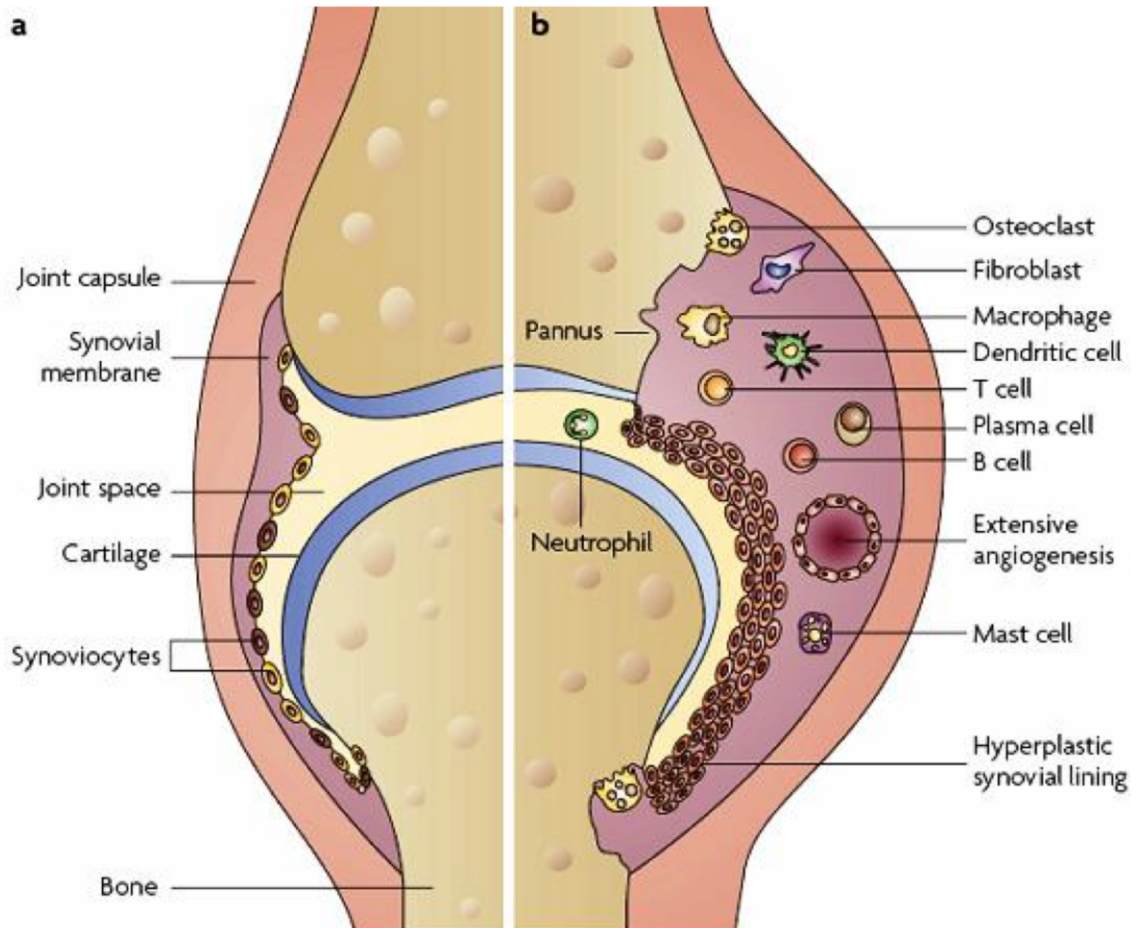


Figure 3: Eventos inflamatórios envolvidos na artrite.

A- Desenho esquemático da articulação do joelho normal. B- Desenho esquemático da articulação do joelho acometido pela artrite. Diversas células participam do processo inflamatório, liberando mediadores inflamatórios que atuam ativando e/ou mesmo recrutando outros tipos celulares amplificando a resposta inflamatória. No processo inflamatório da artrite, representado no painel B, pode-se observar a formação de novos vasos, a hiperplasia da membrana sinovial e destruição óssea.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o estímulo imunológico da suplementação dietética com o cogumelo *Agaricus blazei* nos modelos experimentais de aterosclerose e artrite.

3.1.1 Objetivos específicos

Parte I – Imunoestimulação com *Agaricus blazei*.

- Testar as consequências do estímulo do *Agaricus blazei* no intestino por meio de:
 - Avaliação da permeabilidade intestinal;
 - Determinação da concentração de IgA secretória nas fezes;
 - Avaliação da atividade de macrófagos e neutrófilos no intestino delgado;
- Testar as consequências sistêmicas do estímulo do *Agaricus blazei* por meio de:
 - Caracterização das alterações imunológicas sistêmicas por meio da avaliação do fenótipo das células esplênicas (monócitos, células NK, células NKT e linfócitos).

Parte II - *Agaricus blazei* na resposta inflamatória crônica da aterosclerose no camundongo apoE nocaute.

- Observar a formação e estabilidade de placas ateroscleróticas pela análise histológica da lesão na área da válvula aórtica em estágio inicial e avançado;
- Avaliar a atividade celular de macrófagos no intestino, aorta torácica e abdominal;
- Avaliar a atividade celular de neutrófilos, no baço, intestino, pulmão, aorta torácica e abdominal;
- Caracterizar possíveis alterações imunológicas sistêmicas por meio da avaliação do fenótipo das células esplênicas e circulantes (monócitos, neutrófilos, células NK, células NKT e linfócitos);
- Avaliar a inflamação sistêmica por meio da dosagem de produção das citocinas TNF- α e IFN- γ no baço
- Verificar a atividade inflamatória e fagocitária das células das lesões ateroscleróticas cardíacas pela expressão de receptores *scavengers* SRA1, SRA2 e CD36; do receptor *Toll like-4*; da molécula de adesão VCAM-1; das quimiocinas CXCL-1 e CCL-2 e das enzimas MMP-9 e iNOS, por meio da técnica de real time PCR.

Parte III –*Agaricus blazei* na resposta inflamatória da artrite induzida por antígeno (mBSA) em camundongo.

- Investigar alterações inflamatórias sistêmicas por meio da contagem total e diferencial de leucócitos circulantes, como também, a análise do fenótipo de neutrófilos circulantes;

- Investigar a hipernocicepção como parâmetro de agravamento/melhora da resposta inflamatória;
- Avaliar o efeito na migração de neutrófilos e células mononucleares para a cavidade articular;
- Avaliar o comprometimento articular;
- Observar a dinâmica da microcirculação leucocitária (rolamento e adesão) avaliando a interação leucócito/endotélio *in vivo* na microvasculatura do joelho como parâmetro inflamatório;
- Avaliar a liberação de citocinas e quimiocinas (IL-1 β , IL-10, CXCL-1 e CXCL-2) e a atividade de neutrófilos no tecido periarticular como parâmetro de atividade inflamatória.
- Testar a produção de citocinas (TNF- α e IL-10) como parâmetro de atividade inflamatória em cultura de baço;
- Avaliar a morte celular no lavado da cavidade articular .

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Os camundongos C57BL/6 foram obtidos do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG). Os camundongos homozigotos para a ausência do gene da apoE gerados no fundo genético C57BL/6, foram obtidos do Laboratório de Bioquímica Nutricional (LAbiN), do Departamento de Bioquímica e Imunologia – ICB/UFMG.

Os animais de todos os grupos tiveram livre acesso à dieta e água e foram mantidos em gaiolas coletivas, em ambiente com ciclos de luminosidade de 12 horas (7:00 às 19:00) e temperatura controlada (20 a 24° C). Os animais foram mantidos em gaiolas para ratos ou camundongos para até 6 animais.

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFMG (CETEA/UFMG): n° do protocolo 132/2009 (Anexo A) e n° do protocolo 119/2010 (Anexo B).

4.2 Suplementação dietética com *Agaricus blazei*

Para o tratamento dietético do estudo de imunoestimulação (Parte I) e do estudo em artrite (Parte II), foi oferecida aos animais de forma controlada e diariamente, ração comercial para roedores, Labina®- Purina, (Nestlé, Brasil), processada em *pellet* suplementada com 5% de *Agaricus blazei* desidratado em pó, cedido pela empresa Minas Fungi®, Brasil. Para o grupo Controle foi oferecida somente ração comercial, Labina®- Purina, (Nestlé, Brasil). As dietas foram oferecidas por 6 ou 7 dias, dependendo do protocolo.

Para o tratamento dietético do estudo em aterosclerose (Parte III), foi oferecida aos animais de forma controlada e diariamente, a dieta AIN-93G modificada¹²⁰, suplementada com 5% de *Agaricus blazei* desidratado em pó, gentilmente cedido pela empresa Minas Fungi®, Brasil, em substituição parcial ao amido de milho. Para o grupo Controle foi oferecida somente dieta AIN-93G modificada. As dietas foram oferecidas pelo período de seis e 12 semanas experimentais.

Os Quadros 2 à 4 mostram a composição qualitativa e química das dietas utilizadas.

Quadro 2. Composição qualitativa – Dieta AIN-93G modificada, controle e suplementada com *Agaricus blazei*.

Ingrediente	AIN-93G (g/100g)	AIN-93G suplementada com <i>A. blazei</i> (g/100g)
Caseína	20	20
Metionina	0,3	0,3
Sacarose	10	10
Celulose	5	5
Óleo de soja	7	7
Mistura de Minerais	3,5	3,5
Mistura de Vitaminas	1,0	1,0
Bitartarato de colina	0,25	0,25
Amido de milho	52,95	47,95
<i>Agaricus blazei</i> seco	---	5,0

Quadro 3. Composição qualitativa – Ração comercial para roedores, Labina®- Purina, (Nestlé, Brasil)*, controle e suplementada com *Agaricus blazei*.

Ingrediente	Labina (g/100g)	Labina suplementada com <i>A. blazei</i> (g/100g)
Milho integral moído, cloreto de sódio (sal comum), aditivo antifúngico fungistático, cloreto de colina, mix vitamínico e mineral, feno de alfafa, fosfato bi-cálcico, soja integral moída, calcário calcítico, farelo de soja, farinha de peixe, farelo de trigo, remoído de trigo.	100	95
<i>Agaricus blazei</i> desidratado em pó	---	5,0

*A composição qualitativa dessa ração foi fornecida pelo fabricante.

Quadro 4. Composição química das dietas utilizadas

Macronutriente	Labina	Labina suplementada com <i>A. blazei</i>	AIN-93G	AIN-93G suplementada com <i>A. blazei</i>
Carboidrato (% do VCT)	50,30	49,92	63,04	59,66
Proteína (% do VCT)	41,90	42,60	20,70	23,60
Lipídeos totais (% do VCT)	7,80	7,48	16,26	16,74
Densidade calórica (Kcal/ g de dieta)	2,18	2,21	2,99	2,93

* A composição nutricional da dieta AIN-93G foi calculada com base nas informações de REEVES *et al.*, 1993. Utilizou-se para o cálculo tabela de composição de alimentos de PHILIPPI (2002) e TACO (2006). A composição nutricional da ração comercial para roedores, Labina®- Purina, (Nestlé, Brasil) foi fornecida pelo fabricante.

4.3 Estratégia experimental

4.3.1 Parte I – Imunoestimulação pelo *Agaricus blazei*.

Trinta camundongos C57BL/6 machos, com 8 à 10 semanas de idade, foram utilizados no estudo e distribuídos conforme às análises realizadas. Os animais foram separados em 2 grupos: grupo *A.blazei* com suplementação dietética com *Agaricus blazei*, e grupo **Controle** não suplementados.

Para a eutanásia esses foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de 0,1ml de uma solução contendo 1,7mg do anestésico cloridrato de quetamina misturado a 0,33mg do relaxante muscular 2-(2,6-xilino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (xilazina) diluídos em tampão fisiológico. Após anestesia geral, os animais foram exsanguinados pelo plexo inguinal. O soro foi separado por centrifugação a 6500 rpm por 5 minutos, em centrífuga de mesa Fanem Centrimicro 243. As amostras de soro foram armazenadas à -80°C para as análises. Para o experimento de permeabilidade intestinal o sangue coletado foi diretamente analisado.

Retiramos também o intestino delgado, e então, esse foi limpo sobre um papel filtro para coleta das fezes que foram armazenadas à -80 °C. Amostras de intestino foram divididas em porções (duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo) e armazenado em freezer a -80°C.

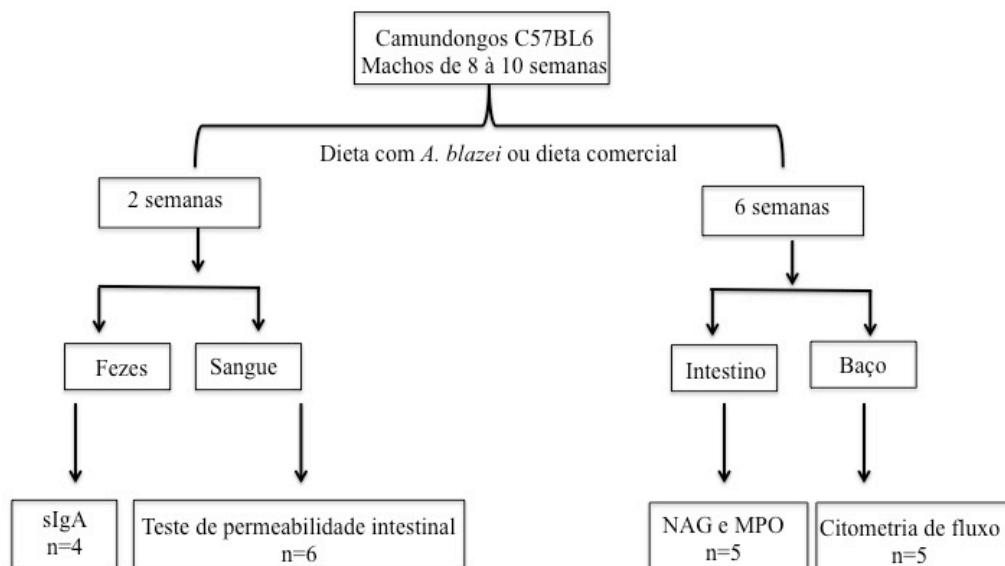


Figura 4: Esquema experimental – Imunoestimulação pelo *A. blazei*.

4.3.2 Parte II – *Agaricus blazei* na resposta inflamatória crônica da aterosclerose no camundongo apoE nocaute.

Quarenta e oito animais apoE^{-/-} machos, de seis a oito semanas de idade, foram separados em 2 grupos: apoE^{-/-} com suplementação dietética com *Agaricus blazei*, denominado **A.blazei** e apoE^{-/-} não suplementados, denominado grupo **Controle**. Os animais foram distribuídos de acordo com o peso inicial e níveis sanguíneos de colesterol total. O experimento com tratamento dietético decorreu por seis ou 12 semanas e ao final desse período os animais foram eutanasiados. Para a eutanásia esses foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de 0,1ml de uma solução contendo 1,7mg do anestésico cloridrato de quetamina misturado a 0,33mg do relaxante muscular 2-(2,6-xilino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (xilazina) diluídos em tampão fisiológico. Após anestesia geral, os animais foram exsanguinados pelo plexo inguinal. Foram coletados coração, aorta, intestino, pulmão e baço que foram armazenados à -80 °C. Para as análises de citometria de fluxo, baço e sangue foram prontamente preparados e analisados.

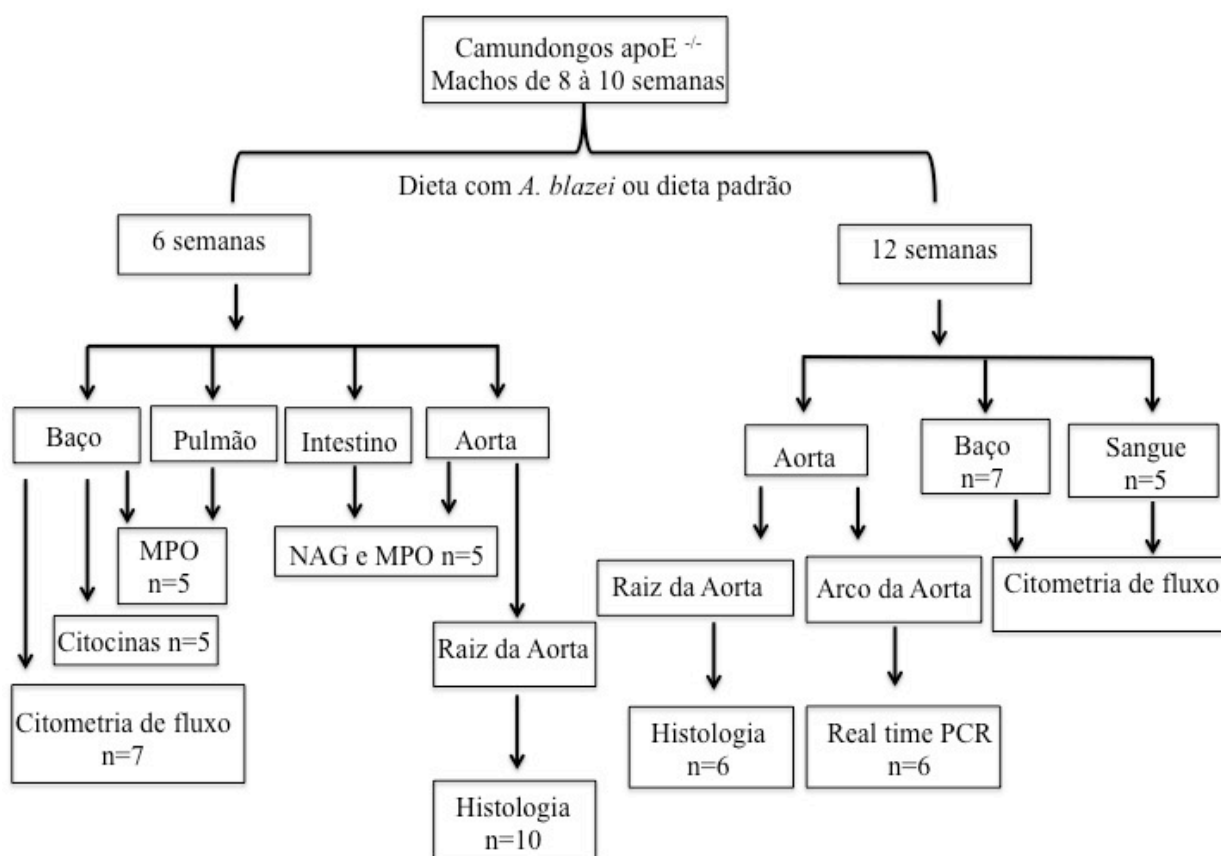


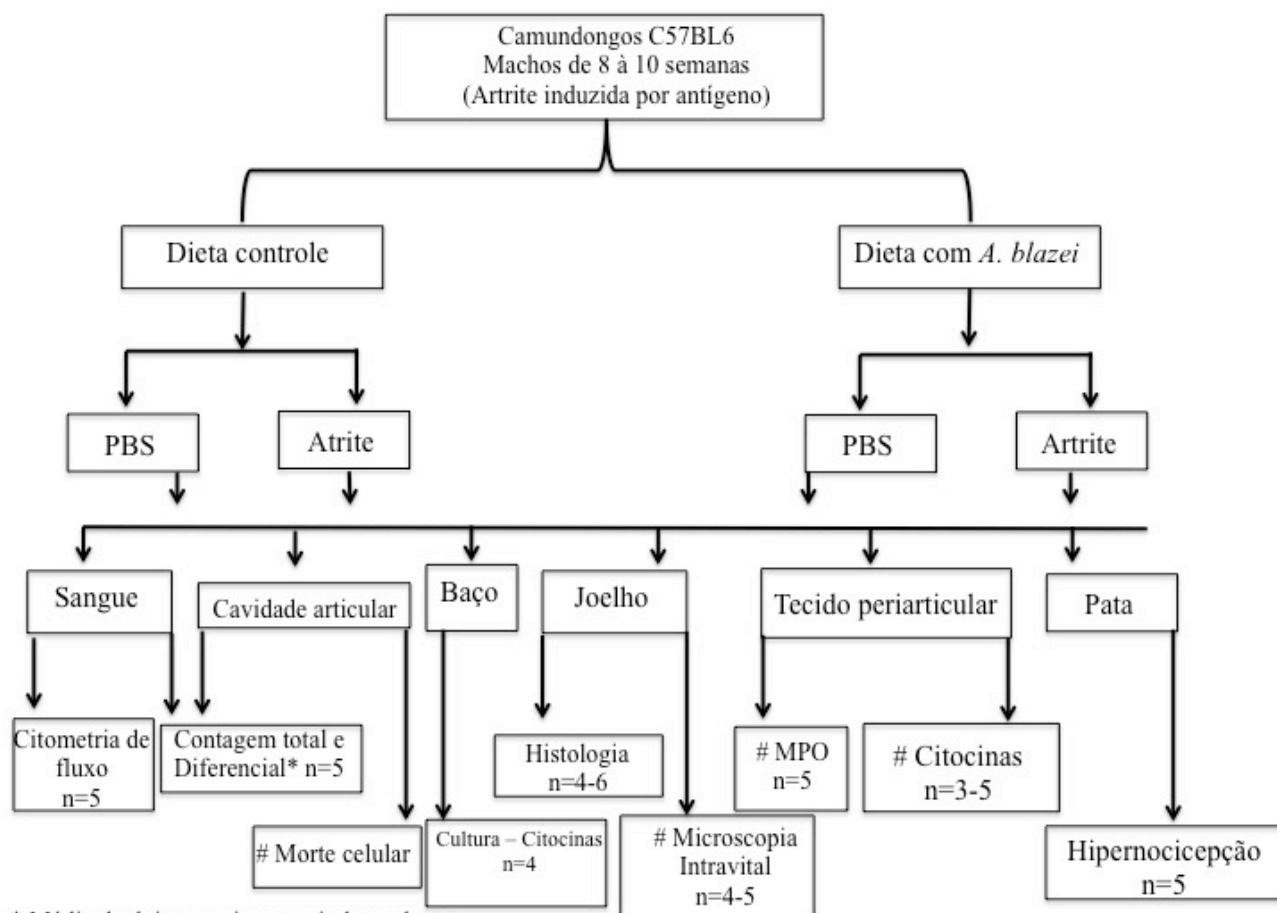
Figura 5: Esquema experimental – *A. blazei* na aterosclerose.

4.3.3 Parte III – *Agaricus blazei* na resposta inflamatória da artrite induzida por antígeno em camundongo (modelo agudo).

Para o estudo no modelo agudo de artrite, quarenta camundongos C57BL/6 machos, com 8 à 10 semanas de idade, foram utilizados no estudo e distribuídos conforme às análises realizadas. Os animais foram imunizados, através de injeção por via subcutânea (s.c.), com uma emulsão contendo 200µL de volumes iguais de PBS e adjuvante completo de Freud (CFA), na qual foi dissolvida 500 µg de mBSA. Após 7 dias da imunização, foram divididos em dois grupos: grupo *A.blazei* com suplementação na dieta comercial com *Agaricus blazei* (5%), e grupo **Controle** alimentados somente com dieta comercial. No 14º dia após a imunização com mBSA/CFA, cada grupo anterior foi novamente dividido em mais dois grupos: grupo **Artrite** desafiados com mBSA (10 µg/cavidade) através de injeção intra-articular (articulação fêmur-tibial) e grupo **PBS** que recebeu somente PBS através da injeção intra-articular. Dessa maneira, os quatro grupos experimentais foram denominados **PBS/Controle**; **PBS/*A.blazei***; **Artrite/Controle** e **Artrite/*A.blazei***. Após 24 horas do desafio, os animais passaram pelo teste de hipernocicepção, microscopia intravital e sofreram eutanásia para as demais análises.

Para a eutanásia esses foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de 0,1ml de uma solução contendo 1,7mg do anestésico cloridrato de quetamina misturado a 0,33mg do relaxante muscular 2-(2,6-xilino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (xilazina) diluídos em tampão fisiológico. Após anestesia geral, os animais foram exsanguinados pelo plexo inguinal. Os joelhos foram coletados para a histologia, o tecido periarticular para as dosagens de citocinas e o ensaio de MPO, o lavado da cavidade articular e o sangue para a contagem total e diferencial de leucócitos.

Para a análise de citometria de fluxo o sangue foi prontamente preparado e analisado. Para a análise de microscopia intravital, os animais foram desafiados nos dois joelhos e somente o joelho esquerdo foi analisado.



* Média de dois experimentos independentes.

não foram realizadas nos animais PBS ou PBS *A. blazei*

Figura 6: Esquema experimental – *A. blazei* na artrite.

4.4 Protocolos experimentais

4.4.1 Teste de permeabilidade intestinal

Os camundongos C57BL/6 previamente tratados com dieta suplementada com *A. blazei* ou dieta controle, por duas semanas, receberam 0,1mL de solução de DTPA marcado com 18,5 MBq de ^{99m}Tc por gavagem, para avaliação da permeabilidade intestinal. O padrão de dose que corresponde a alíquota de igual volume de ^{99m}Tc -DTPA oferecido aos animais foi utilizado para a determinação da radioatividade no mesmo tempo dos demais tubos. Os camundongos foram eutanasiados 6 horas após o procedimento supracitado, para a retirada de 500 μL de sangue a partir do plexo inguinal. O sangue foi posteriormente submetido à contagem da radioatividade. Os resultados obtidos foram comparados com o padrão da dose e calculados em percentual da dose de acordo com a seguinte fórmula: % dose = (CPM do sangue*100)/CPM do padrão de dose.

4.4.2 Determinação de IgA secretória

Os títulos de anticorpos nas fezes do camundongos C57BL/6 previamente tratados com dieta suplementada com *A. blazei* ou dieta controle, por duas semanas, foram medidos por ELISA. As placas de poliestireno foram incubadas com solução de tampão carbonato pH=9,6 contendo anticorpo de cabra anti-imunoglobulinas totais de camundongos (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por, no mínimo, 18 horas a 4°C. O bloqueio foi feito com uma solução de PBS-0,5% caseína por uma hora a temperatura ambiente (200 $\mu\text{l}/\text{poço}$). Posteriormente, as placas foram lavadas com solução salina-0,05%Tween por duas vezes. As amostras foram incubadas em diluição seriada (1:2) em PBS-0,5% caseína, durante uma hora a 37°C. Na sequência, as placas foram novamente lavadas. Anticorpos de cabra anti-IgA de camundongo conjugados com biotina (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) e diluídos (1:5000) em PBS – 0,5% caseína foram adicionados aos poços (100 $\mu\text{L}/\text{poço}$) durante uma hora a 37°C. As placas foram novamente lavadas e incubadas com uma solução de estreptavidina ligada à peroxidase (Sigma, St. Louis, Missouri) diluída 1:15000 vezes em PBS-0,5% caseína durante uma hora a 37°C. Finalmente, a revelação do complexo anticorpo-anticorpo-conjugado foi feito utilizando a H_2O_2 como substrato e orto fenilenediamina (OPD) como reagente de cor. Essa solução foi diluída em tampão citrato, adicionada à placa (100 $\mu\text{l}/\text{poço}$) e incubada por aproximadamente 20 minutos ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com solução de ácido sulfúrico (20 $\mu\text{l}/\text{poço}$) e a leitura realizada em leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader), em 492 nm.

4.4.3 Atividade da mieloperoxidase (MPO)

Para avaliar o acúmulo de neutrófilos foi utilizado o método de quantificação da atividade de MPO como descrito previamente ¹²¹. Em suma, o tecido foi pesado, ressuspendido em 5% salina EDTA (Buffer 1), submetido à homogeneização e centrifugação (10.000g, 10 minutos). O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspendido em 1,5 mL de NaCl 0.2% gelado e 1,5 mL de NaCl 1.6% com glicose 5% gelada para cada 100 mg de tecido. Realizou-se nova centrifugação 10.000g por 10 minutos. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em tampão fosfato com HETAB (Buffer 2) e re-homogenizado por 30 segundos. As amostras foram congeladas e descongeladas seguidamente (3 vezes) em nitrogênio líquido, submetidas novamente a centrifugação (10.000g, 15 minutos) e o sobrenadante coletado para ensaio de MPO. As amostras dos tecidos foram diluídas três vezes para o ensaio. Em seguida as amostras foram plaqueadas (25µl/poço) e a cada poço foi adicionado 25µl de tetramethylbenzine (TMB) a 1.6 mM. A placa foi posteriormente incubada a 37°C por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 100µl por poço de H₂O₂ (0,002%) e o término da reação foi dado com a adição de ácido sulfúrico 1M. A atividade da MPO das amostras foi detectada por colorimetria em um leitor de ELISA (450 nm). Os resultados foram expressos como absorbância em 450nm por 100 mg de tecido.

A análise da atividade de MPO foi realizada no intestino, baço, pulmão, aorta e tecido periarticular pertencente às partes I, II e III do presente trabalho.

4.4.4 Atividade da n-acetilglicosaminidase (NAG)

Porções do intestino, porções abdominais e torácicas da aorta foram retiradas para realização do ensaio de NAG, pesadas e ressuspendidas, na proporção de 1.9 ml de solução para cada 100mg de tecido, em solução salina 0,9% (4°C) contendo 0,1% v/v de Triton X-100 (Merck). Logo em seguida foram homogeneizadas em homogenizador de tecido e, então, centrifugadas a 4°C por 10 min a 1.500 g. Os sobrenadantes foram imediatamente recolhidos e utilizados para o ensaio de NAG.

A reação foi iniciada após a adição de 100 µL de *p*-nitrofenil-*N*-acetil-β-*D*-glicosaminidase (Sigma-Aldrich), dissolvida em tampão citrato/fosfato (pH 4.5), a uma concentração final de 2,24 mM, a 100 µL do sobrenadante recolhido após centrifugação do homogenato. A reação foi processada a 37°C por 10 min, em placas de 96 poços.

O término da reação foi dado pela adição de 100 µL de tampão glicina 0.2 M (pH 10,6) e quantificado em espectrofotômetro a 405 nm. O infiltrado de macrófagos foi calculado a partir de uma curva padrão da atividade de NAG expressa em aumento de absorbância a partir de

macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos, mediante injeção de uma solução de tioglicolato de sódio a 3%. O lavado peritoneal foi realizado após um tempo máximo de quatro dias pós-injeção. Os resultados foram expressos em número relativo de macrófagos.

4.4.5 Citometria de fluxo

Células isoladas dos órgãos (1×10^6) foram plaqueadas e em seguida, adicionados 25 μ l por poço do coquetel de anticorpos monoclonais anti-marcadores fenotípicos conjugados com FITC (fluoresceína), PE (ficoeritrina), Pe-Cy5 ou Alexa-488. Os anticorpos utilizados estão relacionados na tabela abaixo. As células foram incubadas por 30 minutos a 4°C, no escuro. Posteriormente, as células foram lavadas com 100 μ l por poço de PBS-BSA- NaN_3 e centrifugadas a 1200 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e, então, o procedimento de lavagem foi novamente repetido. Posteriormente, as células marcadas com anticorpo biotina foram submetidas a uma nova incubação com estreptavidina e lavadas conforme descrito. Finalmente, as células marcadas foram ressuspensas em 200 μ l de solução fixadora (0,5% de formaldeído em PBS1X) e mantidas a 4°C, no escuro até o dia seguinte. A leitura foi feita usando o FACScan (Beckton Dickinson, Mountain View, Califórnia). Leu-se 30.000 eventos totais para as análises.

Quadro 5: Anticorpos utilizados

Fenótipo provável	FITC	PE	PE-Cy5.5	Alexa 488	BBiotina	Streptavidina
NK (Parte II -6 semanas)	CD49b/Pan NK	x	x	x	x	x
NKT (Parte II -6 semanas)	CD49b/Pan NK	CD3	x	x	x	x
NK (Parte II -12 semanas)	NK1.1	x	x	x	x	x
NKT (Parte II -12 semanas)	NK1.1	CD3	x	x	x	x
L. T auxiliar ativado (Parte II -6 semanas)	CD4	CD44	x	x	x	x
L. T citotóxico (Parte II -6 semanas)	x	CD8	x	x	x	x
L. T duplo positivo (Parte II -6 semanas)	CD4	CD8	x	x	x	x
Linfócitos B (Parte II -6 semanas)	x	CD19	x	x	x	x
Fagócitos (Parte II -6 semanas)	CD11b	CD11c	x	x	x	X
Monócitos/macrófagos (Parte II -6 semanas)	CD11b	CD86	x	x	x	x
Neutrófilos (Parte II - 12 semanas)	x	CXCR2	x	Ly-6G (Gr-1)	x	x
Neutrófilos (Parte III)	CXCR2	TLR2	Streptavidina	x	Ly-6G(Gr-1)	x
Monócitos/macrófagos (Parte II -12 semanas)	CD11b	CD86	F4/80	x	x	x
Monócitos/macrófagos (Parte II -12 semanas)	CD11b	CD54	x	x	x	x

4.4.5.1 Análise da citometria de fluxo

A análise da citometria de fluxo foi feita no programa FlowJo®, versão 8.7 (Tree Star, Inc. 1997-2009). Inicialmente, a região de células linfóides ou de células mielóides foi delimitada por tamanho e granulosidade (FSC-H X SSC-H). Dentro dessas regiões, selecionamos a região positiva de células linfóides marcados com CD4⁺, CD4⁺CD44⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD49b ou NK1.1; CD49b ou NK1.1 e CD3⁺ (duplo positivas). Selecionamos também a região positiva de células mielóides

CD11b⁺CD86⁺; CD11b⁺CD11c⁺; CD11b⁺CD11c⁻; CD86⁺F4/80⁺ (duplo positivas); Ly-6G (Gr-1)⁺. Para as análises de expressão das moléculas de superfície, foi avaliada a intensidade média de fluorescência (IMF) de CD54, CXCR2, TLR2 e CD86 dentro das populações positivas de interesse citadas anteriormente. *Dot plots* representativos das estratégias de análise estão ilustrados nas figuras a seguir.

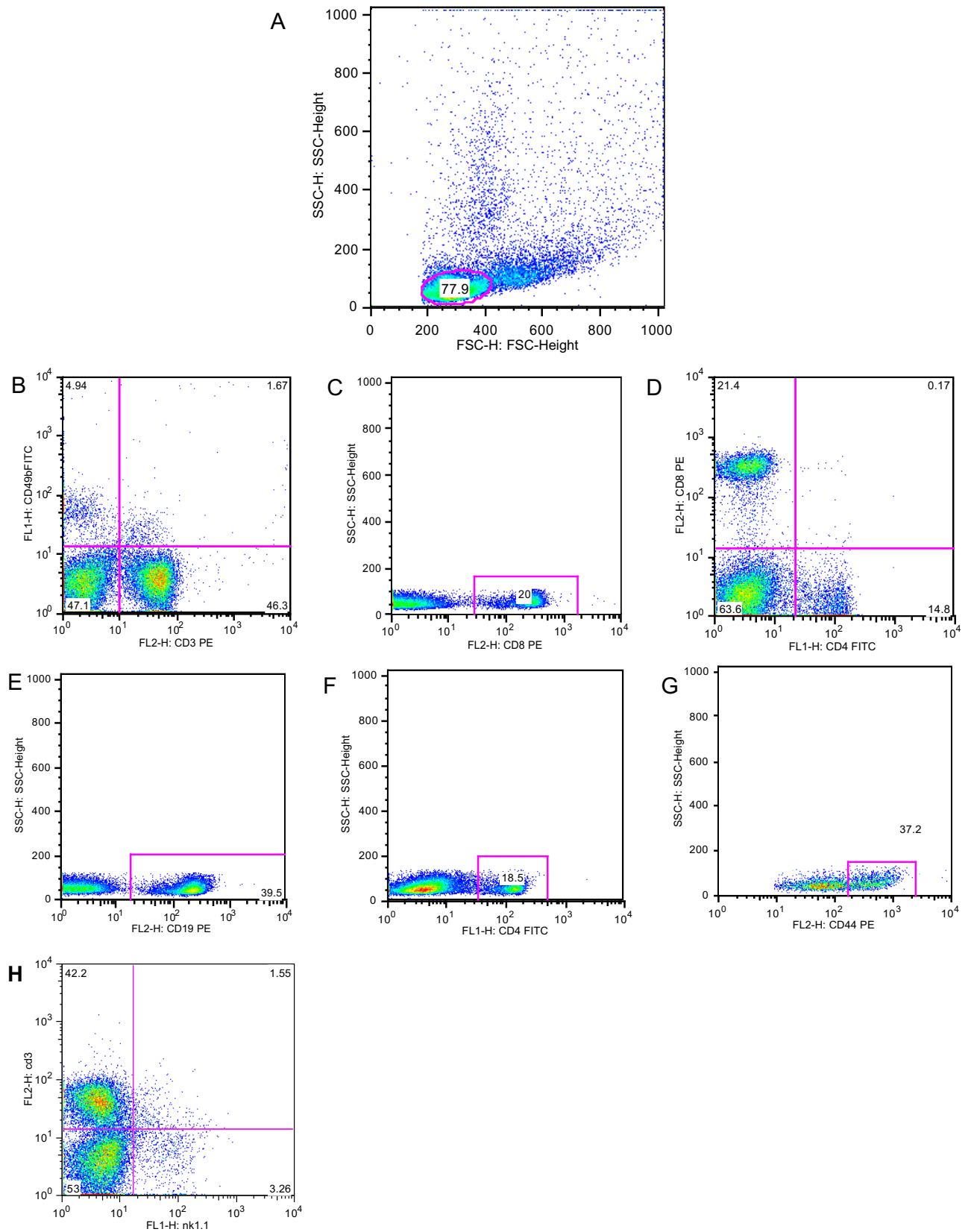


Figura 7: Estratégia de análise de células linfóides por citometria de fluxo.

Análise realizada no programa FlowJo®. A- Perfil celular de tamanho e granulosidade (FSC vs SSC) onde foi selecionada a região correspondente à população de células linfóides e posteriormente as células B- CD49b⁺ e CD49b⁺ CD3⁺; C- CD8⁺; D- CD8⁺CD4⁺; E- CD19⁺; F- CD4⁺; G- CD4⁺CD44⁺; H- NK1.1⁺ e NK1.1⁺CD3⁺.

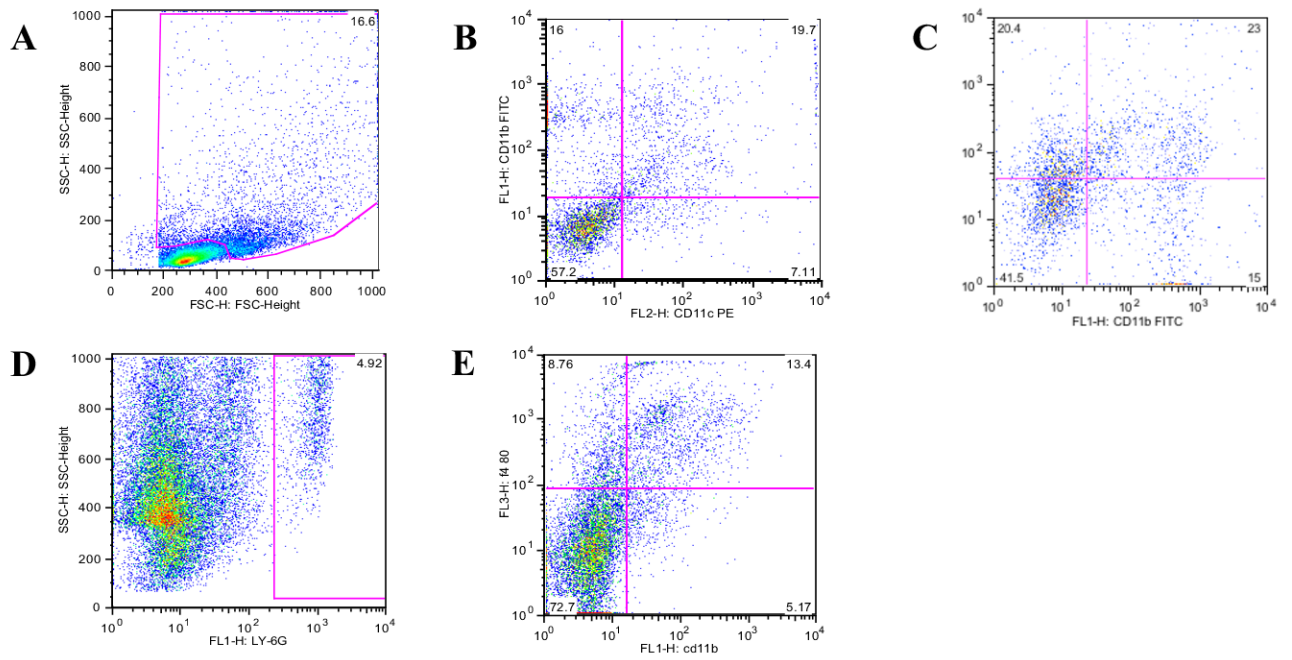


Figura 8: Estratégia de análise de células mielóides por citometria de fluxo.

Análise realizada no programa FlowJo®. **A-** Perfil celular de tamanho e granulosidade (FSC vs SSC) onde foi selecionada a região correspondente à população de células mielóides e posteriormente as células **B-** CD11b⁺ CD11c⁻; **C-** CD11b⁺ CD86⁺; **D-** Ly-6G (Gr1)⁺, **E-** F4/80⁺ CD11b⁺;

4.4.6 Histologia das lesões ateroscleróticas

A lesão aterosclerótica dos animais apoE nocautes foi avaliada na raiz aórtica, região com presença da válvula aórtica. Os procedimentos foram realizados como descrito anteriormente ¹²². Após eutanásia, o sistema arterial foi lavado em PBS e feita a perfusão com formalina 10% gelada. O coração foi separado da raiz aórtica e incluído em OCT (Tissue-Tek), sendo a aorta congelada à -80°C para análises posteriores. Para análise da lesão na raiz da aorta, cortes seriados congelados do coração (5mm) foram coletados ao longo do sinus aórtico (400mm), corados por hematoxilina e eosina ou tricômio de gomori, para a visualização da área de colágeno, e digitalizados. A área da lesão foi quantificada por meio do *software* Image Pro Plus e expressa pela soma das placas ateroscleróticas ao longo da raiz aórtica, sendo a área total da lesão calculada pela soma das áreas obtidas em 10 cortes. Para a análise do colágeno extracelular presente nas lesões ateroscleróticas foram analisados 4 cortes não consecutivos por animal ¹²³ e os resultados foram expressos como porcentagem de colágeno pela área de lesão.

4.4.7 Determinação de citocinas por ELISA

O tecido periarticular do joelho, o homogenato do baço e o sobrenadante da cultura dos esplenócitos, pertencentes às partes II e III do presente trabalho, foram coletados para realização do ensaio de ELISA. Para isso, aos tecidos previamente pesados foi colocada a solução de extração de citocinas (1mL da para cada 100mg de tecido). Os tecidos foram homogeneizados e posteriormente centrifugados (10.000g, 10 minutos, 4°C). Os sobrenadantes dos tecidos e o sobrenadante da cultura de esplenócitos, foram coletados para o ensaio de ELISA. Os kits para ELISA de camundongo para TNF- α , IFN- γ , CXCL-1, CXCL-2, IL-10, IL-1 β foram obtidos da R&D Systems (DuoSet) e utilizados de acordo com os procedimentos previamente descritos pelo fabricante.

Brevemente, as concentrações das citocina e quimiocinas foram diluídas 1:3 em PBS:BSA1%. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 100 μ l/poço de uma solução contendo concentração adequada do anticorpo captura específico. Essa solução permaneceu em contato com a placa durante 18 h a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas (4 vezes) com tampão de lavagem (PBS/Tween 0,1%). Logo após, foram adicionados 200 μ l/poço da solução de bloqueio contendo 1% de albumina de soro bovino em PBS. O tempo de bloqueio foi de no mínimo 1 hora. Em seguida, foram adicionados os padrões de citocinas e quimiocinas, em concentração conhecida, e as amostras (50 μ l/ poço). Dezoito horas após a incubação a 4°C, as placas foram lavadas, sendo adicionados 100 μ l de uma solução de anticorpo de detecção, seguida de incubação de 1 h. Transcorrido esse período e após lavagem, foi adicionado à placa uma solução contendo

estreptavidina ligada à peroxidase R&D Systems (DuoSet). Após 30 min, a placa foi novamente lavada, sendo adicionado o tampão substrato contendo o-fenilenodiamina (OPD, Sigma) e H₂O₂ (Merck). A reação foi parada com ácido sulfúrico 1M. O produto de oxidação do OPD foi detectado por colorimetria em um leitor de placas de ELISA no comprimento de onda de 492 nm.

4.4.8 Real time PCR

4.4.8.1 Extração do RNA

As amostras do arco aórtico, processados sem a camada adventícia foram homogeneizadas em 0,5 mL de TRIZOL (Gibco BRL, Rockville, MD) utilizando-se um homogeneizador elétrico, conforme instrução do fabricante. As amostras homogeneizadas foram incubadas por 5 a 10 min a uma temperatura de 15° a 30° C, para permitir a completa dissociação de complexos nucleoprotéicos. Em seguida, foram adicionados 100 µl de Clorofórmio de alta qualidade para cada 0,5 mL de TRIZOL. Foi realizada agitação em *vortex* e depois incubação por 3 min de 15° a 30° C. O homogenato foi centrifugado a 12.000 x g por 15 min a 2 a 8° C. Após a centrifugação, a mistura ficou separada em uma fase inferior (rosa), contendo fenol-clorofórmio, uma fase intermediária e uma fase aquosa transparente superior. O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa que foi transferida para um microtubo novo. O RNA foi precipitado com isopropanol (MERCK) de altíssima qualidade (250µl de isopropanol para cada 0,5ml de TRIZOL). As amostras foram incubadas por 10 min a 15 a 30°C e então centrifugadas a 12.000 x g por 10 min a 2 a 8°C e então formou-se um pequeno sedimento branco. Após descarte do sobrenadante, foi adicionado 0,5 ml de etanol 75% (diluído em água tratada com DEPC) para 0,5ml de TRIZOL. O tubo foi agitado no *vortex* para que o sedimento se soltasse do fundo. Então, foi realizada nova centrifugação a 7.500 x g (10.000 rpm) por 5 min a 2 a 8° C. Após descarte do sobrenadante, o tubo foi deixado aberto por 5 minutos para secagem do sedimento que, em seguida, foi diluído em água de alta qualidade tratada com DEPC, em volume suficiente para diluir toda a amostra. O RNA foi estocado a -80° C.

4.4.8.2 Quantificação do RNA

A quantificação das amostras de RNA foi realizada no espectrofotômetro NanoDrop ND1000 (Nano Drop Technologies, Wilmington, DE, EUA). Primeiramente, foi feita a calibração do aparelho com água de alta qualidade tratada com DEPC e, em seguida, foi selecionada a opção de leitura de RNA já definida no aparelho. A leitura do branco também foi feita com água tratada com DEPC. O RNA foi quantificado pela absorção a 260nm utilizando-se 2ml da amostra pura. O aparelho forneceu a concentração em ng/mL e a correlação 260/280 (RNA/proteínas).

4.4.8.3 Preparo do cDNA por Transcrição Reversa

A reação de transcrição reversa do mRNA dos tecidos animais foi realizada utilizando-se 2,0 µg de RNA aos quais foram adicionados 50µM do primer Oligo dT (15) (Promega Cor., Madison WI, EUA). Foi feita uma incubação por 5 minutos a 70°C e em seguida por 5 minutos no gelo para permitir a separação das fitas de RNA e o anelamento do *primer* e para impedir a formação de artefatos inespecíficos, respectivamente. Em seguida, foi adicionada uma mistura de reagentes em um volume de 14,5µl contendo 1,5µl de dNTPs a 100 mM (Promega Cor., Madison, WI, EUA) , 4 µl tampão M-MLV 5X (Promega Cor., Madison WI, EUA) e 200 U da enzima Transcriptase reversa-M-MLV (Promega Cor., Madison WI, EUA) e 8,5µl de água Milli-Q autoclavada. A mistura foi incubada por 2 horas a 42°C para que ocorresse a transcrição reversa do mRNA. As amostras de cDNA foram conservadas a -20°C.

4.4.8.4 PCR específica

Para as reações subseqüentes de amplificação, 5µl da amostra de cDNA foi utilizada. A PCR foi realizada em um volume final de 20µl contendo 10µL de Power SYBR Green PCR Master Mix 2X (Applied biosystems, Foster City, CA, EUA), 1,5µl de primer senso a 5µM, 1,5µl de primer anti-senso a 5µM e 2µl de água Milli-Q. A reação foi realizada utilizando-se o protocolo para PCR com SYBR Green do termociclador Step One PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Em resumo, foi feita uma incubação inicial de 1 minuto a 95°C e, em seguida, 15 segundos a 95°C para desnaturação, 1 minuto para anelamento e extensão a 60°C. Esses dois últimos passos foram repetidos 40 vezes e depois foi feita a curva de *melting*: 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e uma rampa de subida lenta de temperatura até 95 °C. Os resultados foram obtidos com auxílio do software Step One PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os dados foram analisados utilizando-se a seguinte fórmula: $\Delta Ct = Ct \text{ do gene alvo} - Ct \text{ do gene constitutivo do camundongo (18S)}$. Foram utilizados iniciadores específicos para os genes de interesse dos receptores *scavengers* SRA-1, SRA-2 e CD36, do receptor do tipo Toll-4, da molécula de adesão VCAM-1, das enzimas MMP-9 e iNOS e das quimiocinas CCL-2 e CXCL-1.

4.4.9 Avaliação da migração de neutrófilos para a cavidade articular

Para avaliar a migração de neutrófilos para a cavidade articular, foi realizado um lavado intra-articular. Este procedimento consistiu em injetar 20µL de uma solução de albumina bovina

3% na cavidade articular, lavando-a três vezes para que uma amostra das células presentes no interior da cavidade fosse coletada juntamente com a solução de albumina recapturada com uma pipeta. Este lavado de células da cavidade articular foi diluído em 180 µL de albumina bovina 3% para a posterior contagem total e diferencial dos leucócitos.

4.4.10 Contagem total dos leucócitos

Alíquotas de 30µL do lavado articular ou de sangue foram diluídas em 60µL de solução Turk, sendo a contagem total dos leucócitos realizada em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico (aumento de 100x) e contador manual. O número total de leucócitos foi utilizado para cálculo da percentagem dos diferentes leucócitos após a contagem em lâminas preparadas por citocentrifugação (citospin; Shandon Lipshaw Inc., Pittsburgh, Pennsylvania, USA) e de esfregaço sanguíneo.

4.4.11 Contagem diferencial dos leucócitos

As lâminas para contagem diferencial foram preparadas por citocentrifugação de uma alíquota de 70µL do lavado articular (citospin; Shandon Lipshaw Inc., Pittsburgh, Pennsylvania, USA) ou esfregaço sanguíneo. As lâminas foram coradas segundo a técnica de coloração de May-Grumwald e giemsa. As células foram examinadas em microscópio óptico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 1.000x) usando os critérios morfológicos padrões para diferenciar os tipos celulares. Os resultados foram expressos como número de leucócitos totais, neutrófilos e células mononucleares por cavidade articular ou circulantes.

4.4.12 Avaliação da morte celular no lavado da cavidade articular

Foram preparadas suspensões de células dos animais com artrite, na concentração de 2×10^5 células/ml, por citocentrifugação (citospin; Shandon Lipshaw Inc., Pittsburgh, Pennsylvania, USA) e delimitadas usando caneta de parafina (Pen Pap super, PELCO). As células foram fixadas com 1,0 ml de paraformaldeído 4% em tampão fosfato por 15 min a 37°C. Depois de fixadas, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e foi adicionado 1,0 ml de etanol 70% (vol/vol) a 4°C por 4 horas. Por fim, para a marcação com Laranja de Acridina (Invitrogen cod. A3568), foi adicionado, por lâmina, 370µl de HCl 0,1M em 148µl de PBS, e depois de 30 a 45 segundos, foi adicionado 1ml de solução de laranja de acridina (5µg/ml de Laranja de Acridina, 0,1M de ácido acético e 0,2M de Na₂HPO₄ pH 2,6) por 5 min no escuro. Em seguida, as lâminas foram lavadas 3 vezes com 1ml de

PBS, montadas e levadas ao microscópio confocal (Carl Zeiss LSM 510 META, St. Louis, Missouri, EUA).

Para a excitação do marcador, foi usado filtro de 488nm, sendo que para a captura das imagens foram utilizados filtros de referência de 525nm e 650nm. As imagens captadas por esses dois filtros foram sobrepostas e a avaliação das células vivas e mortas foi feita pela predominância da marcação ou a existência de uma única marcação (525nm ou 650nm), contadas 100 células no total por lâmina. Durante a análise foram utilizadas as objetivas de 40x e de 63x. Os resultados foram expressos como percentual de células mortas.

4.4.13 Teste de pressão crescente na pata de camundongo

Os experimentos foram realizados utilizando o teste de pressão com um anesthesiômetro eletrônico (Insight Equipamentos, São Paulo, Brazil), que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). A precisão do aparelho é de 0,1 g. O aparelho é calibrado para registrar uma força máxima de 150 g, mantendo a precisão de 0,1 g até a força de 80 g. O contato do transdutor de pressão à pata é realizado através de uma ponteira descartável de polipropileno com 0,5 ou 4,15 mm² de diâmetro adaptada a esse. Os animais são colocados em caixas de acrílico, medindo 12 x 10 x 17 cm cujo assoalho é uma rede de malha igual a 5 mm² constituída de arame não maleável de 1 mm de espessura, durante 15 minutos antes do experimento para adaptação ao ambiente. Espelhos são posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a visualização das plantas das patas dos animais. O experimentador deve aplicar, por entre as malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do camundongo até que o animal produza uma resposta caracterizada como sacudida (“flinch”) da pata estimulada. Os estímulos são repetidos por até seis vezes, em geral até o animal apresentar 3 medidas similares com uma clara resposta de “flinch” após a retirada da pata. A intensidade de hipernocicepção foi quantificada como a variação na pressão (Δ de reação em gramas) obtida subtraindo-se a média de três valores expressos em gramas (força) observados antes do procedimento experimental (0 hora) da média de três valores em gramas (força) após a administração dos estímulos que variaram conforme o protocolo experimental. Os testes nociceptivos foram realizados entre 08:00 e 16:00 h. Todos os experimentos seguiram as normas e éticas estabelecidas para experimentação com animais conscientes, recomendadas pela *IASP (International Association for the Study of Pain)*.

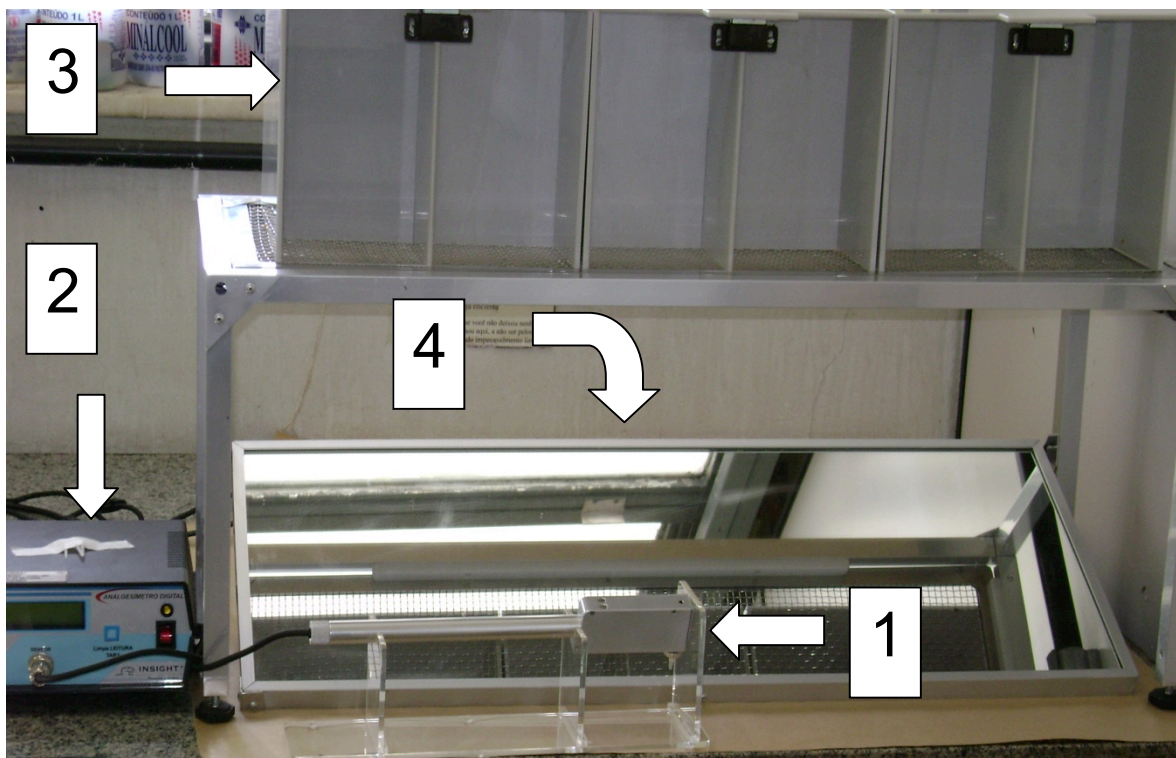


Figura 9: Foto do equipamento utilizado no teste de pressão crescente na pata de camundongo.

A foto apresenta o anestesímetro eletrônico (Insight Equipamentos, São paulo, Brazil), constituído por transdutor de pressão (1) conectado a um contador digital de força (2), as caixas de acrílico (12 x 10 x 17 cm de altura) e os espelhos inclinados (4), abaixo do assoalho que forneceu uma vista desobstruída das patas traseiras dos animais, utilizados no teste de pressão crescente no joelho de camundongos.

Fotografia gentilmente cedida por Fernanda Matos Coelho.

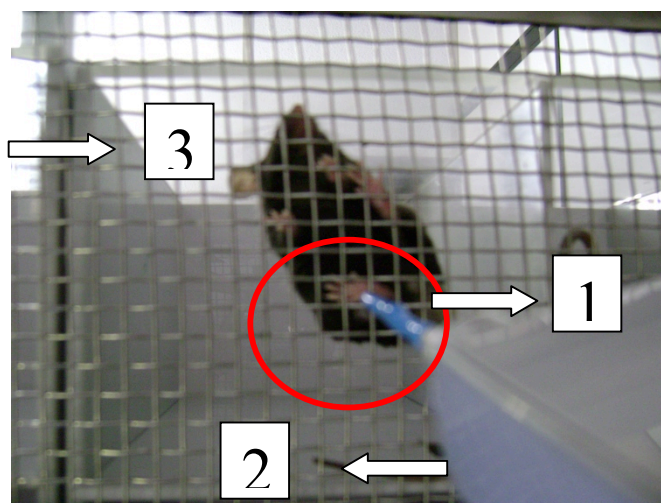


Figura 10: Foto no momento do teste de pressão crescente na pata de camundongo.

A foto apresenta a ponteira de polipropileno (1) acoplada ao transdutor de força (2) em contato com a pata do animal (círculo vermelho). O experimentador deve aplicar, por entre as malhas da rede do assoalho (3), uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata até que o animal produza uma resposta caracterizada como “sacudida” (“flinch”).

Fotografia gentilmente cedida por Fernanda Matos Coelho.

4.4.14 Análise histopatológica da articulação do joelho

A articulação fêmur-tibial dos camundongos foi removida cirurgicamente e dissecada, mantendo-se o invólucro muscular. Os espécimes obtidos foram fixados em formol 10% tamponado, durante 24 horas. Inicialmente, as amostras foram lavadas em água corrente e desmineralizadas em solução de EDTA 10%, pH 7.2, em temperatura ambiente, por um período de três semanas (a solução era renovada a cada 3 dias). Em seguida, as peças foram novamente lavadas em água corrente, desidratadas em banhos de álcool 70%, 80%, 90% e 100%; diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. O material foi seccionado em micrótomo RM2125RT (Leica, Heerbrugg, St. Gallen, Switzerland), obtendo-se cortes consecutivos de 5 µm, que foram corados pela técnica da Hematoxilina & Eosina (HE). Foi realizada uma avaliação qualitativa da presença de hiperplasia sinovial, exsudato celular e erosão de cartilagem e/ou dos ossos e extensão do infiltrado sinovial.

4.4.14.1 Quantificação da perda de proteoglicanos

Seções (5 µm) da articulação tibio-társica dos camundongos foram coradas com azul de toluidina (AT) a fim de estimar o conteúdo de proteoglicanos presente na articulação, conforme descrito previamente por Bolon et al. (2004) e Urech et al. (2010). Os cortes foram deparafinizados em xilol e hidratados com água. A coloração de AT foi realizada com uma solução contendo 1 % AT (Synth, Diadema, SP, Brasil), diluído em tampão fosfato (pH 5,7) durante 2 minutos. Em seguida, os cortes foram rapidamente desidratados em etanol 96% e acetona (p.a.), lavados em PBS 1x por um minuto, imersos em xileno e montados.

Após os procedimentos de histoquímica, imagens da superfície articular de cada amostra foram digitalizadas (aumento de 100x) para avaliação da cartilagem. A área da cartilagem que apresentava positividade para AT foi obtida a partir da seleção dos pixels corados correspondentes à AT, seguido pela criação de uma imagem binária, usando o software Image J (National Institutes of Health) da mesma forma, a área total de cartilagem foi calculada a partir da seleção dos pixels totais. Assim, o conteúdo de proteoglicano foi apresentado como o percentual da área de coloração AT-positiva em relação à área total da superfície da cartilagem.

4.4.15 Microscopia intravital na microvasculatura do joelho

A técnica de microscopia intravital foi utilizada com o intuito de visualizar o recrutamento de leucócitos através do endotélio da microvasculatura do joelho de camundongos. Os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina (10mg/kg, Rompun[®], Bayer) e cetamina S+

(200mg/kg, Cristália, SP) e PBS injetada via intraperitoneal (i.p.). A veia da cauda foi canulada para administração de substância fluorescente, Rodamina 6G, reagentes experimentais e volume adicional de anestésico. Para a visualização dos vasos sanguíneos na região do joelho, foi realizada uma ressecção do tendão patelar. Para a avaliação do processo de recrutamento de leucócitos nos vasos do joelho, os animais receberam, inicialmente, uma injeção por via intravenosa de Rodamina 6G (0,3 mg/kg) para marcação dos leucócitos. A Rodamina 6G foi utilizada por sua capacidade de marcar leucócitos, permitindo a visualização destes numa elevada velocidade de fluxo sanguíneo. Um microscópio (Olympus BX40) com objetiva de 20X, foi utilizado para observar os eventos de rolamento e adesão celular na parede dos vasos. Uma câmera de vídeo (Optronics) instalada ao microscópio projetava a imagem em um computador e as imagens eram, então, gravadas para posterior contagem do número de leucócitos em rolamento e aderidos ao longo da parede dos vasos. Foram considerados aderidos os leucócitos que permaneceram estacionados no endotélio vascular por um período mínimo de 30 segundos, e esta adesão foi quantificada pelo número total de células aderentes em 100µm de comprimento da vênula. O rolamento foi considerado para os leucócitos que migravam da região central para a margem do vaso e se moviam a uma velocidade menor que a velocidade dos eritrócitos. Os resultados de rolamento e adesão foram expressos como número de células/min e número de células/100µm, respectivamente.

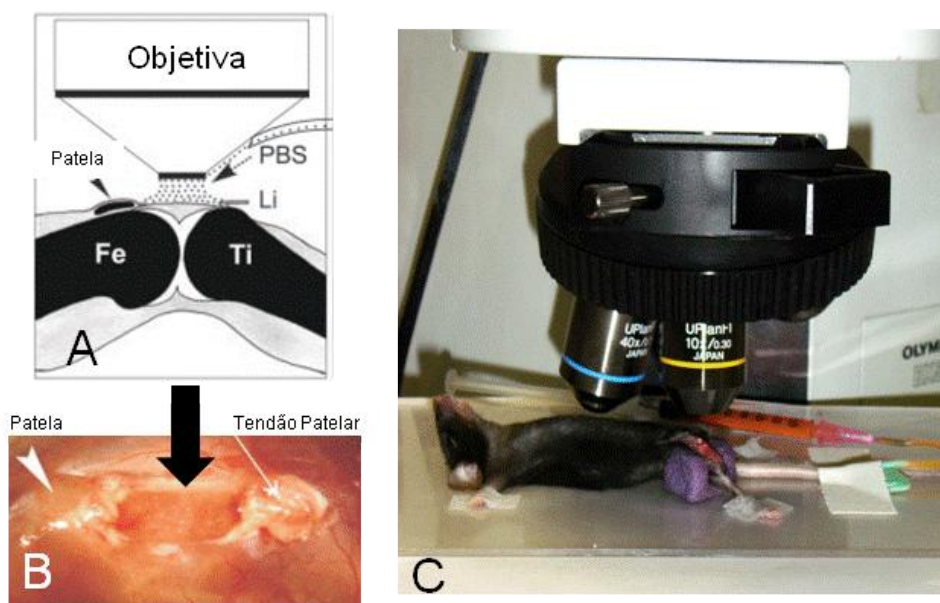


Figura 11: Foto da microscopia intravital da microvasculatura do joelho.

A- Representação esquemática da preparação da articulação fêmur-tibial sob a objetiva. Fe, fêmur; Ti, tibia; Li, lamínula; PBS, solução de tampão fosfato; **B-** Foto da região visualizada na microscopia intravital (seta preta); **C-** Foto da articulação fêmur-tibial sob microscopia.

Fotografia gentilmente cedida por Fernanda Matos Coelho.

4.4.16 Cultura de esplenócitos e ensaios de dosagem de citocinas

Após a retirada do baço dos animais, esses foram macerados em ambiente estéril e suspendidos em 5ml de meio RPMI incompleto. Após separação das alíquotas para quantificação das células foram então centrifugados a 800 x g por 20 minutos a 4°C e suspendidos em 3ml de uma solução de lise de hemácias (Tris-HCl 17mM e NH₄Cl 144mM) durante 4 minutos a 4°C. A reação de lise foi interrompida por diluição da solução em meio RPMI (Sigma) incompleto (7ml) e as amostras foram novamente centrifugadas a 800 x g por 20 minutos a 4°C. Após esse procedimento, as células foram suspendidas em RPMI completo e mantidas a 4°C. As células foram então contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade celular observada pelo uso do corante azul de tripan sendo aceito um valor superior 98% de sobrevivência.

As preparações de cultura de esplenócitos (5×10^6 células/ml) foram plaqueadas em placas de 24 poços (Nunc, Nunclon). As células foram incubadas em RPMI completo apenas (controle negativo) ou foram estimuladas com mBSA (100µg/ml ou 300 µg/ml) em estufa a 5% CO₂, por 48h, em 37°C. Os níveis das citocinas IFN-γ, IL-10 e TNF-α, foram quantificados no sobrenadante das culturas usando-se kits apropriados de dosagem de citocinas (BD OptEIA™) seguindo as recomendações do fabricante conforme descrito anteriormente.

4.4.17 Análises Estatísticas

Após a aplicação do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov pelo programa GraphPad Prism® versão 5.0 para Windows (São Diego, Califórnia EUA) e verificação da simetria dos dados, foi realizada a comparação das médias entre dois grupos, utilizando-se o teste T de *Student*, ou comparação das medianas utilizando-se o teste de *Mann-Whitney*. Para análises de mais de dois grupos, as médias foram comparadas por análise de variância, *One-Way*, com pós teste de Newman-Keuls e as medianas foram comparadas por teste de Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunns. Foi considerado um nível de significância de 5%. Os dados foram expressos em média ± erro padrão ou mediana ± variação. Os dados apresentados estão limitados ao menor valor necessário, por razões éticas na experimentação animal.

5. RESULTADOS

5.1 Parte I - Imunoestimulação com *Agaricus Blazei*

5.1.1 *Agaricus blazei* estimula elementos da resposta imune inata e adaptativa sem provocar perda da função de barreira no intestino.

O intestino e parâmetros associados, foram analisados com o intuito de tentar esclarecer se o estímulo imunológico gerado pelo *A. blazei*, afeta primariamente, o tecido linfóide associado à mucosa intestinal (GALT), pelo fato do *A. blazei* ser oferecido por via oral.

Parâmetros que contribuem para os mecanismos de homeostase da mucosa, como sIgA e a permeabilidade intestinal, foram analisados¹²⁴. Não houve alteração na detecção sanguínea de ^{99m}Tc-DTPA, macromolécula usada para avaliar a permeabilidade intestinal, após duas semanas de tratamento dietético com *A. blazei* (**Figura 12 A**). No entanto, houve aumento da secreção de IgA, após o mesmo período de tratamento (**Figura 12 B**). As atividades de NAG e MPO também foram avaliadas, como indicadores da ativação de macrófagos e neutrófilos em um diferente tempo de tratamento (após 6 semanas) com *A. blazei*. Os resultados mostram que o *A. blazei* não modifica a atividade de macrófagos em nenhuma das porções do intestino delgado (**Figura 12 C**), diferentemente, foi detectado no íleo dos animais que receberam o fungo, um aumento da atividade de neutrófilos (**Figura 12 D**).

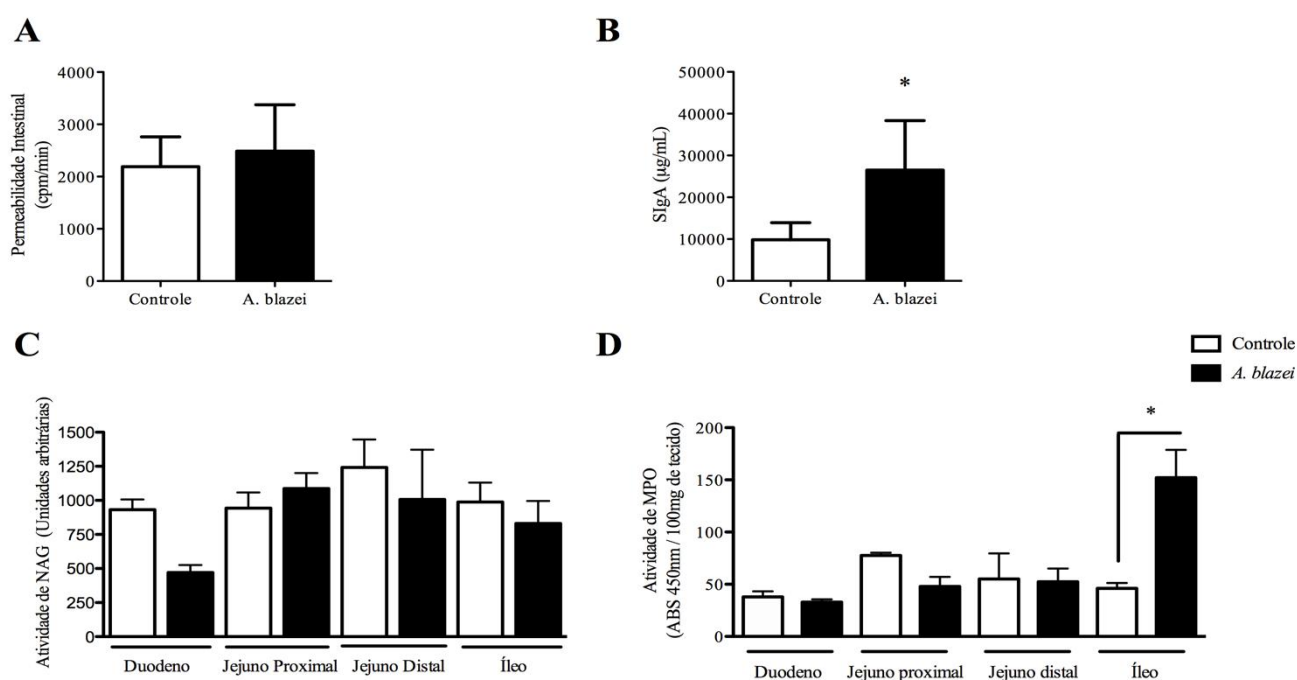


Figura 12: Homeostase intestinal e ativação de células inatas em camundongos C57BL/6.

A- Permeabilidade intestinal, n=6 **B-** Secreção de IgA na mucosa intestinal, n=4. **C-** Atividade de NAG nas porções do intestino delgado, n=5. **D-** Atividade de MPO nas porções do intestino delgado, n=5. **A, C e D** - Barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão. **B-** Barras representam a mediana e a variação. * p<0.05.

5.1.2 *Agaricus blazei* aumenta o percentual de linfócitos CD4⁺CD8⁺ duplo positivos, células CD4⁺CD44^{high} e a frequência de células CD49b⁺CD3⁺ (NKT) no baço.

O baço é um centro corporal de regulação imune, metabólica e endócrina. A função imune do baço é entendida como a mais importante função desse órgão e geralmente, reflete alterações inflamatórias sistêmicas¹²⁵. Com o propósito de avaliar possíveis alterações sistêmicas desencadeadas pelo *A. blazei*, avaliamos o perfil de algumas células da imunidade inata e adaptativa nesse órgão. Nossos dados mostram um aumento na frequência de células CD49b⁺CD3⁺ (**Figura 13 C**) e uma tendência ao aumento da expressão da molécula co-estimuladora CD86 em células CD11b⁺CD11c⁻ (p=0.09) (**Figura 13 B**). Quanto, aos linfócitos, observamos aumento do percentual de linfócitos CD4⁺CD8⁺ duplo positivos, como também um aumento do percentual de células CD4⁺CD44^{high} no baço (**Figura 14 B e D**). O CD44⁺ é uma glicoproteína de superfície celular envolvida na interação célula-célula, na migração e adesão celular¹²⁶. O *A. blazei* não modificou a frequência de células CD11b⁺CD86⁺, células CD49b⁺, linfócitos CD8⁺, CD4⁺ e linfócitos CD19⁺ (**Figura 13 e 14**) no baço.

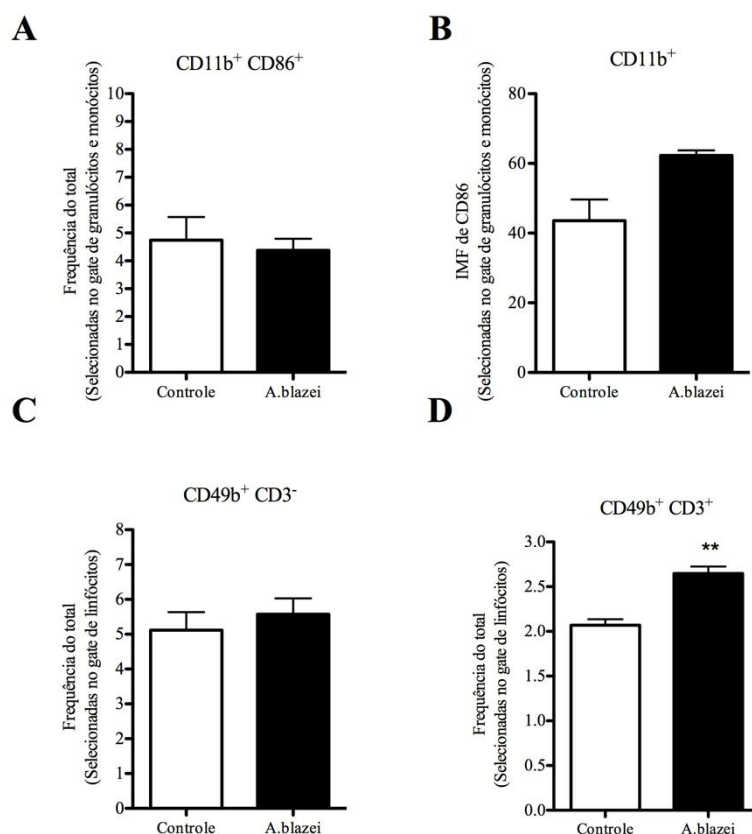


Figura 13: Perfil de células da imunidade inata no baço de camundongos C57BL/6.

A- Frequência de células CD11b⁺CD86⁺ selecionadas dentro do gate de granulócitos e monócitos. **B-** Intensidade média de fluorescência (IMF) de CD86 em células CD11b⁺CD11c⁻ selecionadas dentro do gate de granulócitos e monócitos. **C-** Frequência de células CD49b⁺CD3⁻ selecionadas dentro do gate de linfócitos. **D-** Frequência de células

CD49b⁺CD3⁺ selecionadas dentro do gate de linfócitos. Resultados obtidos por citometria de fluxo. Barras representam a média e o erro padrão. ** p<0.01.

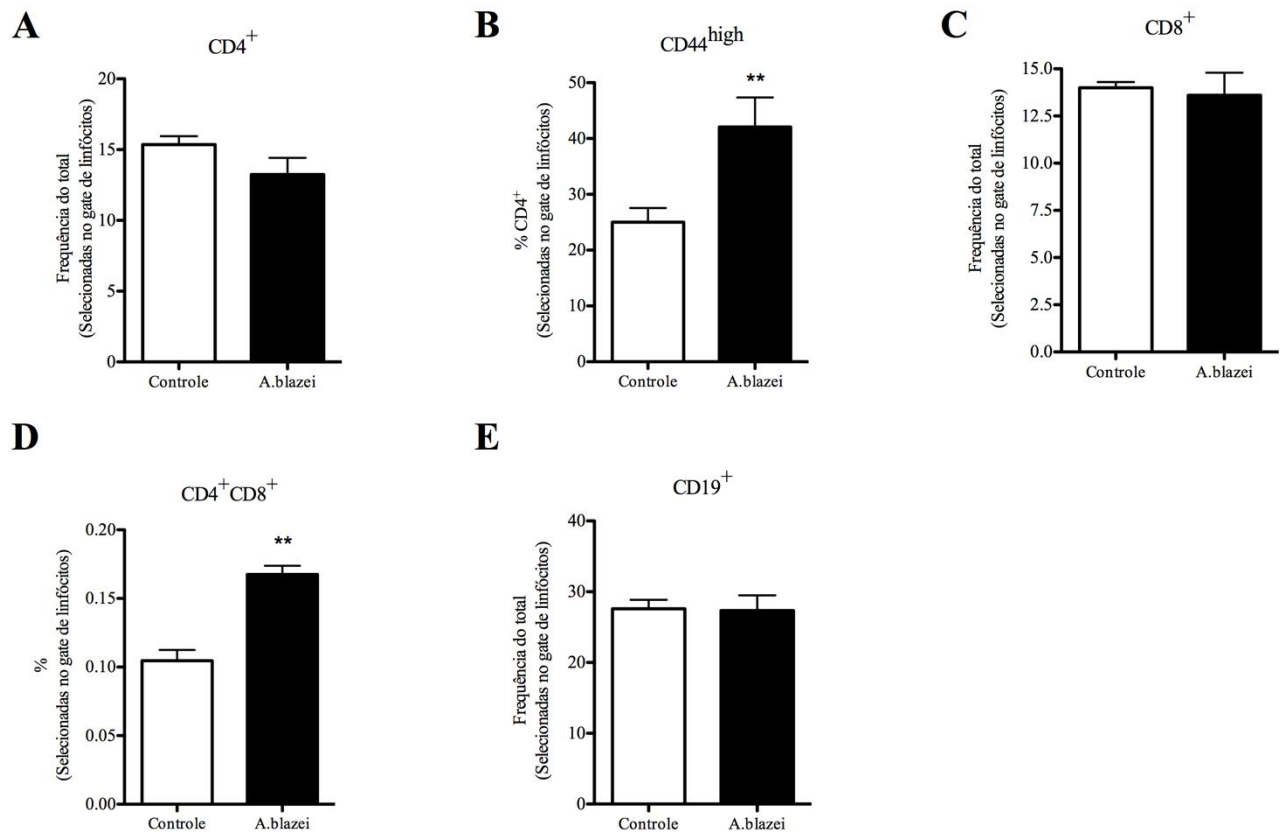


Figura 14: Perfil de linfócitos no baço de camundongos C57BL/6.

A- Frequência de células CD4⁺ selecionadas dentro do gate de linfócitos. **B-** Percentual de células CD4⁺CD44^{high} selecionadas dentro do gate de linfócitos. **C-** Frequência de células CD8⁺ selecionadas dentro do gate de linfócitos. **D-** Percentual de células CD4⁺CD8⁺ selecionadas dentro do gate de linfócitos. **E-** Frequência de células CD19⁺ selecionadas dentro do gate de linfócitos. Resultados obtidos por citometria de fluxo. **A, B, D e E** - Barras representam a média e o erro padrão. **C** - Barras representam a mediana e a variação. Para todas as análises n=5. ** p<0.01.

5.2 Parte II - *Agaricus blazei* na resposta inflamatória crônica da aterosclerose no camundongo apoE nocaute.

5.2.1 *Agaricus blazei* agrava a lesão aterosclerótica.

Com o propósito de reproduzir o efeito observado em nosso estudo anterior, avaliamos a lesão aterosclerótica na válvula aórtica após 6 semanas de tratamento com o *A. blazei*, e incluímos um segundo tempo de tratamento, prolongado por mais 6 semanas, com o intuito de observar se haveria a permanência ou mesmo agravamento dos efeitos na lesão aterosclerótica com a continuidade do tratamento. Como é mostrado na **Figura 15 A**, com 6 semanas de tratamento o *A. blazei* aumenta a área da lesão aterosclerótica em 64%. No tratamento prolongado de 12 semanas, ocorre um aumento da área da lesão de 119%. Dessa forma, o prolongamento do tratamento com *A. blazei* por 12 semanas, aumentou a repercussão dos efeitos deletérios em 85% comparado ao aumento observado no tempo de 6 semanas. No entanto, para a placa aterosclerótica desencadear eventos clínicos, além da característica de uma área aumentada, ela deve estar vulnerável à rupturas, um aspecto influenciado pela menor deposição de colágeno dentro da lesão^{127; 128}. Na **Figura 15 B**, está representado o efeito do *A. blazei* na redução do percentual de colágeno na placa aterosclerótica após 6 semanas de tratamento. Por limitações técnicas, o conteúdo de colágeno após 12 semanas de tratamento não foi avaliado. Na **Figura 16** estão representados os aspectos histológicos da lesão aterosclerótica (**A-D**) e da deposição de colágeno intra-placa (**E-F**).

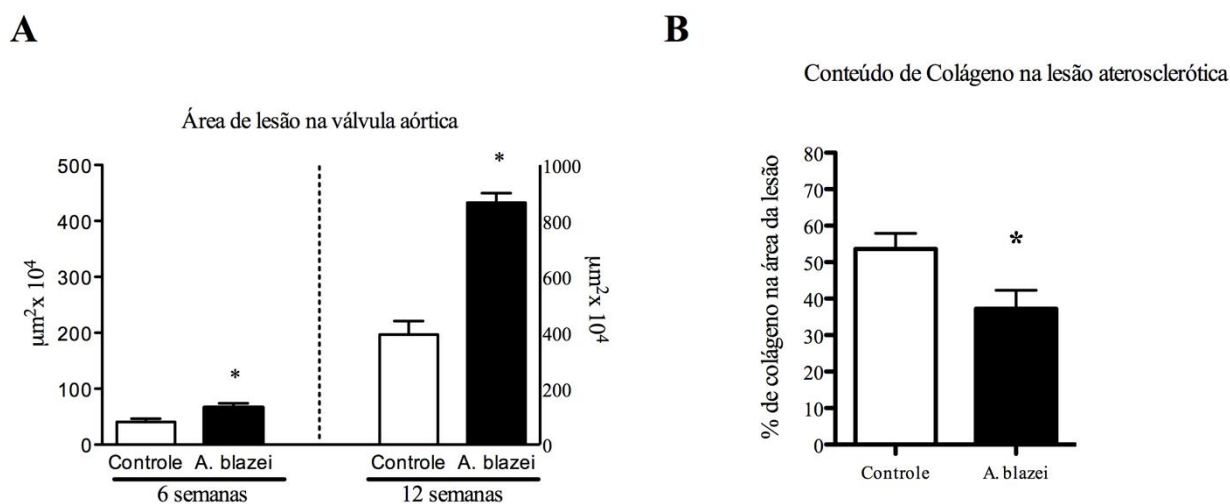


Figura 15: Avaliação da área de lesão e deposição de colágeno na lesão aterosclerótica da válvula aórtica de camundongos apoE -/-.

A- Área de lesão na válvula aórtica, após 6 (n=10) e 12 (n=6) semanas de tratamento com dieta suplementada com *A. blazei* (5%). **B-** Percentual de colágeno na área da lesão, após 6 semanas de tratamento com dieta suplementada com *A. blazei* (5%), n=10. Resultados obtidos por processamento de imagem pelo programa Image Pro Plus©. Barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão. * p<0.05.

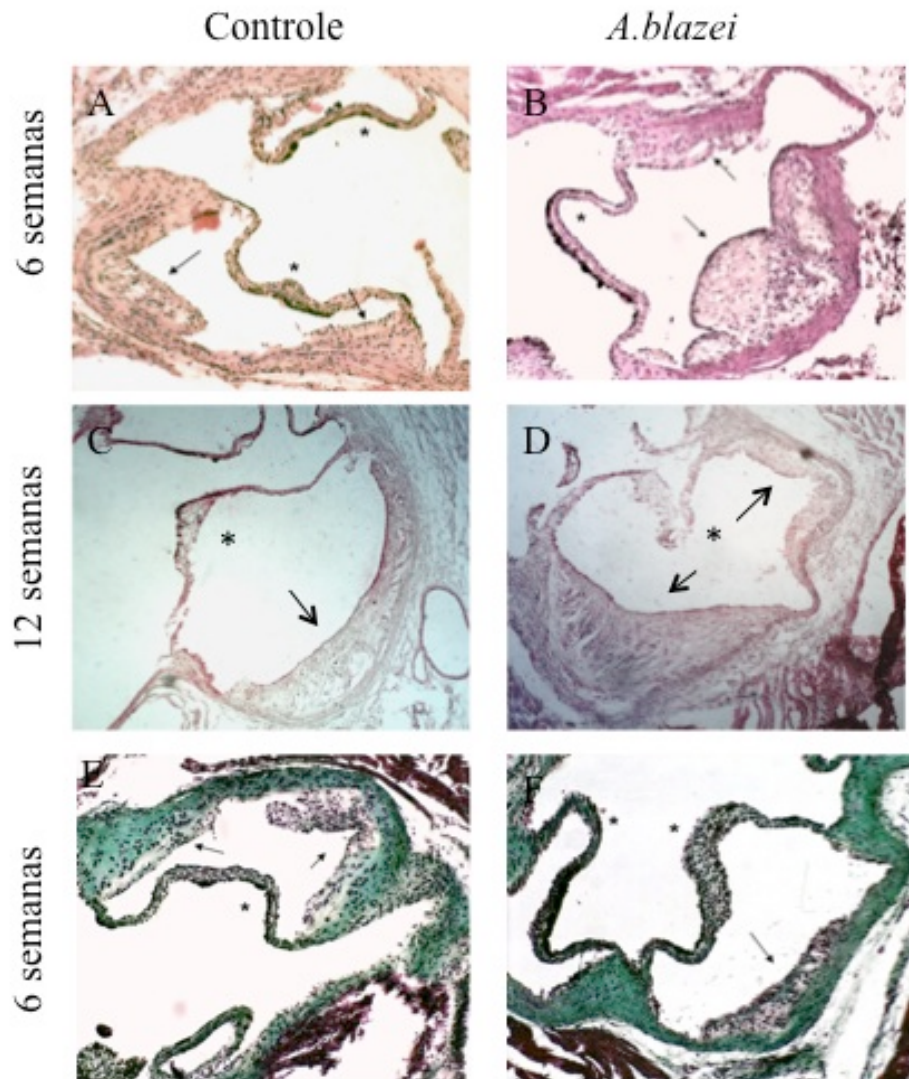


Figure 16: Aspecto histológico da área de lesão e deposição de colágeno na lesão aterosclerótica da válvula aórtica de camundongos apoE^{-/-}.

A e B- Aspecto das lesões ateroscleróticas na válvula aórtica, após 6 semanas de tratamento dietético, do grupo controle e grupo *A.blazei* respectivamente, n=10 ; As lesões são mais avançadas no grupo *A. blazei*, com um núcleo lipídico bem definido e a formação de capa fibrosa (fibroateroma), enquanto no grupo controle existe somente a formação de estria gordurosa. **C e D-** Aspecto das lesões ateroscleróticas na válvula aórtica, após 12 semanas de tratamento dietético, do grupo controle e grupo *A.blazei* respectivamente, n=6; As lesões encontram-se no estágio de desenvolvimento, avançado com presença de cristais de colesterol, capa fibrosa e intenso infiltrado inflamatório. Não há diferença de estágio de desenvolvimento da lesão entre os grupos **E e F-** Aspecto da deposição de colágeno dentro da placa aterosclerótica, no grupo controle e *A. blazei*, respectivamente, após 6 semanas de tratamento dietético, n=10. A área de colágeno é observada pelo tom de verde mais claro dentro da lesão. No grupo *A. blazei* há o predomínio de uma coloração cinza, que denota diminuição da deposição de colágeno. Resultados obtidos por histologia. Asteriscos marcam a referência anatômica da válvula aórtica e setas indicam a lesão aterosclerótica.

5.2.2 *Agaricus blazei* aumenta a expressão de genes pró-aterogênicos no arco aórtico.

Para tentar esclarecer os possíveis elementos envolvidos com o agravamento da lesão aterosclerótica, procedemos com a análise da expressão de genes envolvidos na captação da LDL oxidada (CD36, SRA1 e SRA2)¹²⁹, adesão e ativação de leucócitos (VCAM-1 e TLR4)^{130; 131}, quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos e macrófagos (CXCL1 e CCL2)¹³², da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS)¹³³, responsável pela produção de óxido nítrico e da metalo-proteínase 9 (MMP9)¹³⁴ responsável pela degradação do colágeno na placa aterosclerótica. Os resultados revelam a participação do *A. blazei* no aumento da expressão dos receptores CD36 e SRA2, mas não do SRA1 (Figura 17 A). A molécula VCAM1 e o receptor TLR4 também tiveram um aumento considerável de sua expressão (Figura 17 B). A INOS não foi alterada, no entanto a MMP9 foi mais expressa (Figura 17 C) Por fim houve aumento na quimiocinas responsável pelo recrutamento de neutrófilos, CXCL1, mas não a quimiocinas atrativa para monócitos, CCL2 (Figura 17 D).

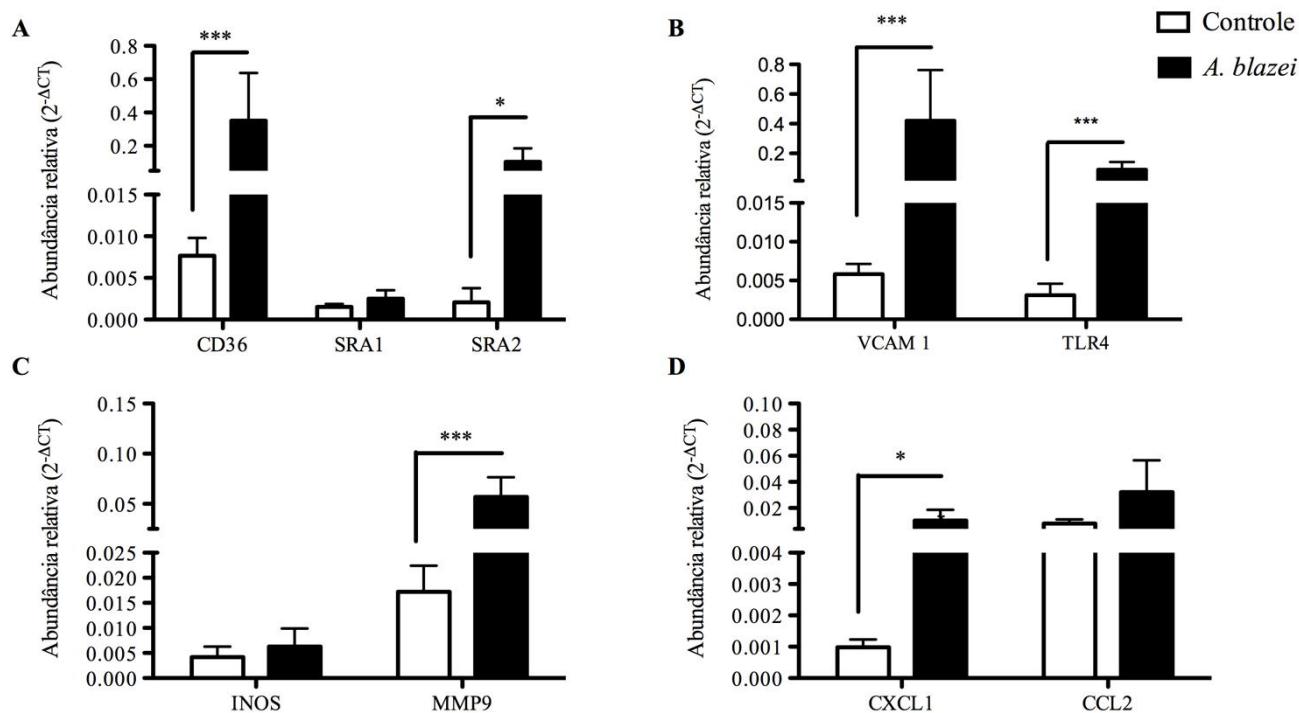


Figura 17: Expressão de moléculas pro-aterogênicas no arco aórtico de camundongos apoE^{-/-}.

A- Expressão de CD36, SRA1 e SRA2; **B-** VCAM-1 e TLR4; **C-** INOS e MMP9; **D-** CXCL1 e CCL2 após 12 semanas de tratamento com dieta suplementada com *A. blazei* (5%). Resultados obtidos por PCR em tempo real (n=6). Barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão. * p<0.05, ***p<0.001.

5.2.3 *Agaricus blazei* aumenta a atividade de MPO em diferentes locais anatômicos no camundongo apoE^{-/-}.

Recentes estudos, tem demonstrado que a maior atividade da enzima mieloperoxidase, está envolvida na progressão das lesões ateroscleróticas humanas¹³⁵. Diante desse fato decidimos averiguar o efeito do *A. blazei* na atividade de MPO na aterosclerose, avaliando a aorta torácica e abdominal, um dos locais de formação da placa aterosclerótica. Por anteriormente, termos demonstrado que o *A. blazei* induz atividade de MPO no intestino de camundongos C57BL/6, avaliamos também esse órgão e adicionalmente o baço. O pulmão foi avaliado com o propósito de detectar se a atividade imunoestimulatória do *A. blazei* poderia acarretar em lesão pulmonar aguda indireta. Os resultados mostram que a suplementação com o *A. blazei* gera um aumento da atividade de MPO nas porções intestinais do duodeno e jejuno proximal (**Figura 18 A**), como também no baço (**Figura 18 B**) e na aorta torácica e abdominal (**Figura 18 D**). No pulmão não houve alteração da atividade de MPO (**Figura 18 C**).

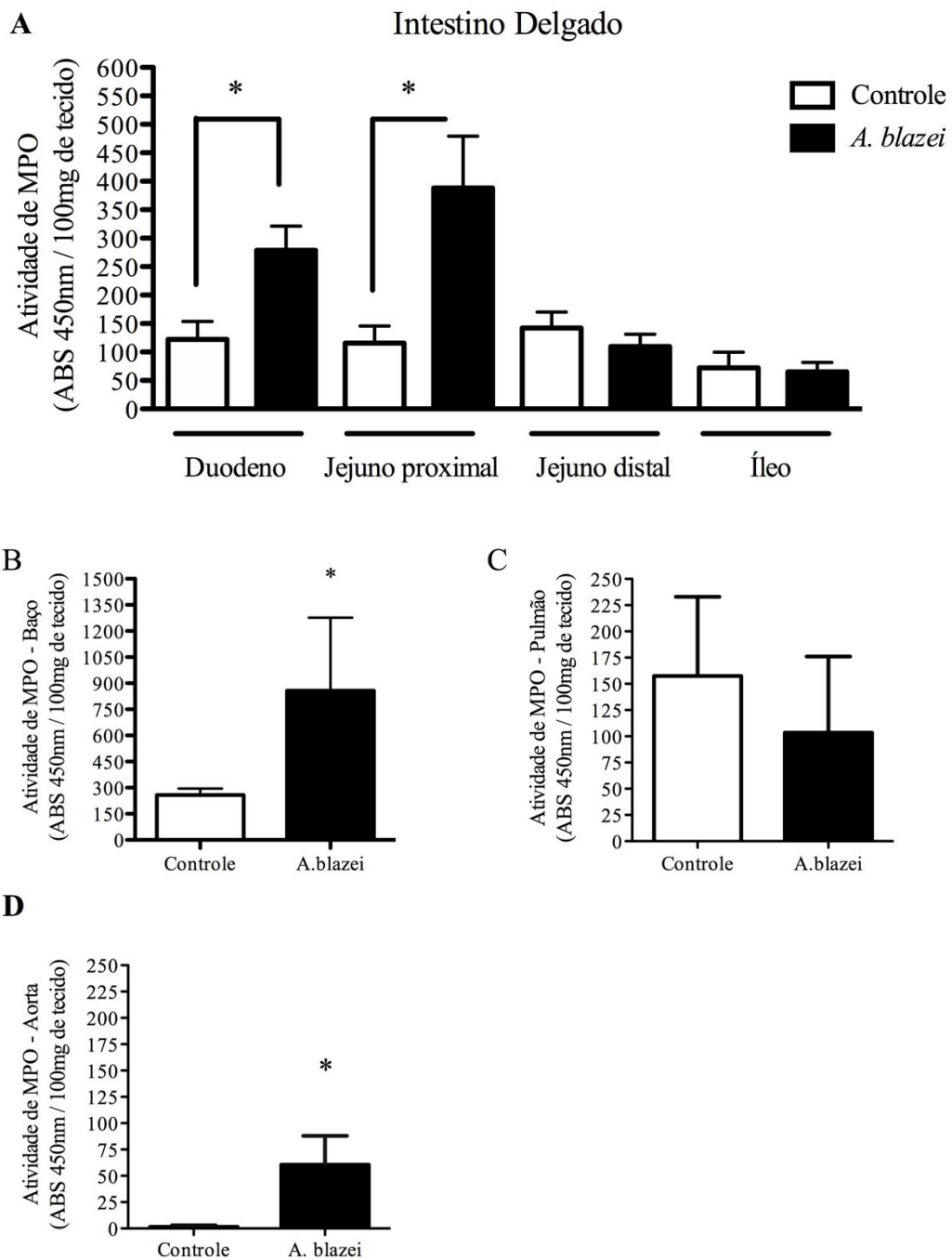


Figura 18: Atividade de MPO em diferentes locais anatômicos no camundongo *apoE*^{-/-}.

Atividade de MPO em **A**- porções do intestino delgado; **B**- baço; **C**- pulmão; **D**- aorta torácica e abdominal. **A** - Barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão. **B**, **C** e **D** - Barras representam a mediana e a variação. Para todos os parâmetros $n=5$ * $p<0.05$.

5.2.4 *Agaricus blazei* aumenta a atividade de NAG na aorta torácica e abdominal no camundongo apoE^{-/-}.

A atividade da enzima lisossomal N-acetil-glucosaminidase (NAG) é um parâmetro utilizado classicamente para avaliar a atividade de macrófagos ¹³⁶. Dessa maneira, avaliamos o efeito do *A. blazei* na atividade de NAG na aterosclerose, avaliando a aorta torácica e abdominal, um dos locais de formação da placa aterosclerótica, como também o músculo cardíaco. Como observado nos animais selvagens o *A. blazei* não alterou a atividade de NAG no intestino (**Figura 19 A**). No entanto, os resultados mostram que a suplementação com o *A. blazei* gera um aumento da atividade de NAG na aorta torácica e abdominal. A atividade de NAG no coração não foi afetada (**Figura 19 B**).

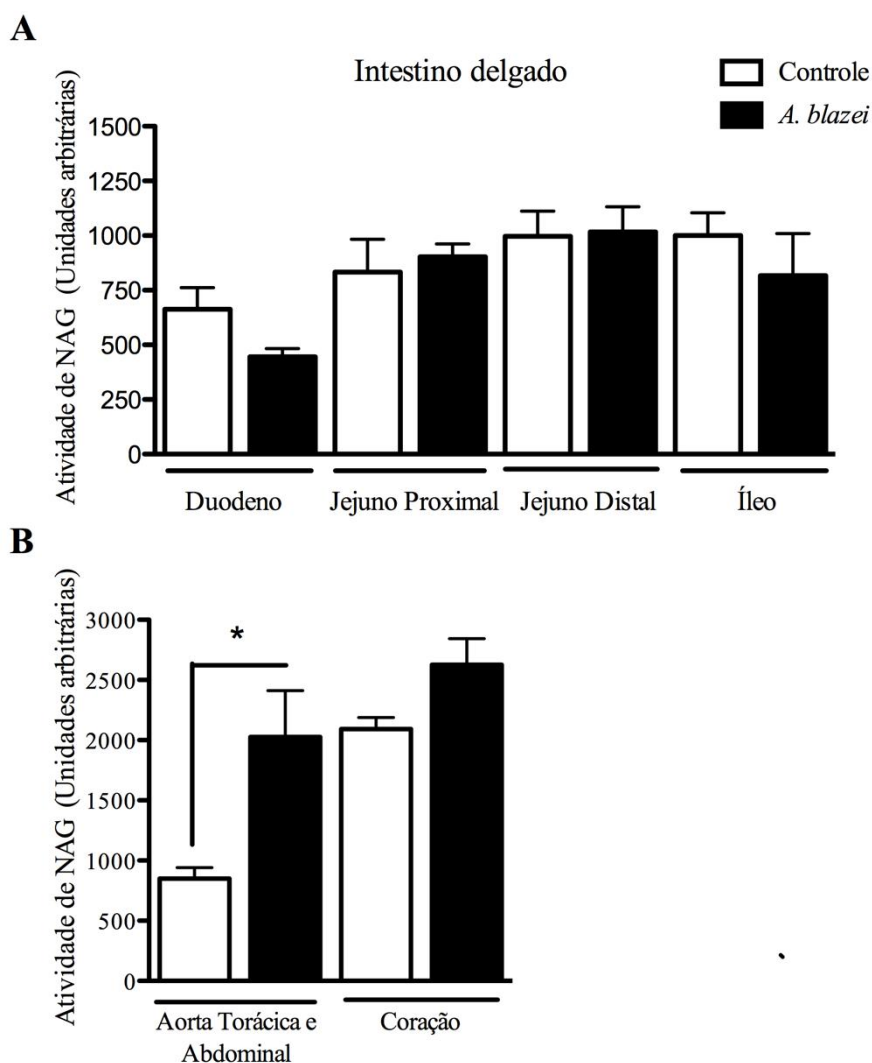


Figura 19: Atividade de macrófagos no intestino, aorta e coração em camundongos apoE^{-/-}.

A- Porções do intestino delgado; **B-** Aorta torácica, abdominal e coração. Barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão. Para todos os parâmetros n=5 * p<0.05.

5.2.5 *Agaricus blazei* amplifica a resposta inflamatória no camundongo apoE^{-/-} através da ativação de células da imunidade inata e adaptativa.

Com a intenção de demonstrar que os efeitos deletérios promovidos pelo *A. blazei* na aterosclerose, são devidos a capacidade desse fungo, em estimular o sistema imunológico, procedemos com a avaliação do perfil de células da resposta inflamatória inata e adaptativa, circulantes e esplênicas, nos camundongos apoE^{-/-}.

Conforme pode ser visto na Figura 18, de maneira semelhante ao que foi observado no camundongo selvagem, houve aumento na frequência de células CD49b⁺CD3⁺ (**Figura 20 D**), no entanto, as células CD11b⁺CD86⁺, nessa linhagem, apresentaram aumento em sua frequência, diferentemente do camundongo selvagem (**Figura 20 A**). Não houve alteração na expressão da molécula co-estimuladora CD86 em células CD11b⁺CD11c⁻ (**Figura 20 B**). Quanto aos linfócitos, como também foi observado nos camundongos selvagens, houve aumento do percentual de linfócitos CD4⁺CD8⁺ duplo positivos e de linfócitos CD4⁺CD44^{high} no baço (**Figura 21 D e B**). O *A. blazei* não modificou a frequência de células CD49b⁺ (**Figura 20 C**), linfócitos CD8⁺, CD4⁺ e também os linfócitos CD19⁺ (**Figuras 21 A, C e E**) no baço dos animais que receberam a dieta por 6 semanas, como também observado nos animais selvagens.

Diante desses achados, apesar do efeito em linfócitos, decidimos nos focar no estímulo de células da imunidade inata causado pelo *A. blazei*. Após 12 semanas de tratamento dietético, avaliamos de forma mais específica, as populações de monócitos/macrófagos (CD11b⁺F4/80⁺), neutrófilos (Gr1⁺Ly6G), células NK (NK1.1⁺) e NKT (NK1.1⁺CD3⁺) do baço e circulantes. A escolha pela avaliação de neutrófilos, surgiu pela evidência em nossos dados da capacidade do *A. blazei* em aumentar a atividade de MPO e pela literatura atual demonstrar recentemente, o papel crucial de neutrófilos no agravamento das lesões ateroscleróticas¹³⁷. Os dados revelam um aumento na frequência e no percentual de células CD11b⁺F4/80⁺ (**Figuras 22 A e 23A**), acompanhado de um aumento na expressão de CD86 (**Figuras 22 B e 23 B**), tanto no baço como no sangue dos animais que receberam o *A. blazei*. Ainda na população CD11b⁺, foi avaliada a expressão de CD54 (ICAM-1), uma integrina que atua na interação e adesão entre leucócitos e o endotélio¹³⁸. A expressão de CD54 encontrou-se aumentada tanto nas células circulantes, quanto nas células do baço (**Figuras 23 C e 22 E**). Em relação às células Gr1⁺ (Ly6G), apesar de não encontrarmos no baço alteração na frequência dessas células (**Figura 22 C**), houve aumento do percentual das mesmas na circulação (**Figura 23 D**). Não houve alteração na expressão do receptor de quimiocina CXCR2, nas células GR1⁺(Ly6G) pesquisadas (**Figuras 22 D e 23 E**). As células NK1.1⁺ se mantiveram aumentadas na circulação e no baço dos animais (**Figuras 23 F e 22 F**), corroborando com os dados de 6 semanas. Por uma limitação na marcação de CD3 nas células circulantes, as células NKT não puderam ser

avaliadas, mas no baço onde a marcação foi satisfatória, as mesmas também permaneceram aumentadas (**Figuras 22 G**), de modo semelhante aos dados de 6 semanas e dos animais selvagens.

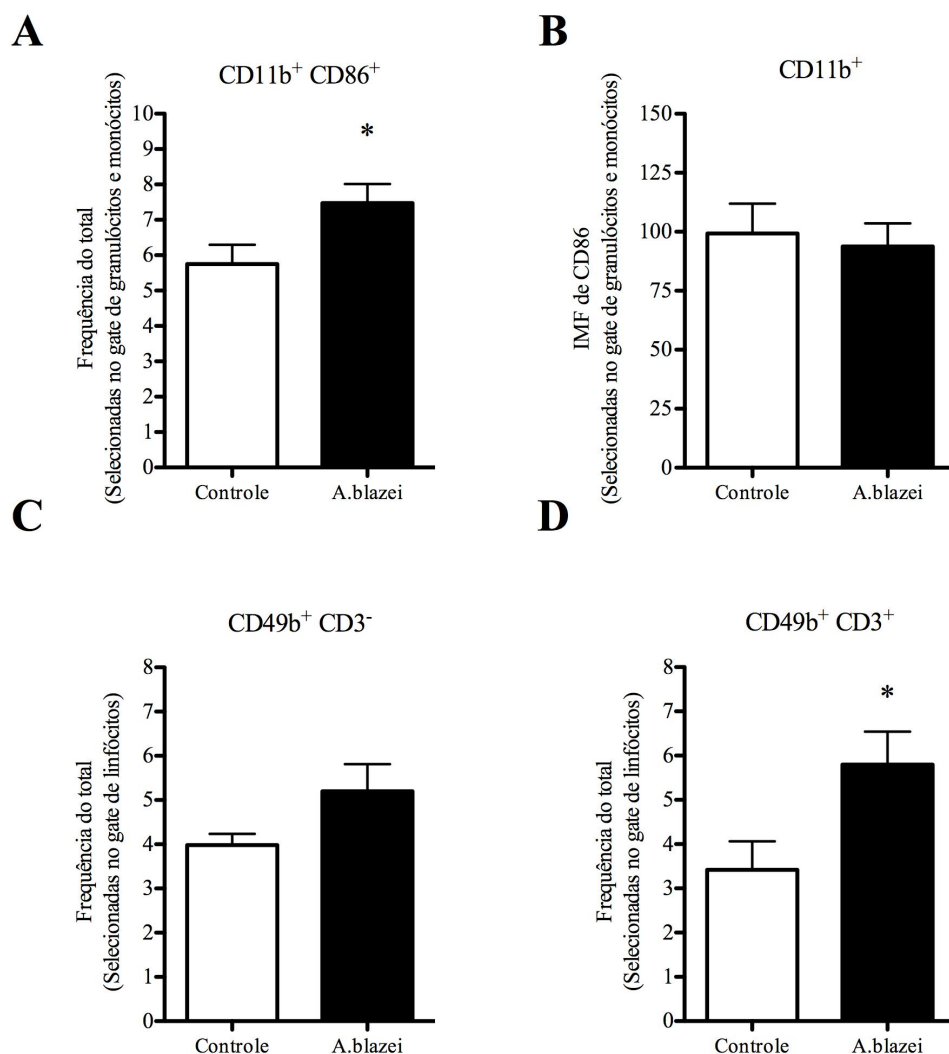


Figura 20: Perfil de células da imunidade inata no baço de camundongos apoE^{-/-}.

A- Frequência de células CD11b⁺CD86⁺ selecionadas dentro do gate de granulócitos e monócitos. **B-** Intesidade média de fluorescência (IMF) de CD86 em células CD11b⁺CD11c⁻ selecionadas dentro do gate de granulócitos e monócitos. **C-** Frequência de células CD49b⁺CD3⁻ selecionadas dentro do gate de linfócitos. **D-** Frequência de células CD49b⁺CD3⁺ selecionadas dentro do gate de linfócitos. Resultados obtidos por citometria de fluxo. Barras representam a média e o erro padrão. Para todas as análises n=7 * p<0.05.

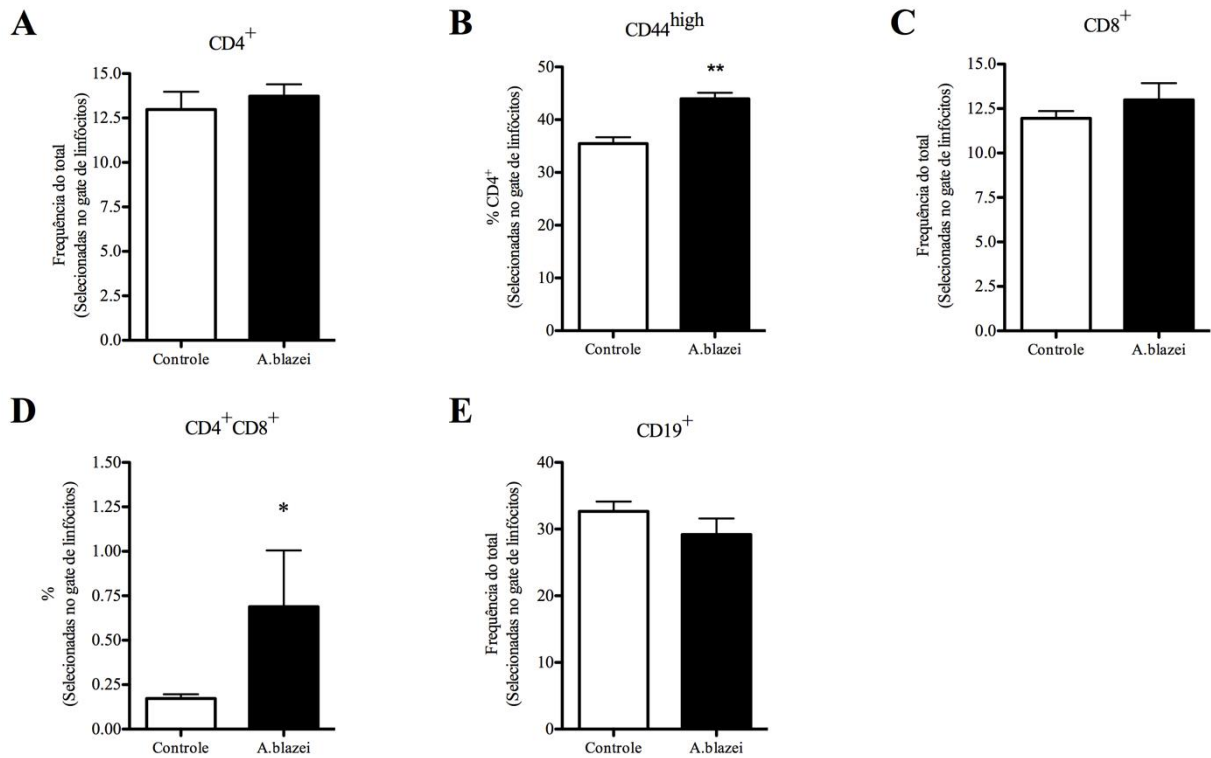


Figura 21: Perfil de linfócitos no baço de camundongos apoE^{-/-}.

A- Frequência de células $CD4^+$ selecionadas dentro do gate de linfócitos. **B-** Percentual de células $CD4^+CD44^{high}$ selecionadas dentro do gate de linfócitos. **C-** Frequência de células $CD8^+$ selecionadas dentro do gate de linfócitos. **D-** Percentual de células $CD4^+CD8^+$ selecionadas dentro do gate de linfócitos. **E-** Frequência de células $CD19^+$ selecionadas dentro do gate de linfócitos. Resultados obtidos por citometria de fluxo. Barras representam a média e o erro padrão. Para todas as análises n=7. * p<0.05.

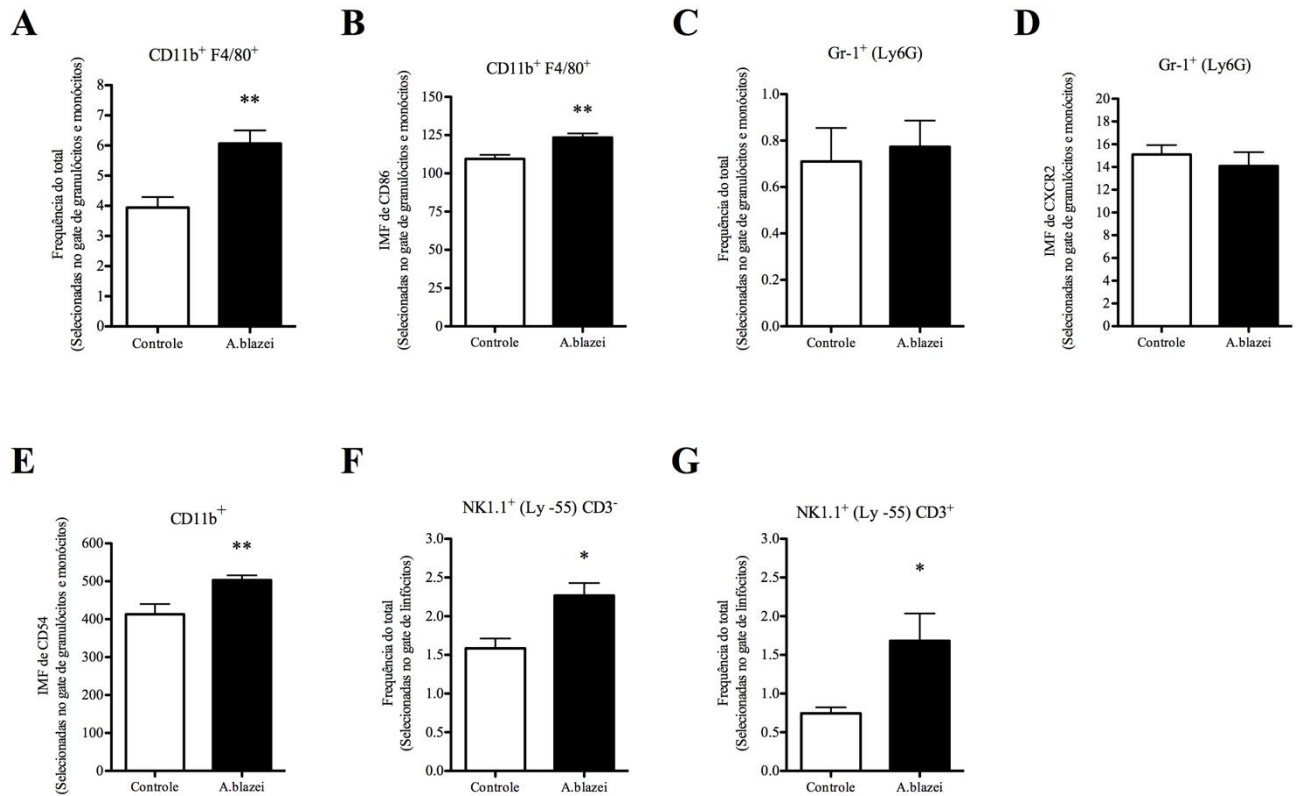


Figura 22: Perfil de células da imunidade inata no baço de camundongos apoE^{-/-}.

A- Frequência de células CD11b⁺F4/80⁺ selecionadas dentro do gate de granulócitos e monócitos. **B-** Intensidade média de fluorescência (IMF) de CD86 em células CD11b⁺F4/80⁺ selecionadas dentro do gate de granulócitos e monócitos. **C-** Frequência de células Gr1⁺(Ly6G) selecionadas dentro do gate de granulócitos. **D-** Intensidade média de fluorescência (IMF) de CXCR2 em células Gr1⁺(Ly6G) selecionadas dentro do gate de granulócitos e monócitos. **E-** Intensidade média de fluorescência (IMF) de CD54 em células CD11b⁺ selecionadas dentro do gate de granulócitos e monócitos. **F-** Frequência de células NK1.1⁺ selecionadas dentro do gate de linfócitos. **G-** Frequência de células NK1.1⁺CD3⁺ selecionadas dentro do gate de linfócitos. Resultados obtidos por citometria de fluxo. Barras representam a média e o erro padrão. Para todas as análises n=7. * p<0.05, ** p<0,01.

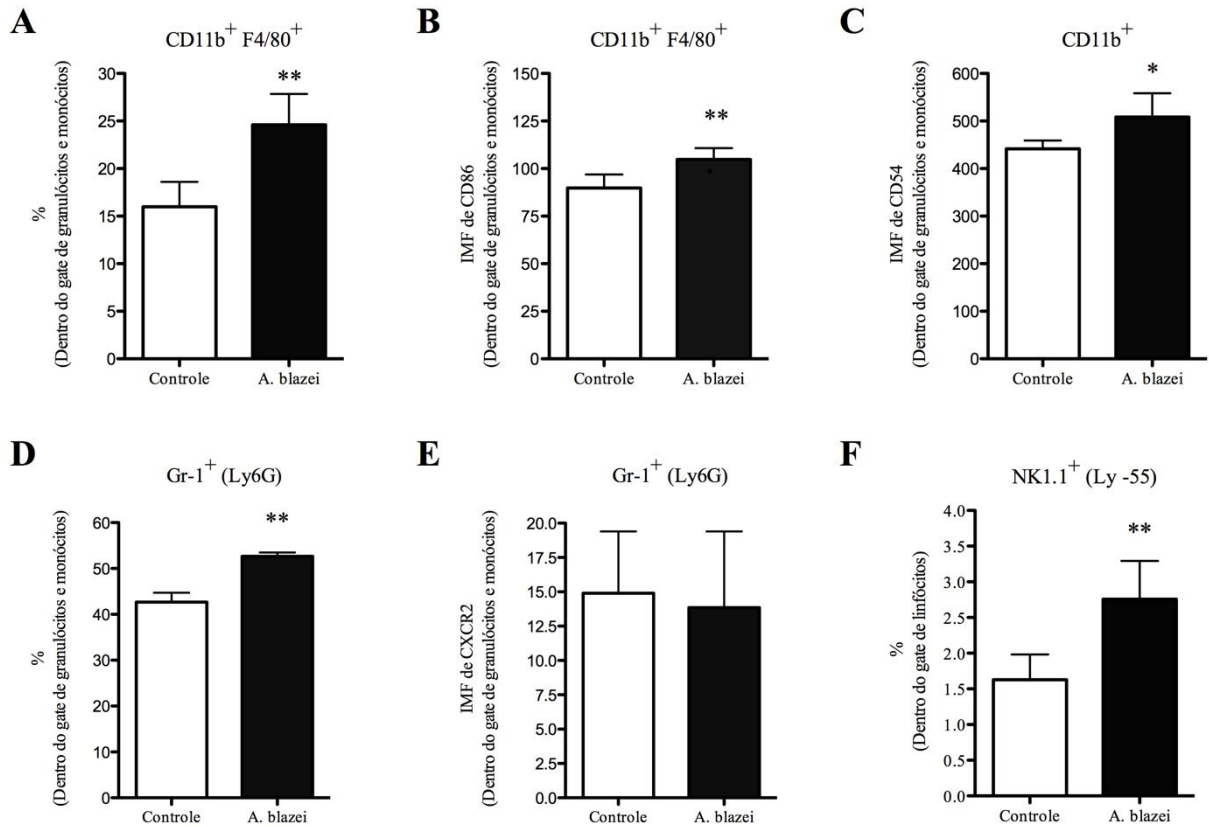


Figura 23: Perfil de células da imunidade inata circulantes de camundongos apoE^{-/-}.

A- Percentual de células CD11b⁺F4/80⁺ selecionadas dentro do gate de granulócitos e monócitos. **B-** Intensidade média de fluorescência (IMF) de CD86 em células CD11b⁺F4/80⁺ selecionadas dentro do gate de granulócitos e monócitos. **C-** Intensidade média de fluorescência (IMF) de CD54 em células CD11b⁺ selecionadas dentro do gate de granulócitos e monócitos. **D-** Percentual de células Gr1⁺(Ly6G) selecionadas dentro do gate de granulócitos. **E-** Intensidade média de fluorescência (IMF) de CXCR2 em células Gr1⁺(Ly6G) selecionadas dentro do gate de granulócitos e monócitos. **F-** Percentual de células NK1.1⁺ selecionadas dentro do gate de linfócitos. Resultados obtidos por citometria de fluxo. Barras representam a média e o erro padrão. Para todas as análises n=5. * p<0.05, ** p<0,01.

5.2.6 *Agaricus blazei* promove a secreção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ no baço.

Continuando as estratégias para detectar o efeito pró-inflamatório do cogumelo *A. blazei*, realizamos a mensuração da secreção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ no baço dos animais, pela maior atividade celular nesse órgão e consequente maior probabilidade de detecção. Nossos resultados confirmam o efeito pró-inflamatório do *A. blazei* uma vez, que ambas citocinas tiveram sua secreção aumentada, como pode ser visto na **Figura 24**.

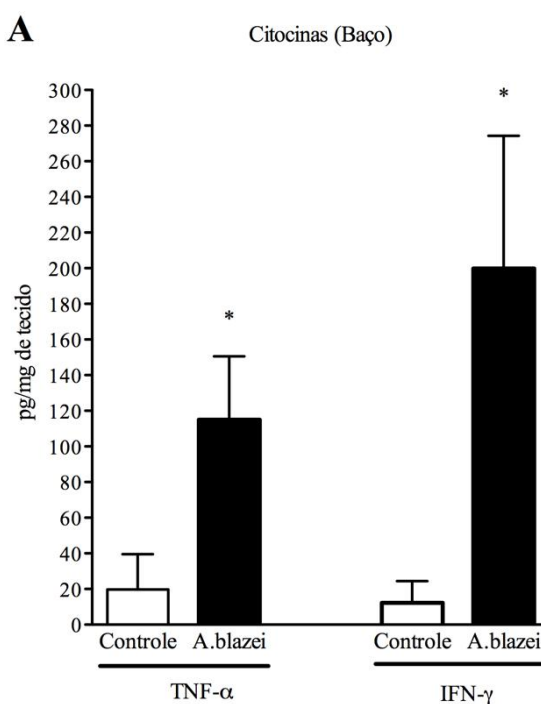


Figura 24: Perfil das citocinas pró-inflamatórias, IFN- γ e TNF- α , no baço de camundongos apoE^{-/-}.

Os baços de camundongos apoE^{-/-} após 6 semanas de tratamento dietético com *A. blazei* idade foram removidos, pesados e e homogeneizados em um tampão. IFN- γ e TNF- α foram mensurados por ELISA. Barras representam a média e o erro padrão. Para todos os grupos n=5. * p<0.05.

5.3 Parte III - *Agaricus blazei* na resposta inflamatória da artrite induzida por antígeno (mBSA) em camundongo.

5.3.1 *Agaricus blazei* não altera o número de leucócitos totais, neutrófilos e células mononucleares circulantes de animais com artrite.

Estudos prévios do nosso grupo, avaliaram a cinética do processo inflamatório no modelo de artrite induzida por antígeno (AIA). Foi demonstrado a ocorrência de aumento progressivo de células inflamatórias (em especial neutrófilos) no tecido periarticular, bem como na cavidade articular acometida horas após a administração do agente antigênico (mBSA, 10µg/cavidade). Nesse estudo, foi observado que o pico da migração de neutrófilos para a região acometida ocorre 24 horas após o desafio²⁰. Por essa razão, todos os parâmetros do presente trabalho, foram avaliados no tempo de 24 horas após o desafio.

A artrite induzida por mBSA produziu aumento no número de leucócitos totais circulantes (**Figura 25 A**), sendo que essa alteração foi consequente ao aumento da população de neutrófilos circulantes (**Figura 25 C**). Não houve alteração na população de células mononucleares (**Figura 25 B**). O *A. blazei* não foi capaz de exercer efeitos sobre as células circulantes nos animais controles ou com artrite.

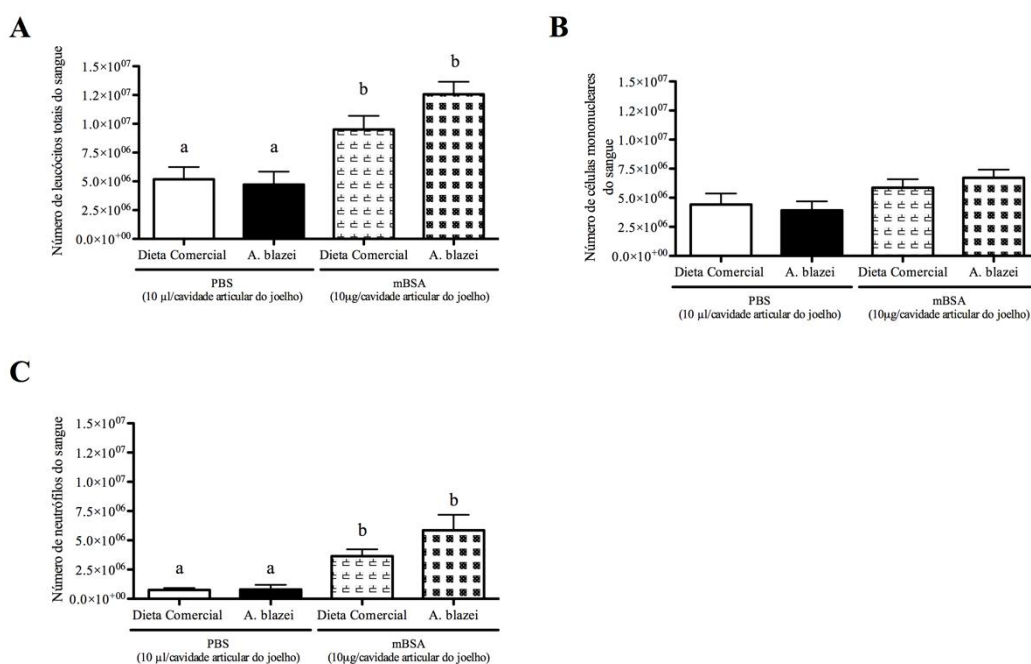


Figura 25: Efeito do *A. blazei* nas células circulantes de camundongos C57BL/6 com artrite induzida por antígeno.

A- Leucócitos totais **B-** Células mononucleares. **C-** Neutrófilos. Resultados obtidos pela contagem do número de leucócitos totais e diferenciais no sangue. Barras representam a média e o erro padrão. Letras minúsculas representam diferenças estatísticas. Para todas as análises n=10. p<0.001.

5.3.2 *Agaricus blazei* aumenta a expressão do receptor de quimiocina CXCR2 nos neutrófilos circulantes de animais com artrite.

Neutrófilos são células fundamentais na patogênese da artrite. São o primeiro tipo celular que infiltra o sítio de inflamação, seguidos pelos monócitos^{91; 139}. O receptor de quimiocina CXCR2 desempenha papel crucial na migração dos neutrófilos para o sítio inflamatório²⁰. Por essa razão, decidimos avaliar o número de células Gr1/Ly6G⁺ com alta expressão de CXCR2 como um parâmetro de avaliação da capacidade de migração dessas células. Como demonstrado anteriormente, na contagem de neutrófilos, a análise de citometria de fluxo confirmou o aumento de células Gr1/Ly6G⁺ (**Figura 26 A**). Nosso dado indica que *A. blazei* foi capaz de aumentar o número de células Gr1/LY6G⁺ CXCR2^{high} nos animais com artrite, mas não alterou esse parâmetro nos animais controle (**Figura 26 B**).

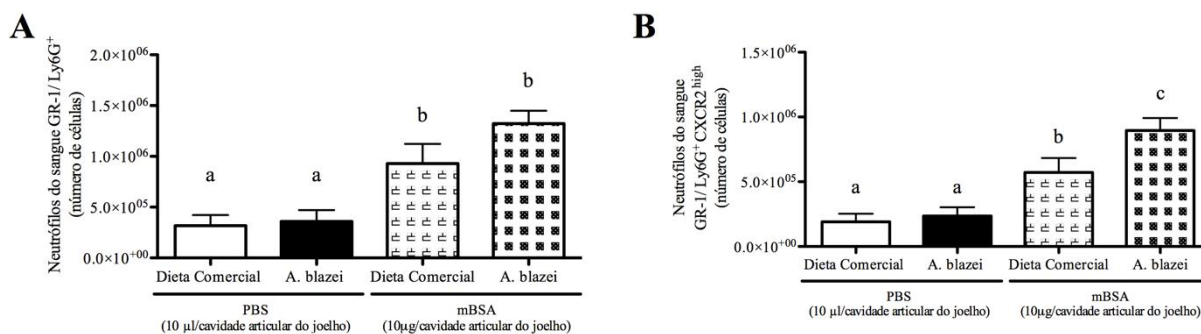


Figura 26: Efeito do *A. blazei* nos neutrófilos circulantes de camundongos C57BL/6 com artrite induzida por antígeno.

A- Número de células Gr1⁺(Ly6G) selecionadas dentro do gate de granulócitos e monócitos. **B-** Intensidade média de fluorescência (IMF) de CXCR2 em células Gr1⁺(Ly6G) selecionadas dentro do gate de granulócitos e monócitos. Resultados obtidos por citometria de fluxo. Barras representam a média e o erro padrão. Letras minúsculas representam diferenças estatísticas. Para todas as análises n=5. p<0.001.

5.3.3 *Agaricus blazei* diminui o infiltrado de neutrófilos em animais com artrite e aumenta o número de células mononucleares em animais não desafiados na cavidade articular.

Em seguida à análise das células circulantes, procedemos com a avaliação da cavidade articular. Como esperado, o desafio por mBSA produziu aumento no recrutamento de neutrófilos (**Figura 27 C**) que refletiu na contagem de células totais (**Figura 27 A**) em comparação aos animais controle, não desafiados. No entanto, de forma surpreendente, nos animais com artrite que consumiram o *A. blazei*, detectamos um menor número de células totais na cavidade articular (**Figura 27 A**). Após a contagem diferencial, observamos que o menor número dessas células foi reflexo da diminuição de neutrófilos, como observado na **Figura 27 C**. A contagem de células mononucleares não foi afetada, nesse grupo (**Figura 27 B**).

Outra observação interessante, foi o aumento detectado de células mononucleares nos animais controle, não desafiados, que consumiram *A. blazei* (**Figura 27 B**).

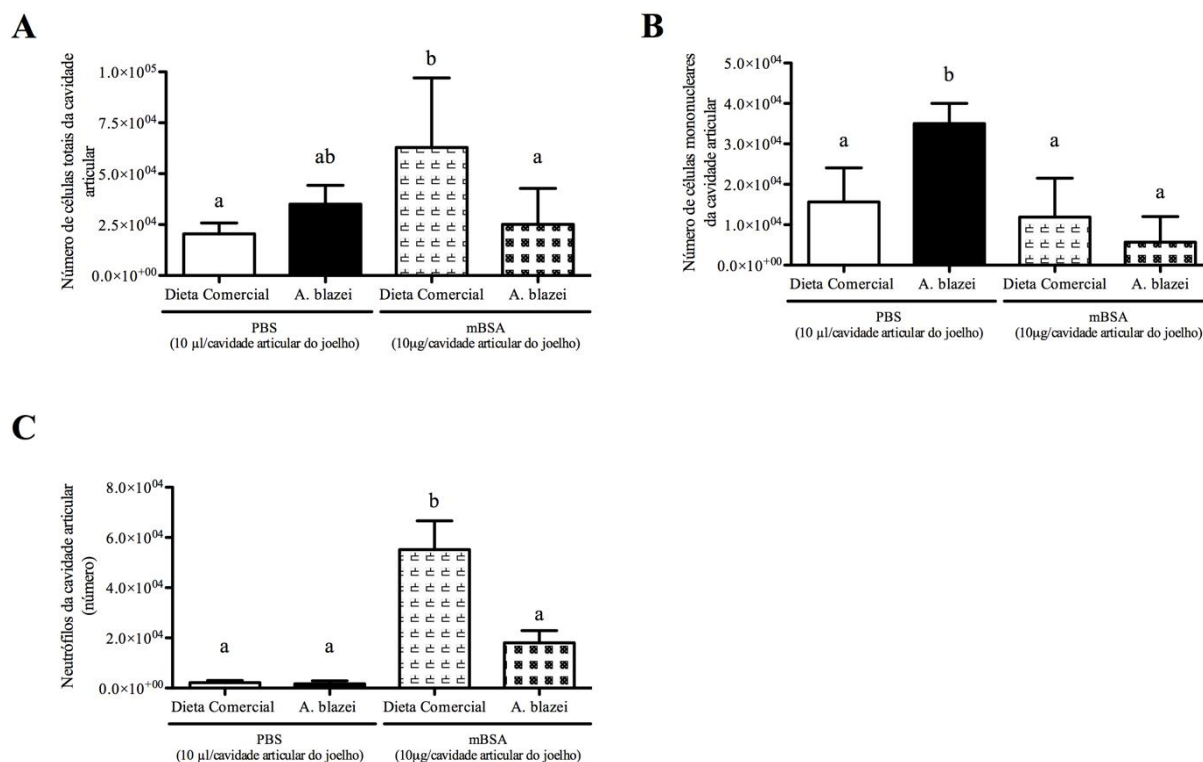


Figura 27: Efeito do *A. blazei* na artrite induzida por antígeno em camundongos C57BL/6.

A- Leucócitos totais **B-** Células mononucleares. **C-** Neutrófilos. Resultados obtidos pela contagem do número de leucócitos totais e diferenciais no lavado da cavidade articular. **A e B** - Barras representam a mediana e a variação. **C-** Barras representam a média e o erro padrão. Letras minúsculas representam diferenças estatísticas. Para todas as análises n=10. **A-** p<0,01. **B** - p<0,05. **C-** p<0.001.

5.3.4 *Agaricus blazei* não altera dor e atividade de MPO mas melhora parcialmente os níveis percentuais de proteoglicanos da cartilagem e diminui o aspecto do infiltrado inflamatório no joelho.

Alguns sinais podem indicar o nível de gravidade da doença no modelo de AIA. Entre eles, a hipernocicepção (percepção de dor); a atividade de MPO, como indicativo de infiltrado de neutrófilos; o aspecto histológico da articulação em que pode ser evidenciado o infiltrado inflamatório, a hiperplasia da membrana sinovial, a erosão óssea e a degradação de proteoglicanas da cartilagem²⁰.

A artrite induzida por mBSA produziu aumento da hipernocicepção verificado pelo teste de pressão crescente na pata. No entanto, não ocorreu alteração da hipernocicepção no grupo *A. blazei* (**Figura 28 A**). A atividade de MPO também não foi modificada no tecido periarticular dos animais que consumiram *A. blazei* (**Figura 28 B**).

Quanto às análises histológicas, foi observado extravasamento de leucócitos, com consequente formação de agregados no tecido sinovial e hiperplasia, presentes nos animais imunizados e desafiados com mBSA (**Figura 29 C e G**) quando comparado aos animais controle (**Figura 29 A e E**). O tratamento com *A. blazei* reduziu o infiltrado inflamatório e a hiperplasia sinovial (**Figura 29 D e H**). Apesar dessa percepção houve erosão óssea, erosão da cartilagem e o exsudato celular estava presente em ambos grupos (**Figura 29 C e G**). Além disso, avaliou-se também o percentual de proteoglicanos dos animais, sendo possível observar a ocorrência de perda significativa de proteoglicanos nos animais imunizados e desafiados com mBSA, (**Figura 29 K**) quando comparado ao grupo controle (**Figura 29 L**). Apesar dessa constatação, foi observado nos animais tratados com *A. blazei*, uma melhora parcial do percentual de proteoglicanos. A avaliação semiquantativa do percentual de proteoglicanos está representada graficamente na **Figura 28 C**.

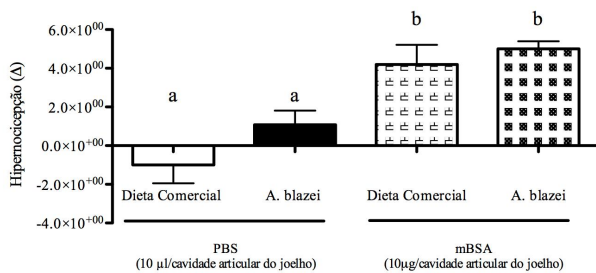
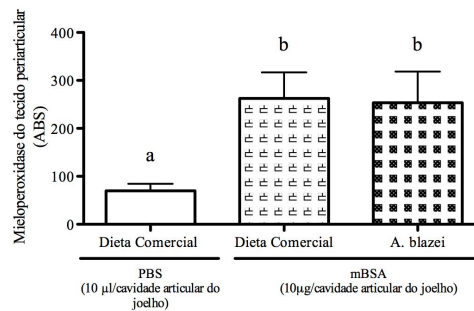
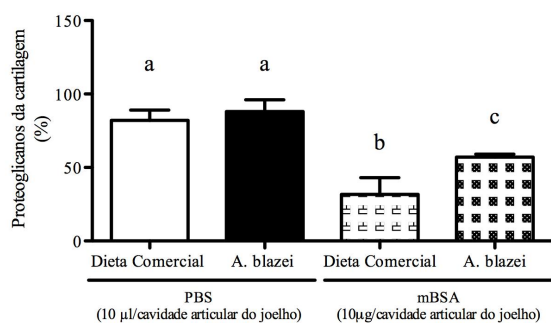
A**B****C**

Figura 28: Efeito do *A. blazei* na hipernociceção, níveis de MPO e conteúdo de proteoglicanos da cartilagem de camundongos C57BL/6 submetidos à artrite induzida por antígeno (AIA).

A- Hipernociceção, n=5; **B-** MPO, n=5; **C-** Proteoglicanos da cartilagem, n=4. Barras representam a média e linhas verticais o erro padrão. Letras minúsculas representam diferenças estatísticas. **A, C-** p<0,01. **B-** p<0,05

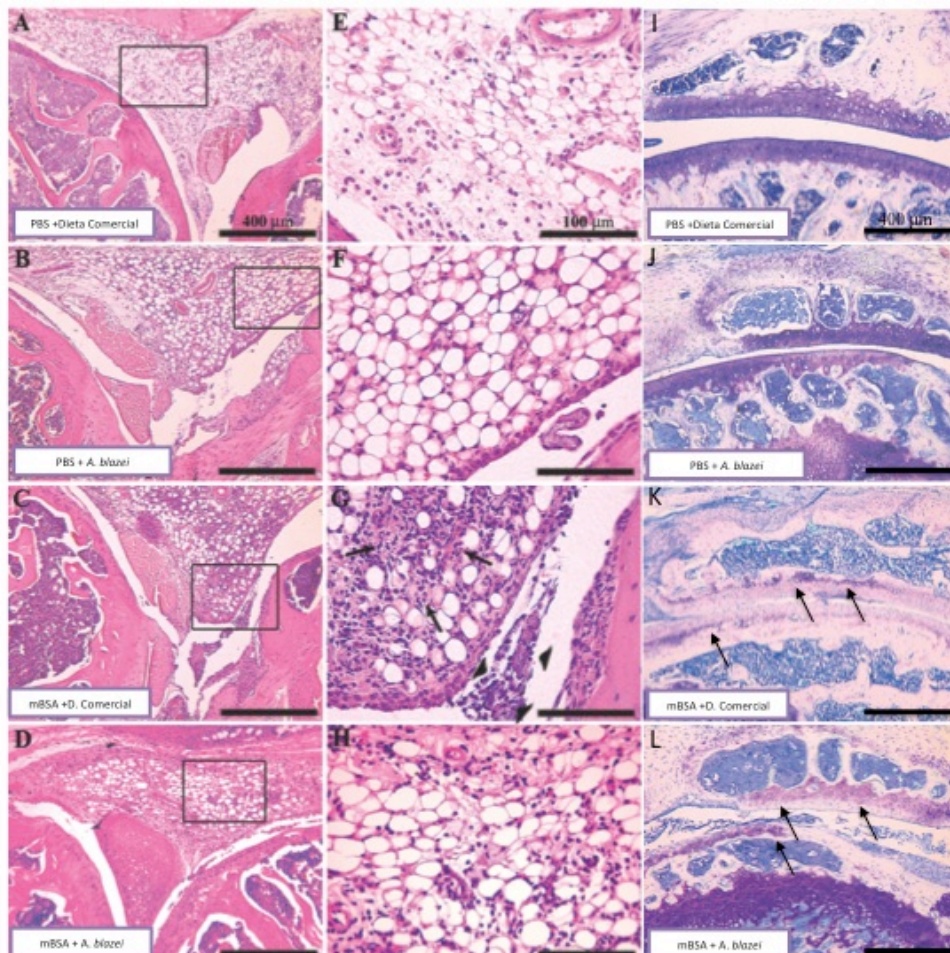


Figura 29: Efeito do *A. blazei* sobre a histologia das articulações de camundongos C57BL/6 submetidos à artrite induzida por antígeno (AIA).

Cortes representativos da articulação fêmur-tibial (joelho) **A, E e I**- de animais controle, imunizados, desafiados com PBS e alimentados com dieta commercial, **B, F e J**- animais controle, imunizados, desafiados com PBS e alimentados com dieta suplementada com *A. blazei*, **C, G e K**- animais artrite, imunizados, desafiados com mBSA, alimentados com dieta commercial. **D, H e L**- animais artrite, imunizados, desafiados com mBSA, alimentados com dieta suplementada com *A. blazei*. As amostras foram obtidas 24 h após a indução da artrite e os cortes histológicos estão representados em aumento de 100x (**A, B, C, D, I, J, K e L**) e 400x (**E, F, G e H**), corados com HE ou azul de toluidina. Em **G** as setas indicam a presença do infiltrado inflamatório no tecido sinovial e as cabeças de setas mostram as células na cavidade sinovial. Essas células são predominantemente neutrófilos. Em **K e L** as setas indicam áreas de menor presença de proteoglicanos na cartilagem do joelho. n=3-6

5.3.5 *Agaricus blazei* diminui a adesão de leucócitos na microvasculatura da cavidade articular.

Com o intuito de avaliar a interação dos leucócitos circulantes (neutrófilos) com o endotélio, procedemos com a análise de rolamento e adesão por meio de microscopia intravital na microvasculatura da cavidade articular. Não foi observada alteração no número de células rolando no vaso (**dado não mostrado**), no entanto, houve menor adesão de células que acarreta em menor migração celular (**Figura 30 A**).

A

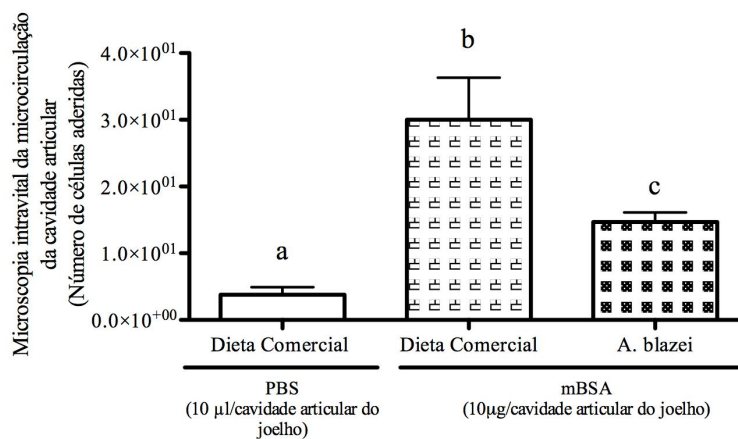


Figura 30: Efeito do *A. blazei* sobre a interação leucócito-endotélio na microvasculatura sinovial de camundongos C57BL/6 submetidos à artrite induzida por antígeno (AIA).

A- Adesão de leucócitos no endotélio sinovial foram avaliados 24 h após a injeção de antígeno (mBSA, 10 µg) ou PBS 1x estéril na região intra-articular dos animais previamente imunizados. O resultado de adesão foi expresso como número de células/100µm. Barras representam a média e linhas verticais o erro padrão. Letras minúsculas representam diferenças estatísticas. n=5. p<0,05.

5.3.6 *Agaricus blazei* diminui a produção de quimiocinas e IL-1 β , importantes para o recrutamento de neutrófilos no tecido periarticular.

As concentrações das citocinas IL-1 β , CXCL1 e CXCL2 são elevadas durante o estabelecimento da AIA²⁰. Além disso, as concentrações desses mediadores estão diretamente relacionadas com o influxo de neutrófilos para o sítio inflamatório.

No presente estudo obtivemos os seguintes achados: 1) redução de neutrófilos na cavidade articular; 2) aumento de neutrófilos circulantes mais competentes para a migração e 3) uma redução da adesão de leucócitos na microvasculatura da cavidade articular. Diante desses achados, nossa hipótese foi que apesar da maior capacidade de migração dos neutrófilos, o sinal para a migração dos mesmos, para a cavidade articular, poderia estar diminuído nos animais que consumiram o *A. blazei*. Portanto, decidimos avaliar as concentrações desses três mediadores, IL-1 β , CXCL1 e CXCL2, no tecido periarticular dos animais com artrite. Nossos resultados evidenciam uma redução nos três mediadores analisados decorrente do tratamento com *A. blazei* e confirmam nossa hipótese (Figura 31 A, B e C).

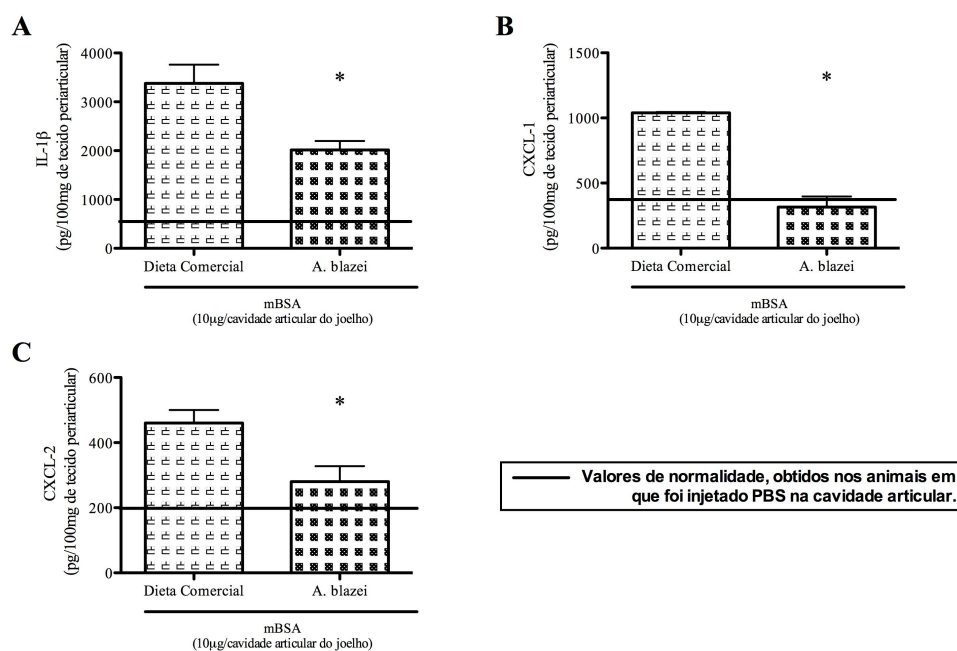


Figura 31: Efeito do *A. blazei* na produção de citocinas e quimiocinas na artrite induzida por antígeno (AIA) em camundongos C57BL/6.

A- IL-1 β B- CXCL-1 C- CXCL-2. Resultados obtidos por ELISA no tecido periarticular. A- Barras representam a média e o erro padrão. B, C e D- Barras representam a mediana e linhas verticais a variação. * $p < 0,05$. Para todas as análises $n = 3-5$. $p < 0,05$.

5.3.7 *Agaricus blazei* diminui a secreção de TNF- α em esplenócitos de animais com artrite.

Trabalhos prévios demonstram a capacidade do *A. blazei* em induzir a secreção de citocinas e quimiocinas em diversos tipos celulares^{12; 31}. Diante do nosso dado anterior, em que houve uma redução na produção de mediadores inflamatórios na cavidade articular, nos perguntamos se o *A. blazei* estaria atuando de forma diferenciada na produção desses mediadores inflamatórios no modelo de artrite. Para isso, decidimos avaliar a produção da citocina pró-inflamatória TNF- α e a citocina anti-inflamatória IL-10, diante do estímulo com mBSA, para termos uma visão geral da resposta inflamatória desencadeada pela artrite e modulada pelo *A. blazei*. Apesar de não ser bem descrito na literatura o papel do baço na patogênese da artrite, o mesmo foi escolhido por ser um órgão central da resposta inflamatória e conter uma grande variedade de potenciais tipos celulares (da resposta inata e adaptativa) envolvidos no estabelecimento da AIA e alvos da ação do *A. blazei*. Observamos em nossa análise que o *A. blazei* aumenta a produção de TNF- α nos animais não desafiados. No entanto, quando o animal está com artrite a situação se inverte e o tratamento com *A. blazei* é responsável por uma diminuição dos níveis de TNF- α . (**Figura 32 A**). Em relação à IL-10, o *A. blazei* também aumenta os níveis dessa citocina nos animais não desafiados, o que é coerente com o dado de TNF- α , mas nos animais com artrite essa citocina não apresentou diferença (**Figura 32 B**).

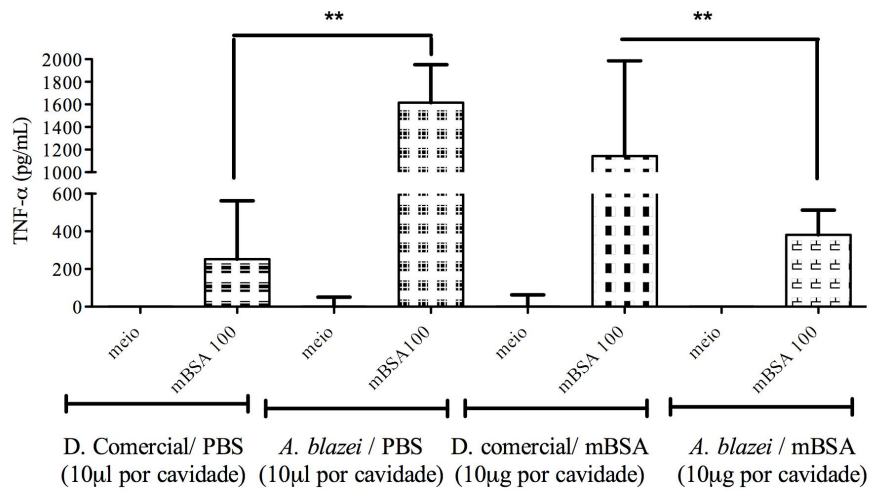
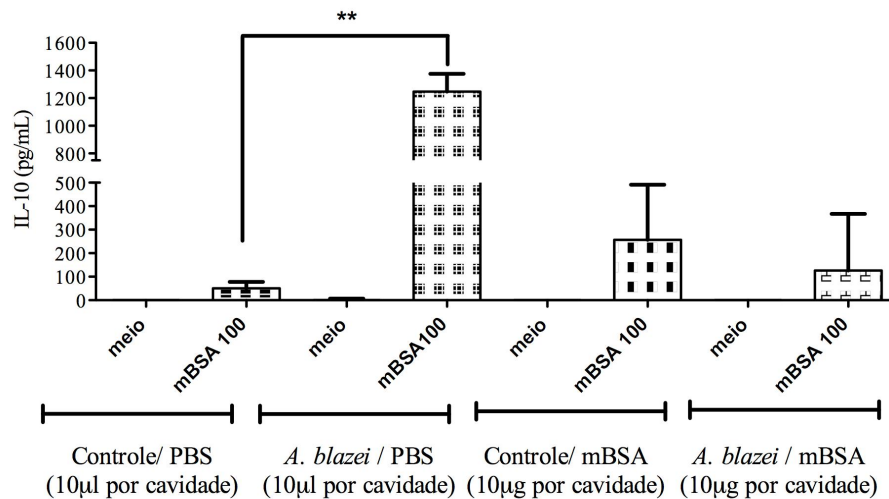
A**B**

Figura 32: Efeito do *A. blazei* na produção de TNF- α e IL-10 em esplenócitos de camundongos C57BL/6 submetidos à artrite induzida por antígeno (AIA).

A- TNF- α **B-** IL-10. Resultados obtidos por ELISA do sobrenadante de cultura de esplenócitos **A-** Barras representam a mediana e a variação Para todas as análises n=4. **p<0,01.

5.3.8 *Agaricus blazei* aumenta a morte celular no *pool* de células da cavidade articular.

Com o intuito de tentar explicar a redução no número de neutrófilos, como também a diminuição na produção das quimiocinas e da IL-1 β na cavidade articular, nos questionamos se o *A. blazei* estaria aumentando a morte celular, uma vez que dados da literatura apontam componentes do *A. blazei* como pró-apoptóticos. A partir desse dado, resolvemos avaliar a morte celular por coloração com laranja de acridina, que é um corante que se liga à ácidos nucleicos. Quando o ácido nucleico encontra-se em fita dupla, ele se liga ao ácido e emite fluorescência a 530 nm (verde) quando excitada a 488 nm. Quando o corante se liga aos ácidos nucleicos que estão em fita simples emite fluorescência a 650 nm se excitado a 488 nm. Um dos sinais de morte celular é a fragmentação do DNA que promove a separação das fitas. Dessa forma, esse corante pode ser utilizado como um indicador de morte celular. O resultado abaixo, mostra que o *A. blazei* aumentou o percentual de morte celular (**Figura 33 A**). Na Figura 33 B e C, é mostrado o aspecto das células observadas por meio de microscopia confocal.

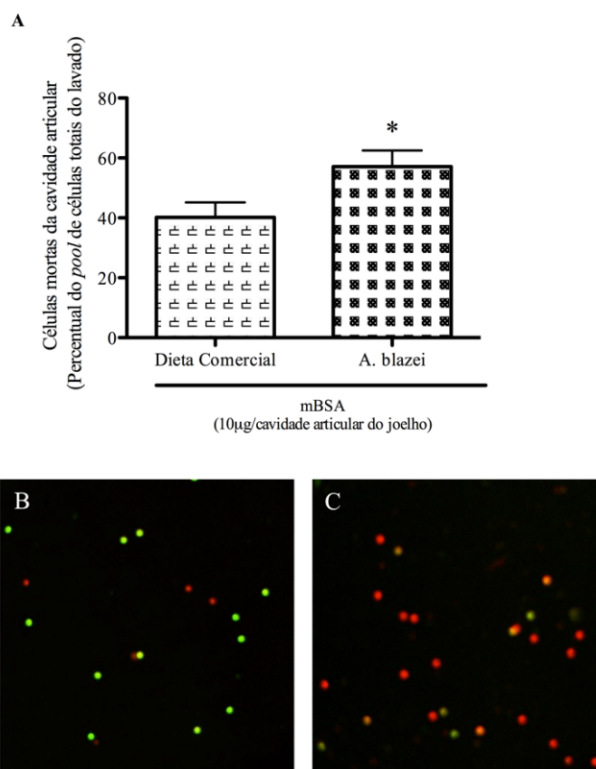


Figura 33: Efeito do *A. blazei* na produção na morte de células da cavidade articular de camundongos C57BL/6 submetidos à artrite induzida por antígeno (AIA).

A- Células mortas da cavidade articular **B e C-** Micrografia do aspecto celular do lavado articular corado com laranja de acridina do grupo alimentado com dieta comercial e *A. blazei*, respectivamente. Resultados obtidos por microscopia confocal. **A-** Barras representam a média e o erro padrão. Análise de 10 campos (> de 100 células) do *pool* celular. * $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi nossa intenção demonstrar que o *A. blazei*, oferecido na dieta, é capaz de induzir ativação de componentes da resposta inflamatória de forma sistêmica acarretando no agravamento da aterosclerose e da artrite.

Nós encontramos evidências de que: 1) a imunoestimulação gerada pelo *A. blazei* no camundongo deficiente em apoE, assume características pró-inflamatórias, responsáveis pelo agravamento da lesão aterosclerótica, o que confirma nossa hipótese em relação aos efeitos do *A. blazei* na aterogênese.

2) Em relação aos efeitos observados na artrite, nosso achado foi de que a imunoestimulação gerada pelo *A. blazei* parece induzir ativação de neutrófilos, acarretando na morte dessas células e isso foi associado com a redução do infiltrado de leucócitos no sítio de inflamação, causando diminuição de parâmetros inflamatórios locais nesse modelo.

O *Agaricus blazei* é amplamente utilizado em países orientais, tanto como fonte alimentar quanto como terapia alternativa para a proteção ou tratamento de diversas desordens, incluindo o câncer⁷.

No presente estudo, nós demonstramos que o *A. blazei*, desidratado e processado em pó, oferecido como suplemento oral para camundongos, exerceu efeitos imunoestimulatórios no intestino de animais selvagens, aumentando a produção de IgA secretória e a atividade de neutrófilos, sem alterar a permeabilidade intestinal.

A IgA secretória é a imunoglobulina mais abundante em mucosas, incluindo a mucosa intestinal. Sua produção está relacionada com a manutenção da homeostase frente aos antígenos da microbiota¹⁴⁰. A elevação de seus níveis no intestino, é descrita como um fator protetor para a redução da penetração de bactérias pelo epitélio¹⁴¹. Nosso resultado é um indicativo do potencial antigênico de componentes do *A. blazei* no sistema linfóide intestinal. Outro dado relevante obtido por nosso grupo é de que o *A. blazei* ativa a produção de IgA secretória de forma dependente do receptor TLR2, uma vez que em animais TLR2^{-/-} o *A. blazei* não causa a elevação dos níveis de IgA secretória observados nos animais selvagens (**Resultado suplementar I**).

Peptideoglicanos são ligantes conhecidos de receptores do tipo toll 2¹⁴², e entre as moléculas imunoestimuladoras que constituem o *A. blazei* existem alguns peptideoglicanos³⁰. Adicionalmente, já foi descrito o potencial do *A. blazei* em estimular TLR2^{31; 143}, o que reforça nosso achado.

O aumento de IgA secretória ocasionado pelo *A. blazei*, pode também ser entendido como uma evidência de que a imunoestimulação com esse fungo tem início no sistema linfóide associado a mucosa intestinal, antes de assumir repercussões sistêmicas.

Alterações na permeabilidade intestinal parecem preceder e/ou acompanhar a inflamação em doenças intestinais e a manutenção da seletividade no epitélio intestinal é um dos pilares da homeostase nesse órgão¹⁴⁴. Além disso, o aumento da permeabilidade intestinal permitiria especular um efeito indireto, por translocação bacteriana, do *A. blazeyi* no estímulo imunológico. Entretanto, a permeabilidade intestinal, observada por meio da técnica que utiliza o fármaco DTPA marcado com tecnécio (Tc^{99m}) e avaliação dos níveis sistêmicos deste, não foi alterada. Em caso de danos no epitélio intestinal, os níveis de DTPA na circulação são aumentados. Sugerindo, dessa forma, que a suplementação oral com o *A. blazeyi* não altera a permeabilidade intestinal, descartando então, a probabilidade do efeito indireto causado pela perda da integridade intestinal.

A migração de neutrófilos para o intestino está fortemente correlacionada com doenças inflamatórias intestinais¹⁴⁵. Em nossos estudo, avaliamos a atividade de mieloperoxidase como parâmetro da atividade de neutrófilos na mucosa intestinal e dentre as porções intestinais avaliadas, detectamos o aumento da atividade de MPO no íleo dos camundongos C57BL/6, porção essa que coincide com o maior estímulo antigênico da microbiota no intestino delgado¹⁴⁶, e em animais apoE -/- o aumento de MPO deu-se no duodeno e jejuno proximal, porções coincidentes com o maior estímulo antigênico das proteínas dietéticas¹⁴⁶. Essas diferenças podem estar associadas, por exemplo, a divergência entre as populações bacterianas presentes na microbiota das duas linhagens.

Diante desses achados, percebemos que a imunoestimulação gerada pelo *A. blazeyi* na mucosa intestinal é significativa, e em doenças inflamatórias intestinais o uso de *A. blazeyi* deve ser avaliado.

Seguindo essa linha de raciocínio, nosso grupo demonstrou redução significativa de peso e aumento de mortalidade causada por *A. blazeyi*, no modelo de mucosite induzida por cloridrato de irinotecano, em animais balb/c (**Resultado suplementar II**). No entanto, um recente trabalho demonstra que o extrato do *A. blazeyi* (nome comercial AndoSan) reduziu citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento circulantes em pacientes com colite ulcerativa (MCP-1/ CCL-2; MIP-1 β /CCL-4; IL-1 β ; IL-8; IL-6; G-CSF; GM-CSF) e doença de Crohn (IL-17; IL-2; IL-8; MCP-1/CCL-2; MIP-1 β /CCL-4; IL-1 β ; IL-8; G-CSF)¹⁴⁷. Além disso, houve diminuição da proteína calprotectina, detectada nas fezes, que é primariamente derivada de neutrófilos e tem sua concentração diretamente proporcional à migração de neutrófilos para o trato intestinal¹⁴⁷.

Esses resultados, demonstram efeitos divergentes aos observados em nosso estudo, onde encontramos aumento de MPO intestinal, que também reflete a atividade de neutrófilos. Apesar da MPO também poder ser produzida em macrófagos diferenciados¹⁴⁸, em nosso trabalho avaliamos o infiltrado de macrófagos pela atividade de NAG, e não detectamos alterações na atividade dessa enzima nas duas linhagens pesquisadas, o que indica que a MPO esta fortemente correlacionada com a atividade de neutrófilos em nosso estudo.

As comparações entre o estudo de Forland, *et al.*,¹⁴⁷ e o nosso são difíceis de serem estabelecidas, e determinar um fenômeno único que explique a ação do *A. blazei* na mucosa intestinal nos parece prematuro, pois fatores como a resposta inflamatória no microambiente, alterações na permeabilidade intestinal, alterações na microbiota e variações de componentes antigênicos do *A. blazei* absorvidos podem determinar efeitos diversos.

Os efeitos do *A. blazei* no intestino, demonstrados em nosso estudo, estão ilustrados a seguir na **Figura 34**.

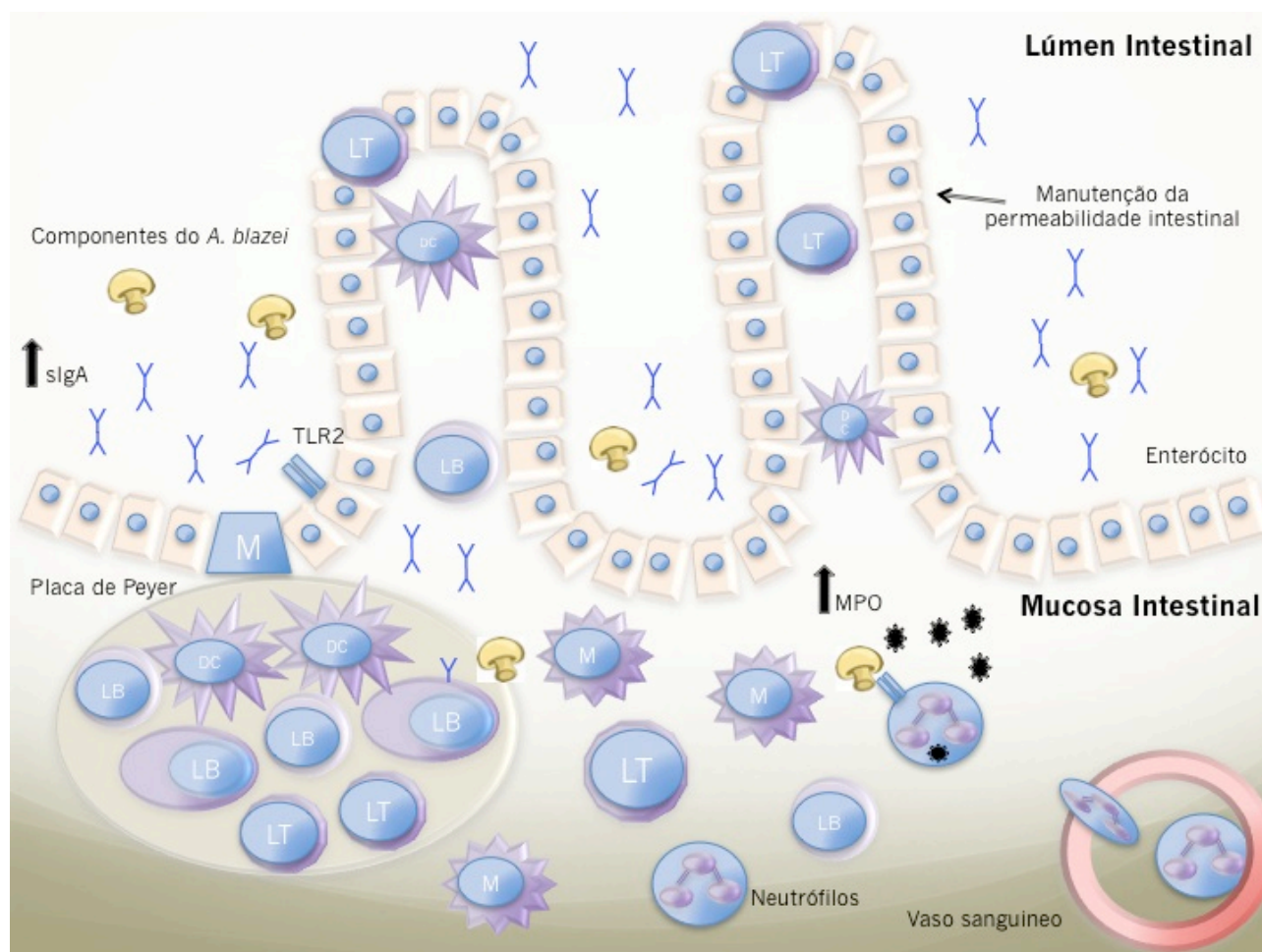


Figura 34: Ação do *A. blazei* no intestino.

M- células M; **LB-** Linfócitos B; **LT-** linfócitos T; **DC-** células dendríticas; **M-** monócito/macrófago; **sIgA** – IgA secretória; **MPO** – mieloperoxidase; **TLR2-** receptor toll do tipo 2.

Recentemente nota-se uma elevação no número de estudos que avaliam o envolvimento do baço em doenças inflamatórias visto o papel central desse órgão na regulação do sistema imunológico¹²⁵.

Em nosso trabalho, avaliamos em diferentes condições a ação da suplementação dietética com *A. blazei* nas células esplênicas. Nossos resultados mostram um aumento na população de linfócitos T $CD4^+CD44^{high}$, linfócitos duplo positivos $CD4^+CD8^+$ e de células NKT nas duas

linhagens de animais estudadas (C57BL/6 e apoE^{-/-}). Houve também um aumento na população de células CD11b⁺F4/80⁺, das citocinas TNF- α , IFN- γ e da atividade da enzima MPO, somente nos camundongos deficientes em apoE. Os efeitos do *A. blazei* no baço estão representados na **Figura 35**.

Após a estimulação antigênica, os linfócitos T ativados passam a expressar grande quantidade de CD44, o que faz dessa molécula um marcador de ativação tardia de linfócitos. A alta expressão de CD44 após a ativação permite que os linfócitos migrem para o sítio da inflamação¹²⁶. Nosso resultado mostra que antígenos do *A. blazei* aumentam a população de linfócitos T CD4⁺CD44^{high}, aumentando a migração destes para potenciais sítios inflamatórios.

Apesar de em nosso estudo, não ter sido avaliada a presença desse tipo celular nas lesões ateroscleróticas é muito provável que o estímulo inflamatório da placa aterosclerótica tenha promovido a migração dessas células para o subendotélio, agravando a aterosclerose. Após 6 semanas de tratamento, o grupo suplementado com *A. blazei* apresentou extensas áreas de lesão na válvula aórtica, as quais se agravaram por uma fina capa fibrosa e grandes áreas necróticas, o que sugere uma placa em estágio avançado comparada a lesões intermediárias vistas no grupo controle. No tempo de 12 semanas, o efeito pró-aterogênico do *A. blazei* foi proporcionalmente mais grave, uma vez que ocorreu um aumento de 81% em sua área, em comparação ao aumento observado após a 6 semanas de suplementação com *A. blazei*, o que é um aumento considerável para lesões ateroscleróticas.

Voltando ao baço, em relação ao aumento das populações de células NKT e células CD4⁺CD8⁺ duplo positivas, podemos considerar esse como um dos principais achados do presente estudo. Primeiramente porque pode ser correlacionado de forma direta com o efeito aqui demonstrado do agravamento da aterosclerose nos camundongos apoE. Segundo, porque é uma ligação com efeitos do *A. blazei* em diversos modelos experimentais, como também em estudos clínicos já descritos na literatura.

Células NKT, são uma subpopulação de linfócitos que expressam moléculas de superfície tanto características de linfócitos NK, quanto de linfócitos T. Desempenham diversas funções efetoras características de células T auxiliares e possuem pequena diversidade para antígenos na expressão das cadeias $\alpha\beta$ de seus TCRs. São células que reconhecem antígenos lipídicos apresentados por moléculas CD1¹⁴⁹, também consideradas um elo entre a imunidade inata e adaptativa.

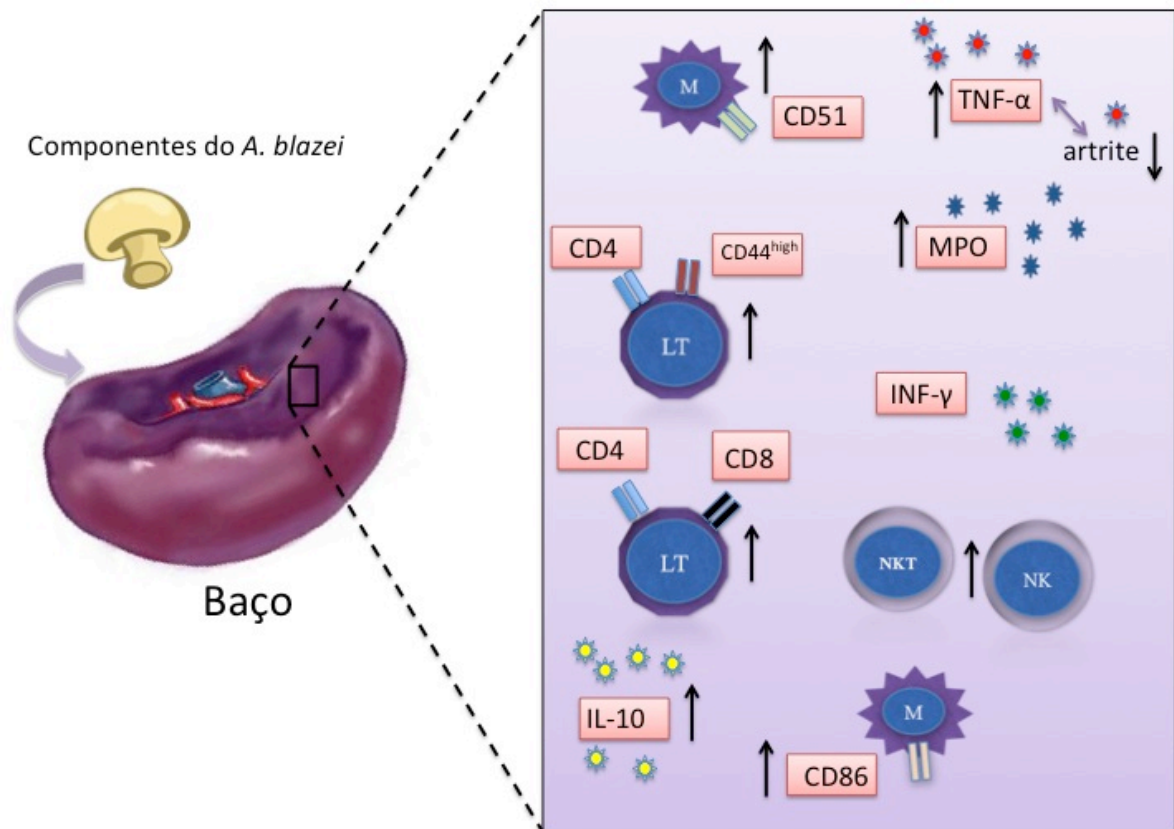


Figure 35: Ação do *A. blazei* no baço.

LT- linfócitos T; M- monócito/macrófago; MPO – mieloperoxidase; NKT- células *natural killer* T. NK- células *natural killer*.

O CD1 é expresso em timócitos $CD4^+CD8^+$, macrófagos e células dendríticas, sendo essas células importantes ativadoras de células NKT^{150; 151}. Também já foi demonstrada a ativação indireta de células NKT, por IL-12 proveniente de células dendríticas ativadas por receptores do tipo toll¹⁵².

Em nosso trabalho, a indução de células NKT foi concomitante ao aumento de células $CD4^+CD8^+$ nas duas linhagens pesquisadas (C57BL/6 e apoE^{-/-}), o que é coerente diante do papel das células $CD4^+CD8^+$ em induzir células NKT. No entanto, ainda devem ser elucidados fatores indutores dessa rara população de linfócitos duplo positivos.

Está descrito que nas lesões ateroscleróticas em animais apoE nocaute, as células NKT ativadas produzem citocinas como IFN- γ que regula diversos tipos celulares envolvidos no agravamento da aterogênese¹⁵³. Em nosso trabalho, detectamos aumento da secreção de IFN- γ em conjunto com o aumento das células NKT no baço de animais deficientes em apoE, e nossos dados apontam para uma repercussão no aumento na placa de ateroma uma vez que no arco aórtico, houve aumento na expressão gênica de VCAM-1, molécula de adesão que entre outros fatores é fortemente induzida por IFN- γ . Adicionalmente, o IFN- γ também é conhecido por contribuir para a

vulnerabilidade da placa, pois propicia a produção de metaloproteinase-9 (MMP-9), que degrada o conteúdo de colágeno da capa fibrosa ¹⁵⁴. Em nosso estudo, os altos níveis de IFN- γ no baço foram associados com a redução no conteúdo de colágeno na área da lesão aórtica e aumento da expressão MMP-9 na válvula aórtica de animais suplementados com *A. blazei*, reforçando os efeitos deletérios de *A. blazei* na aterosclerose. A exposição de monócitos e macrófagos ao IFN- γ pode aumentar a transcrição e expressão de TLR4 ¹⁵⁵ e também a captação mais eficiente de lipoproteínas e formação de células espumosas, via receptores *scavengers*. Em nosso trabalho, foi detectado um aumento considerável da transcrição dos receptores *scavengers* CD36, SRA-2 e do receptor do tipo toll 4 no arco aórtico, local principal de formação da placa de ateroma na aorta, causada pela suplementação com o *A. blazei*.

O receptor *scavenger* de classe B, CD36, está envolvido na endocitose de componentes endógenos modificados, como fosfolipídios oxidados e células apoptóticas. Apesar de sua importância no clareamento desses componentes endógenos, também ocorre ativação de vias inflamatórias por CD36, o que possibilita uma função ambígua desse receptor. Recente trabalho de Stewart, *et al.*, ¹⁵⁶ demonstrou que a ativação do receptor CD36 por LDL oxidada, um dos antígenos principais na formação da aterosclerose, induz a formação de heterodímeros com os receptores TLR4-TLR6, e por sua vez a junção de CD36-TLR4-TLR6 propaga o estímulo inflamatório, sendo que o bloqueio dessa via de sinalização impede a captação de LDL oxidada.

Nossos dados, demonstram o aumento concomitante da expressão gênica de CD36, TLR4 e também da área proporcional de células espumosas (macrófagos com grandes captação de LDL oxidada) na lesão aterosclerótica. Dessa forma, um dos prováveis mecanismos de ação do agravamento da aterogênese pelo *A. blazei* é via ativação do heterodímeros CD36-TLR4-TLR6, que culmina na via sinalizadora por NF κ B.

Como já foi mencionado, encontramos maior número de macrófagos/monócitos (CD11b⁺F4/80⁺) no baço e na circulação de camundongos deficientes em apoE, e essas células apresentaram maior expressão de CD86 e CD51. O co-estímulo gerado pela molécula CD86 (B7-2) é fundamental para a apresentação de antígenos por APCs e fornecem os sinais necessários para a ativação de linfócitos ¹⁵⁷. Dados mostram que a via de sinalização por CD86 pode regular a aterogênese e é um dos co-estímulos necessários para primar às células T antígeno específicas que agravam a aterosclerose ¹⁵⁷. Dessa forma, é facilmente entendida a atuação do *A. blazei* elevando a expressão de CD86 em fagócitos e isso aumentando a formação da placa de ateroma. Quanto ao CD54 (ICAM), está estabelecido sua influência em agravar lesões ateroscleróticas, por essa molécula, ser uma integrina expressa em leucócitos e no endotélio, que facilita a interação celular ¹⁵⁸.

Outro importante achado em nosso trabalho, foi o efeito do *A. blazei* sobre o aumento da população de neutrófilos circulantes (GR1/Ly6G⁺), como também a maior atividade de MPO no baço e aorta de camundongos deficientes em apoE. Este é o primeiro estudo que mostra diretamente o efeito de *A. blazei* sobre neutrófilos. Esses efeitos poderiam ser mediados via proteoglicanos¹⁵⁴ e β -glucanas¹⁵⁴, que são potentes estimuladores de macrófagos e células polimorfonucleares (PMN). Estudos de ativação da inflamação em lesões ateroscleróticas sugerem que neutrófilos possam contribuir na patogênese da doença¹⁵⁹. Os neutrófilos são os primeiros leucócitos a infiltrar tecidos inflamados, o que ocorre também durante a aterogênese espontânea, embora os macrófagos sejam a maioria dos leucócitos nas placas¹⁶⁰. Os números de neutrófilos e macrófagos na aorta aumentaram nos animais suplementados com *A. blazei* avaliados pela atividade de MPO e NAG, respectivamente. Enzimas pro-oxidativas derivadas de PMN como a MPO não só medeiam respostas inflamatórias agudas, como também catalisam reações que consomem o óxido nítrico vascular local, resultando em disfunção endotelial¹⁵⁴. Conseqüentemente, o aumento dos níveis de MPO na aorta é consistente com um aumento na circulação de neutrófilos e gravidade das lesões ateroscleróticas.

É bem estabelecido que a inflamação é uma das bases da aterosclerose¹⁶¹. Os efeitos pró-inflamatórios da suplementação por *A. blazei* exacerbaram o desenvolvimento da aterosclerose por aumento na inflamação local e sistêmica. Outros fatores ligados à aterogênese, como a concentrações de lipoproteínas séricas, estresse oxidativo e glicemia não foram influenciados pela suplementação com *A. blazei*, como demonstrado anteriormente por nosso grupo. Por essa razão, nós sugerimos que a estimulação de células NK/NKT, linfócitos CD4⁺CD8⁺, linfócitos CD4⁺, neutrófilos e macrófagos dispararam a formação da placa aterosclerótica no nosso modelo. Juntos, esses achados sugerem que o *A. blazei* atua facilitando o recrutamento de leucócitos e estimulando a resposta inflamatória do tipo TH1, um importante componente para o agravamento da aterogênese.

Os efeitos do *A. blazei* na aterogênese em camundongos apoE^{-/-} estão representados na **Figura 36**.

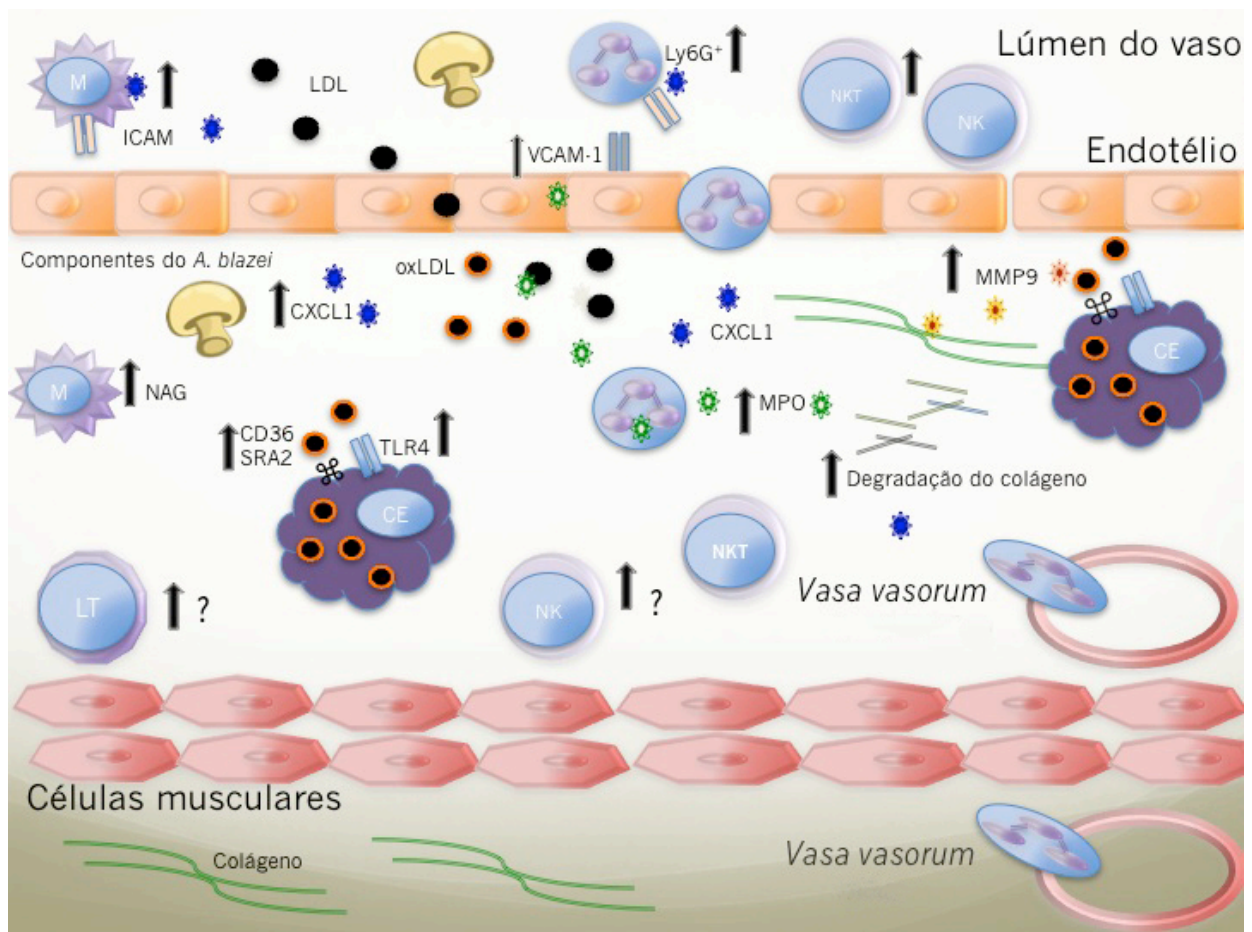


Figure 36: Ação do *A. blazei* na aterogênese.

De maneira surpreendente, ao estudarmos o modelo de artrite induzida por antígeno (mBSA), caracterizado também como um modelo inflamatório agudo, que mimetiza a fase ativa da doença em humanos, o tratamento com *A. blazei* repercutiu na redução de alguns parâmetros inflamatórios observados, como o número de neutrófilos na cavidade articular e consequentemente, os mediadores inflamatórios produzidos por essa célula. Dados já publicados pelo nosso grupo demonstraram que a presença dos neutrófilos na cavidade articular esta associada com patogênese da artrite²⁰. Nesse mesmo trabalho, foi demonstrado que o bloqueio do receptor da quimiocina CXCR2 reduz o recrutamento do neutrófilo para a cavidade articular, e essa redução é associada a diminuição do rolamento e adesão dos leucócitos na microvasculatura do joelho²⁰.

Apesar de ter sido observado que o tratamento com o *A. blazei* aumentou a expressão de CXCR2 em neutrófilos na circulação no presente estudo, observamos uma redução do recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular após o estímulo com o antígeno mBSA. Podemos sugerir que esse menor recrutamento foi devido a diminuição da adesão dos neutrófilos. E essa menor adesão pode ser devida a reduzida produção das quimiocinas CXCL1/CXCL2 ligantes do receptor CXCR2, nos animais tratados com *A. blazei* e com artrite. Nossos dados sugerem, que mesmo

diante da maior expressão de CXCR2 em neutrófilos circulantes nos animais desafiados, a ausência dos fatores quimiotáticos impediu a migração eficaz para a cavidade articular.

Esses dados, são divergentes com dados da literatura que demonstram a capacidade do *A. blazei* em estimular a produção de mediadores pró-inflamatórios por granulócitos e macrófagos humanos *ex vivo*¹⁶². Especulamos que essa diferença de ação do *A. blazei* na produção de mediadores inflamatórios, está correlacionada com o grau de ativação celular. Células não estimuladas, após o primeiro contato com antígenos do *A. blazei* passam a produzir mediadores pró-inflamatórios. No entanto, quando essas células já estão primadas, como no nosso trabalho, em que imunizamos com adjuvante de Freund e desafiámos com mBSA, o estímulo dietético persistente com antígenos do *A. blazei* passa a ser secundário e pode levar a uma hiporresponsividade das células. Temos um indício dessa nossa constatação quando analisamos o padrão diferenciado da produção *ex vivo* de TNF- α gerada pelo *A. blazei* em cultura de esplenócitos, no qual foi observado que em esplenócitos de animais imunizados, desafiados com mBSA, tratados com *A. blazei* e reestimulados na cultura com mBSA houve redução na produção de TNF- α quando comparamos com os esplenócitos de animais não desafiados com mBSA. A redução na produção de citocinas e quimiocinas pelo tratamento com *A. blazei*, pelas células do sangue periférico de pacientes com Colite e doença de Crohn foi demonstrada por Forland, *et al.*,¹⁴⁷ e justificada como um efeito anti-inflamatório desse fungo. No entanto, estes efeitos podem também estar associados com a constatação sugerida anteriormente da hiporresponsividade causada pelo estímulo antigênico do *A. blazei*.

Um fenômeno semelhante ao observado em nosso estudo, tem sido descrito em infecções virais persistentes em que o contato contínuo com o antígeno por um período prolongado causa exaustão nas funções efetoras de células T, e uma das primeiras falências dessas células, consiste na diminuição da produção de TNF- α ^{163; 164}. A exaustão de células T parece ser desencadeada e mantida pela IL-10, além de outros fatores como o TGF- β ^{163; 164}. Em nosso trabalho, demonstramos que em animais não desafiados existe também um aumento na produção de IL-10 por esplenócitos, o que pode ter precedido o desafio intraarticular de mBSA. Outra questão que deve ser pontuada, é que entre as moléculas que fazem parte do fenótipo de células T exaustas está a alta expressão de CD44¹⁶⁴, que demonstramos estar aumentada pelo tratamento com *A. blazei* nas células CD4⁺ do baço de animais selvagens como também de animais apoE^{-/-}. Dessa forma, em conjunto, nossos dados apontam para uma potencial exaustão de células CD4⁺ no modelo de AIA, mas essa possibilidade não foi confirmada uma vez que não avaliamos o fenótipo de células T nesse modelo. É importante ressaltar que a magnitude da apresentação antigênica está intimamente ligada ao fenômeno de exaustão de células T¹⁶³, e se compararmos o modelo de AIA, em que procedemos com a imunização com adjuvante de Freund que favorece uma intensa apresentação de antígenos,

ao modelo de aterosclerose, no camundongo apoE^{-/-}, em que a apresentação antigênica acontece de forma gradual, podemos hipotetizar sobre os fatores que levaram às diferenças na produção do TNF- α pelas células esplênicas nas duas condições.

Outra hipótese para a redução do número de neutrófilos na cavidade articular, é um efeito pró-resolutivo, portanto anti-inflamatório do *A. blazei*. No nosso estudo, dois resultados nos permitem especular sobre essa ação; o primeiro a redução na produção da citocina pró-inflamatória IL-1 β e o segundo o aumento da morte celular na cavidade articular. O influxo de neutrófilos para as articulações é um dos principais eventos no estabelecimento da artrite, e no modelo de AIA, a resolução desse processo, entendida como a indução da apoptose de neutrófilos^{165; 166}, já foi demonstrada por nosso grupo como uma potencial estratégia terapêutica para o controle da artrite¹⁰⁷. Porém, não podemos afirmar categoricamente que o *A. blazei* induz a resolução, por não termos determinado o tipo de morte celular como também não termos dosados mediadores característicos do processo resolutivo como IL-10¹⁶⁷, TGF- β ¹⁶⁸ dentre outros, no tecido periarticular.

Considerando a potencial capacidade do *A. blazei* em induzir morte celular^{17; 169; 170; 171}, que está bem demonstrada na literatura, podemos sugerir um fenômeno único que direciona o entendimento do efeito desse fungo nos dois modelos utilizados no presente estudo. Sendo assim, na artrite, a morte celular na cavidade articular limitaria a produção dos mediadores inflamatórios que perpetuam a doença e na aterosclerose, a mesma morte celular nos momentos iniciais da formação da placa aumentaria a aterogênese, como já demonstrado na literatura.

Outra observação interessante, foi de que no presente estudo, detectamos um aumento de células mononucleares na cavidade articular de animais não desafiados. Se considerarmos esse evento, como antecedente ao infiltrado de neutrófilos nos animais desafiados com mBSA, também poderemos especular um aumento do clareamento de neutrófilos, vista a fundamental importância das células mononucleares em desempenhar essa função¹⁶⁵. Essa hipótese também está de acordo com os resultados obtidos. No modelo de aterosclerose, detectamos a ação do *A. blazei* em aumentar a atividade de macrófagos/monócitos, vista pelo aumento na expressão de moléculas co-estimuladoras como também no aumento da expressão de receptores scavengers, responsáveis entre outras funções, pela fagocitose de células em apoptose. Recente trabalho, demonstram que na artrite, um aumento na expressão de CD36 em condrócitos está correlacionada com preservação de proteoglicanos da cartilagem e menor destruição óssea¹⁷². Em macrófagos o CD36 aumenta a fagocitose de neutrófilos¹⁷³ e conseqüentemente diminui a produção de IL1- β . Dessa forma, a ativação da fagocitose de neutrófilos por macrófagos na cavidade articular, é outro potencial mecanismo de ação do *A. blazei* no modelo de AIA.

Em nosso trabalho, apesar da significativa redução dos parâmetros inflamatórios na cavidade articular e alguns no tecido periarticular, não podemos afirmar que o *A. blazei* tem um efeito benéfico na artrite, uma vez que em sinais da doença como dor, atividade de MPO no tecido periarticular e o índice de artrite não foram influenciados pela suplementação com *A. blazei*. Acreditamos que é necessária a avaliação dos efeitos do *A. blazei* em outros modelos para o estudo da artrite, como por exemplo o modelo crônico em ratas. Na **Figura 37** estão sumarizados os principais efeitos do *A. blazei* no modelo de AIA.

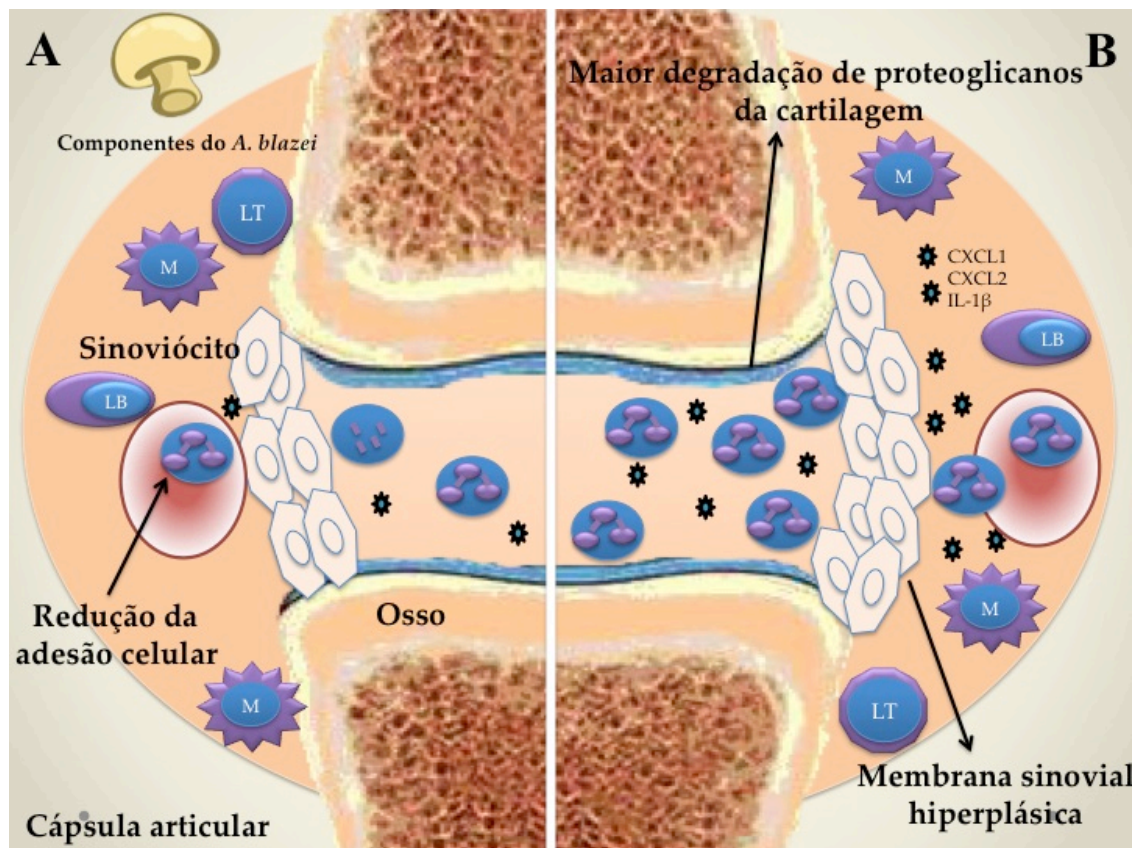


Figure 37: Ação do *A. blazei* na artrite.

Em conclusão, este é o primeiro estudo demonstrando que o efeito imunestimulador da suplementação por *A. blazei* possui repercussões pró-inflamatórias, consequentemente promovendo efeitos deletérios na evolução da aterosclerose. Esta suplementação é capaz de ativar células imunes no baço, o que resulta em uma ativação sustentada e infiltração de monócitos e neutrófilos para os sítios da aterosclerose. Nestes, o aumento da expressão de importantes moléculas envolvidas na formação de células espumosas, adesão leucocitária e degradação da capa fibrosa ocorrem, culminando em uma avançada e vulnerável placa aterosclerótica. Já no modelo de artrite, um modelo de doença inflamatória aguda, acreditamos que a imunestimulação, especificamente em neutrófilos, gerou um estado de ativação aumentado, que teve como consequências a aceleração da morte dessas células. A partir desse evento inicial, os mediadores responsáveis pela propagação da

resposta inflamatória, foram reduzidos, reduzindo então a migração para a cavidade articular. Posteriores estudos são necessários para esclarecer os efeitos do *A. blazei* na artrite.

7. RESULTADOS SUPLEMENTARES

7.1 Resultado suplementar I – Efeito do *Agaricus Blazei* na produção de IgA secretória em animais TLR2^{-/-}.

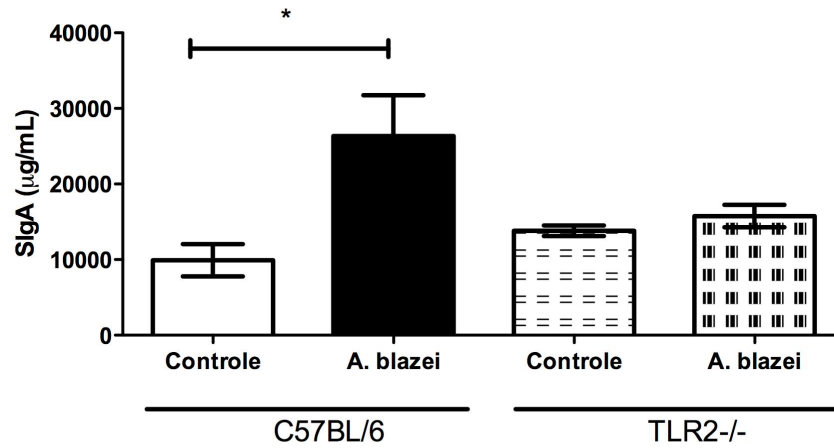


Figura suplementar 1: Animais TLR2^{-/-} tratados com *A. blazei* não aumentam a produção de sIgA como é observado no camundongos C57BL/6.

Para avaliar o protocolo utilizado, verificar seção 4.4.2. Não houve aumento da secreção de IgA, após duas semanas de tratamento com *A. blazei*, ao contrário do observado na linhagem C57BL/6. Os resultados mostram que o estímulo para a produção de *A. blazei* é dependente do receptor toll tipo 2. Barras representam a mediana e linhas verticais representam a variação. * p<0.05.

7.2 Resultado suplementar II - *Agaricus blazei* no modelo de mucosite induzida por quimioterápico (Cloridrato de irinotecano) em camundongo balb/c.

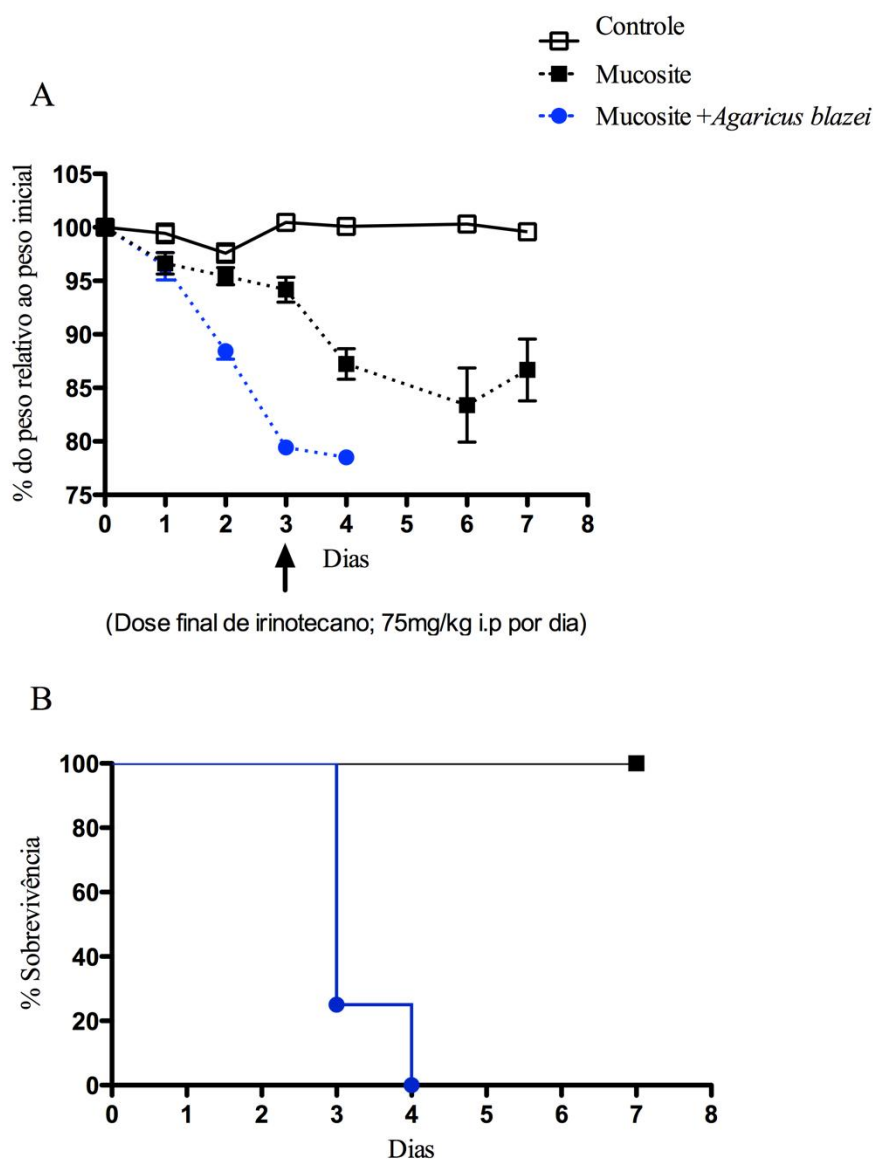


Figura suplementar 2: Animais tratados com *A. blazei* são mais susceptíveis ao modelo de mucosite induzida por Irinotecano. Camundongos Balb/c receberam uma dieta enriquecida com *Agaricus blazei* (5%) 7 dias antes e durante a indução da mucosite. Camundongos controles foram submetidos a dieta comercial. Para a indução da mucosite, os camundongos receberam doses diárias de Cloridrato de irinotecano (dose de 75mg/kg) por via intraperitoneal durante 4 dias a contar do dia 0 e foram acompanhados até o 7º dia após o início da indução da mucosite. (A) A perda de peso é um dos parâmetros clínicos importantes apresentados no modelo de mucosite. Os animais que receberam dieta com *A. blazei* e desafiados com o Irinotecano, apresentaram uma maior perda de peso quando comparados aos animais não tratados e que foram desafiados com irinotecano. (B) Enquanto 100% dos animais desafiados com irinotecano sobreviveram ao estímulo com irinotecano, os animais que receberam dieta com *A. blazei* e subsequentemente foram desafiados com Irinotecano, morreram em até 4 dias após o desafio. Para todas as análises n=5. **p<0,01.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ JAMES, J. W. Longitudinal study of the morbidity of diarrheal and respiratory infections in malnourished children. **Am J Clin Nutr**, v. 25, n. 7, p. 690-4, Jul 1972. ISSN 0002-9165 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4624650 >.
- ² CHANDRA, R. K. Nutrition and immunology: from the clinic to cellular biology and back again. **Proc Nutr Soc**, v. 58, n. 3, p. 681-3, Aug 1999. ISSN 0029-6651 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10604203 >.
- ³ WAITZBERG, D. L.; CAIAFFA, W. T.; CORREIA, M. I. Hospital malnutrition: the Brazilian national survey (IBRANUTRI): a study of 4000 patients. **Nutrition**, v. 17, n. 7-8, p. 573-80, Jul-Aug 2001. ISSN 0899-9007 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11448575 >.
- ⁴ CAMARGO, A. et al. Expression of proinflammatory, proatherogenic genes is reduced by the Mediterranean diet in elderly people. **Br J Nutr**, p. 1-9, Nov 15 2011. ISSN 1475-2662 (Electronic) 0007-1145 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22085595> >.
- ⁵ ZUNINO, S. J. et al. Effects of dietary strawberry powder on blood lipids and inflammatory markers in obese human subjects. **Br J Nutr**, p. 1-10, Nov 9 2011. ISSN 1475-2662 (Electronic) 0007-1145 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22068016> >.
- ⁶ LAUGERETTE, F. et al. Oil composition of high fat diet affects differently metabolic inflammation in connection with endotoxin receptors in mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, Nov 15 2011. ISSN 1522-0193-1849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22094473> >.
- ⁷ FIRENZUOLI, F.; GORI, L.; LOMBARDO, G. The Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murrill: Review of Literature and Pharmacological Problems. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 5, n. 1, p. 3-15, Mar 2008. ISSN 1741-427X (Print) 1741-427X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18317543> >.
- ⁸ LULL, C.; WICHERS, H. J.; SAVELKOUL, H. F. Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. **Mediators Inflamm**, v. 2005, n. 2, p. 63-80, Jun 9 2005. ISSN 0962-9351 (Print) 0962-9351 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16030389> >.
- ⁹ KIMURA, Y. et al. Isolation of an anti-angiogenic substance from *Agaricus blazei* Murill: its antitumor and antimetastatic actions. **Cancer Sci**, v. 95, n. 9, p. 758-64, Sep 2004. ISSN 1347-9032 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15471563 >.
- ¹⁰ FORLAND, D. T. et al. An extract based on the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill stimulates monocyte-derived dendritic cells to cytokine and chemokine production in vitro. **Cytokine**, v. 49, n. 3, p. 245-50, Mar 2010. ISSN 1096-0023 (Electronic) 1043-4666 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20036142> >.
- ¹¹ LIMA, C. U. et al. *Agaricus blazei* Murrill and inflammatory mediators in elderly women: a randomized clinical trial. **Scand J Immunol**, Oct 19 2011. ISSN 1365-3083 (Electronic) 0300-9475 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22010847> >.
- ¹² BERNARDSHAW, S. et al. An extract of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill differentially stimulates production of pro-inflammatory cytokines in human monocytes and human vein endothelial cells in vitro. **Inflammation**, v. 29, n. 4-6, p. 147-53, Dec 2005. ISSN 0360-3997 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17091395 >.
- ¹³ WU, M. F. et al. Possible reduction of hepatoma formation by Smmu 7721 cells in SCID mice and metastasis formation by B16F10 melanoma cells in C57BL/6 mice by *Agaricus blazei* murill extract. **In Vivo**, v. 25, n. 3, p. 399-404, May-Jun 2011. ISSN 1791-7549 (Electronic)

- 0258-851X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21576414> >.
- ¹⁴ EBINA, T.; FUJIMIYA, Y. Antitumor effect of a peptide-glucon preparation extracted from *Agaricus blazei* in a double-grafted tumor system in mice. **Biotherapy**, v. 11, n. 4, p. 259-65, 1998. ISSN 0921-299X (Print) 0921-299X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9950102> >.
- ¹⁵ ITO, H. et al. Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade strain 101) "Himematsutake" and its mechanisms in tumor-bearing mice. **Anticancer Res**, v. 17, n. 1A, p. 277-84, Jan-Feb 1997. ISSN 0250-7005 (Print) 0250-7005 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9066665> >.
- ¹⁶ ITOH, H. et al. Inhibitory action of a (1->6)-beta-D-glucon-protein complex (F III-2-b) isolated from *Agaricus blazei* Murill ("himematsutake") on Meth A fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor mechanism. **Jpn J Pharmacol**, v. 66, n. 2, p. 265-71, Oct 1994. ISSN 0021-5198 (Print) 0021-5198 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7869611> >.
- ¹⁷ SU, Z. Y. et al. Blazeispirol A from *Agaricus blazei* fermentation product induces cell death in human hepatoma Hep 3B cells through caspase-dependent and caspase-independent pathways. **J Agric Food Chem**, v. 59, n. 9, p. 5109-16, May 11 2011. ISSN 1520-5118 (Electronic) 0021-8561 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21417302> >.
- ¹⁸ ROSS, R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. **Am Heart J**, v. 138, n. 5 Pt 2, p. S419-20, Nov 1999. ISSN 0002-8703 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10539839 >.
- ¹⁹ **Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control**. Geneva: World Health Organization 2011. ISBN 978 92 4 156437 3.
- ²⁰ COELHO, F. M. et al. The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. **Arthritis Rheum**, v. 58, n. 8, p. 2329-37, Aug 2008. ISSN 0004-3591 (Print) 0004-3591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18668539> >.
- ²¹ PRIOR, P. et al. Cause of death in rheumatoid arthritis. **Br J Rheumatol**, v. 23, n. 2, p. 92-9, May 1984. ISSN 0263-7103 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6722416 >.
- ²² SYMMONS, D. P. Ischemic stroke: another feature of accelerated atherosclerosis in rheumatoid arthritis? **Arthritis Rheum**, v. 59, n. 8, p. 1051-3, Aug 15 2008. ISSN 0004-3591 (Print) 0004-3591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18668582> >.
- ²³ MIRJAFARI, H.; AL-HUSAIN, A.; BRUCE, I. N. Cardiovascular risk factors in inflammatory arthritis. **Curr Opin Lipidol**, v. 22, n. 4, p. 296-301, Aug 2011. ISSN 1473-6535 (Electronic) 0957-9672 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21670670> >.
- ²⁴ CRILLY, M. A. et al. Arterial stiffness and cumulative inflammatory burden in rheumatoid arthritis: a dose-response relationship independent of established cardiovascular risk factors. **Rheumatology (Oxford)**, v. 48, n. 12, p. 1606-12, Dec 2009. ISSN 1462-0332 (Electronic) 1462-0324 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19858120> >.
- ²⁵ HETLAND, G. et al. The Mushroom *Agaricus blazei* Murill Elicits Medicinal Effects on Tumor, Infection, Allergy, and Inflammation through Its Modulation of Innate Immunity and Amelioration of Th1/Th2 Imbalance and Inflammation. **Adv Pharmacol Sci**, v. 2011, p. 157015, 2011. ISSN 1687-6342 (Electronic) 1687-6334 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21912538> >.
- ²⁶ HETLAND, G. et al. Effects of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill on immunity, infection and cancer. **Scand J Immunol**, v. 68, n. 4, p. 363-70, Oct 2008. ISSN 1365-3083 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18782264 >.

- 27 KAWAGISHI, H. et al. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of Agaricus blazei fruiting bodies. **Carbohydr Res**, v. 186, n. 2, p. 267-73, Mar 15 1989. ISSN 0008-6215 (Print). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2736561 >.
- 28 LIU, Y. et al. Immunomodulating Activity of Agaricus brasiliensis KA21 in Mice and in Human Volunteers. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 5, n. 2, p. 205-219, Jun 2008. ISSN 1741-427X (Print). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18604247 >.
- 29 TAKAKU, T.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Isolation of an antitumor compound from Agaricus blazei Murill and its mechanism of action. **J Nutr**, v. 131, n. 5, p. 1409-13, May 2001. ISSN 0022-3166 (Print). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11340091 >.
- 30 KIM, G. Y. et al. Effect of water-soluble proteoglycan isolated from Agaricus blazei on the maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells. **Int Immunopharmacol**, v. 5, n. 10, p. 1523-32, Sep 2005. ISSN 1567-5769 (Print) 1567-5769 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16023604> >.
- 31 KASAI, H. et al. IL-12 Production Induced by Agaricus blazei Fraction H (ABH) Involves Toll-like Receptor (TLR). **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 1, n. 3, p. 259-267, Dec 2004. ISSN 1741-4288 (Electronic) 1741-427X (Linking). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15841259 >.
- 32 SORIMACHI, K. et al. Secretion of TNF-alpha, IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with Agaricus blazei Murill fractions in vitro. **Cell Struct Funct**, v. 26, n. 2, p. 103-8, Apr 2001. ISSN 0386-7196 (Print). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11482452 >.
- 33 YUMINAMOCHI, E. et al. Interleukin-12- and interferon-gamma-mediated natural killer cell activation by Agaricus blazei Murill. **Immunology**, v. 121, n. 2, p. 197-206, Jun 2007. ISSN 0019-2805 (Print) 0019-2805 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17346284> >.
- 34 ZHONG, M.; TAI, A.; YAMAMOTO, I. In vitro augmentation of natural killer activity and interferon-gamma production in murine spleen cells with Agaricus blazei fruiting body fractions. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 69, n. 12, p. 2466-9, Dec 2005. ISSN 0916-8451 (Print). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16377912 >.
- 35 ELLERTSEN, L. K. et al. Effect of a medicinal extract from Agaricus blazei Murill on gene expression in a human monocyte cell line as examined by microarrays and immuno assays. **Int Immunopharmacol**, v. 6, n. 2, p. 133-43, Feb 2006. ISSN 1567-5769 (Print). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16399618 >.
- 36 KAWAMURA, M. et al. Antithetical effects of hemicellulase-treated Agaricus blazei on the maturation of murine bone-marrow-derived dendritic cells. **Immunology**, v. 114, n. 3, p. 397-409, Mar 2005. ISSN 0019-2805 (Print) 0019-2805 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15720441> >.
- 37 CHOI, Y. H. et al. Inhibitory effects of Agaricus blazei on mast cell-mediated anaphylaxis-like reactions. **Biol Pharm Bull**, v. 29, n. 7, p. 1366-71, Jul 2006. ISSN 0918-6158 (Print) 0918-6158 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16819170> >.
- 38 ROSS, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. **N Engl J Med**, v. 340, n. 2, p. 115-26, Jan 14 1999. Disponível em: <

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9887164 >.
- 39 LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 868-74, Dec 19-26 2002. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12490960 >.
- 40 SCOTT, J. Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. **Curr Opin Genet Dev**, v. 14, n. 3, p. 271-9, Jun 2004. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15172670 >.
- 41 WITZTUM, J. L. Role of oxidised low density lipoprotein in atherogenesis. **Br Heart J**, v. 69, n. 1 Suppl, p. S12-8, Jan 1993. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8427759 >.
- 42 STEFFENS, S.; MACH, F. Inflammation and atherosclerosis. **Herz**, v. 29, n. 8, p. 741-8, Dec 2004. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15599670 >.
- 43 BERLINER, J. A. et al. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. **Circulation**, v. 91, n. 9, p. 2488-96, May 1 1995. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7729036 >.
- 44 NAVAB, M. et al. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 16, n. 7, p. 831-42, Jul 1996. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8673557 >.
- 45 SHIH, P. T. et al. Minimally modified low-density lipoprotein induces monocyte adhesion to endothelial connecting segment-1 by activating α_1 integrin. **J Clin Invest.**, v. 103, p. 613-625, 1999.
- 46 DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis. **Int J Clin Lab Res**, v. 26, n. 3, p. 178-84, 1996. ISSN 0940-5437 (Print) 0940-5437 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8905449> >.
- 47 YANG, X. et al. Oxidized low density lipoproteins alter macrophage lipid uptake, apoptosis, viability and nitric oxide synthesis. **J Nutr**, v. 126, n. 4 Suppl, p. 1072S-5S, Apr 1996. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8642435 >.
- 48 MITCHINSON, M. J.; BALL, R. Y. Macrophages and atherogenesis. **Lancet**, v. 2, n. 8551, p. 146-8, Jul 18 1987. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2885606 >.
- 49 LUSIS, A. J. Atherosclerosis. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 233-41, Sep 14 2000. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11001066 >.
- 50 GLASS, C. K.; WITZTUM, J. L. Atherosclerosis. the road ahead. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 503-16, Feb 23 2001. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11239408 >.
- 51 JIALAL, I.; DEVARAJ, S. Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. **Clin Chem**, v. 42, n. 4, p. 498-506, Apr 1996. ISSN 0009-9147 (Print) 0009-9147 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8605665> >.

- 52 MULLER, W. A. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. **Lab Invest**, v. 82, n. 5, p. 521-33, May 2002. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12003992 >.
- 53 KITAGAWA, K. et al. Involvement of ICAM-1 in the progression of atherosclerosis in APOE-knockout mice. **Atherosclerosis**, v. 160, n. 2, p. 305-10, Feb 2002. ISSN 0021-9150 (Print) 0021-9150 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11849652> >.
- 54 DAVIES, M. J. et al. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. **J Pathol**, v. 171, n. 3, p. 223-9, Nov 1993. ISSN 0022-3417 (Print) 0022-3417 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7506307> >.
- 55 CARLOS, T. M.; HARLAN, J. M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. **Blood**, v. 84, n. 7, p. 2068-101, Oct 1 1994. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7522621 >.
- 56 KHAN, B. V. et al. Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. **J Clin Invest**, v. 95, n. 3, p. 1262-70, Mar 1995. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7533787 >.
- 57 CHEN, C. et al. Tumor necrosis factor alpha-induced activation of downstream NF-kappaB site of the promoter mediates epithelial ICAM-1 expression and monocyte adhesion. Involvement of PKCalpha, tyrosine kinase, and IKK2, but not MAPKs, pathway. **Cell Signal**, v. 13, n. 8, p. 543-53, Aug 2001. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11483407 >.
- 58 TAKEI, A.; HUANG, Y.; LOPES-VIRELLA, M. F. Expression of adhesion molecules by human endothelial cells exposed to oxidized low density lipoprotein. Influences of degree of oxidation and location of oxidized LDL. **Atherosclerosis**, v. 154, n. 1, p. 79-86, Jan 2001. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11137085 >.
- 59 VIELMA, S. A.; KRINGS, G.; LOPES-VIRELLA, M. F. Chlamydia pneumoniae induces ICAM-1 expression in human aortic endothelial cells via protein kinase C-dependent activation of nuclear factor-kappaB. **Circ Res**, v. 92, n. 10, p. 1130-7, May 30 2003. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12714566 >.
- 60 LIUBA, P. et al. Endothelial dysfunction after repeated Chlamydia pneumoniae infection in apolipoprotein E-knockout mice. **Circulation**, v. 102, n. 9, p. 1039-44, Aug 29 2000. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10961970 >.
- 61 MICHAILOWSKY, V. et al. Intercellular adhesion molecule 1 deficiency leads to impaired recruitment of T lymphocytes and enhanced host susceptibility to infection with Trypanosoma cruzi. **J Immunol**, v. 173, n. 1, p. 463-70, Jul 1 2004. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15210806 >.
- 62 CHIA, M. C. The role of adhesion molecules in atherosclerosis. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 35, n. 6, p. 573-602, Dec 1998. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9885776 >.
- 63 RAINES, E. W.; ROSS, R. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. **Br Heart J**, v. 69, n. 1 Suppl, p. S30-7, Jan 1993. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8427762 >.

- 64 NELKEN, N. A. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. **J Clin Invest**, v. 88, n. 4, p. 1121-7, Oct 1991. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1843454 >.
- 65 HANSSON, G. K. Cell-mediated immunity in atherosclerosis. **Curr Opin Lipidol**, v. 8, n. 5, p. 301-11, Oct 1997. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9335954 >.
- 66 ROSS, R. Cell biology of atherosclerosis. **Annu Rev Physiol**, v. 57, p. 791-804, 1995. ISSN 0066-4278 (Print) 0066-4278 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7778883> >.
- 67 ROSS, R. Growth regulatory mechanisms and formation of the lesions of atherosclerosis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 748, p. 1-4; discussion 4-6, Jan 17 1995. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7695158> >.
- 68 DAVIES, M. J.; WOOLF, N. Atherosclerosis: what is it and why does it occur? **Br Heart J**, v. 69, n. 1 Suppl, p. S3-11, Jan 1993. ISSN 0007-0769 (Print) 0007-0769 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8427761> >.
- 69 JOHNSON, J. L. et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-3 activates MMP-9 mediated vascular smooth muscle cell migration and neointima formation in mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 31, n. 9, p. e35-44, Sep 2011. ISSN 1524-4636 (Electronic) 1079-5642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21719762> >.
- 70 ESAKI, T. et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in T lymphocytes and macrophages of cholesterol-fed rabbits. **Atherosclerosis**, v. 128, n. 1, p. 39-46, Jan 3 1997. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9051196 >.
- 71 SATA, M. Role of chronic inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis. **Nihon Yakurigaku Zasshi**, v. 138, n. 5, p. 182-6, Nov 2011. ISSN 0015-5691 (Print) 0015-5691 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22075459> >.
- 72 BINDER, C. J. et al. Innate and acquired immunity in atherogenesis. **Nature Medicine**, v. 8, p. 1218-1226, 2002.
- 73 DANSKY, H. M. et al. T and B lymphocytes play a minor role in atherosclerotic plaque formation in the apolipoprotein E-deficient mouse. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 9, p. 4642-6, Apr 29 1997. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9114044> >.
- 74 REARDON, C. A. et al. Effect of immune deficiency on lipoproteins and atherosclerosis in male apolipoprotein E-deficient mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 21, n. 6, p. 1011-6, Jun 2001. ISSN 1524-4636 (Electronic) 1079-5642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11397712> >.
- 75 ROSELAAR, S. E.; KAKKANATHU, P. X.; DAUGHERTY, A. Lymphocyte populations in atherosclerotic lesions of apoE ^{-/-} and LDL receptor ^{-/-} mice. Decreasing density with disease progression. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 16, n. 8, p. 1013-8, Aug 1996. ISSN 1079-5642 (Print) 1079-5642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8696940> >.
- 76 ZHOU, X.; STEMME, S.; HANSSON, G. K. Evidence for a local immune response in atherosclerosis. CD4⁺ T cells infiltrate lesions of apolipoprotein-E-deficient mice. **Am J Pathol**, v. 149, n. 2, p. 359-66, Aug 1996. ISSN 0002-9440 (Print) 0002-9440 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8701976> >.
- 77 GU, L. et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. **Mol Cell**, v. 2, n. 2, p. 275-81, Aug 1998. ISSN 1097-2765 (Print) 1097-2765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9734366> >.

- ⁷⁸ UYEMURA, K. et al. Cross-regulatory roles of interleukin (IL)-12 and IL-10 in atherosclerosis. **J Clin Invest**, v. 97, n. 9, p. 2130-8, May 1 1996. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8621803> >.
- ⁷⁹ GUPTA, S. et al. IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. **J Clin Invest**, v. 99, n. 11, p. 2752-61, Jun 1 1997. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9169506> >.
- ⁸⁰ WATANABE, T.; HARAOKA, S.; SHIMOKAMA, T. Inflammatory and immunological nature of atherosclerosis. **Int J Cardiol**, v. 54 Suppl, p. S51-60, Aug 1996. ISSN 0167-5273 (Print) 0167-5273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9119527> >.
- ⁸¹ HANSSON, G. K.; HERMANSSON, A. The immune system in atherosclerosis. **Nat Immunol**, v. 12, n. 3, p. 204-12, Mar 2011. ISSN 1529-2916 (Electronic) 1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21321594> >.
- ⁸² FIRESTEIN, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 356-61, May 15 2003. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12748655> >.
- ⁸³ GONZALEZ-GAY, M. A.; GONZALEZ-JUANATEY, C.; MARTIN, J. The increased risk of ventricular diastolic dysfunction and congestive heart failure in patients with rheumatoid arthritis is independent of the duration of the disease. **Semin Arthritis Rheum**, v. 35, n. 2, p. 132-3, Oct 2005. ISSN 0049-0172 (Print) 0049-0172 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16194698> >.
- ⁸⁴ GONZALEZ-GAY, M. A. et al. High-grade C-reactive protein elevation correlates with accelerated atherogenesis in patients with rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**, v. 32, n. 7, p. 1219-23, Jul 2005. ISSN 0315-162X (Print) 0315-162X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15996055> >.
- ⁸⁵ MCINNES, I. B.; SCHETT, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 6, p. 429-42, Jun 2007. ISSN 1474-1733 (Print) 1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17525752> >.
- ⁸⁶ TANEJA, V.; DAVID, C. S. Role of HLA class II genes in susceptibility/resistance to inflammatory arthritis: studies with humanized mice. **Immunol Rev**, v. 233, n. 1, p. 62-78, Jan 2010. ISSN 1600-065X (Electronic) 0105-2896 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20192993> >.
- ⁸⁷ LUBBERTS, E.; KOENDERS, M. I.; VAN DEN BERG, W. B. The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. **Arthritis Res Ther**, v. 7, n. 1, p. 29-37, 2005. ISSN 1478-6362 (Electronic) 1478-6354 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15642151> >.
- ⁸⁸ ZWERINA, K. et al. Anti IL-17A therapy inhibits bone loss in TNF-alpha mediated murine arthritis by modulation of T-cell balance. **Eur J Immunol**, Nov 21 2011. ISSN 1521-4141 (Electronic) 0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22101928> >.
- ⁸⁹ LEANDRO, M. J.; BECERRA-FERNANDEZ, E. B-cell therapies in established rheumatoid arthritis. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 25, n. 4, p. 535-48, Aug 2011. ISSN 1532-1770 (Electronic) 1521-6942 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22137923> >.
- ⁹⁰ SELLAM, J. et al. Blood memory B cells are disturbed and predict the response to rituximab in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 63, n. 12, p. 3692-701, Dec 2011. ISSN 1529-0131 (Electronic) 0004-3591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22127692> >.
- ⁹¹ WIPKE, B. T.; ALLEN, P. M. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. **J Immunol**, v. 167, n. 3, p. 1601-8, Aug 1 2001. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11466382> >.
- ⁹² CASCAO, R. et al. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. **Autoimmun Rev**, v. 9, n. 8, p. 531-5, Jun 2010. ISSN 1873-0183 (Electronic) 1568-9972 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20060506> >.

- ⁹³ FELDMANN, M. et al. Anti-TNFalpha therapy of rheumatoid arthritis: what can we learn about chronic disease? **Novartis Found Symp**, v. 256, p. 53-69; discussion 69-73, 106-11, 266-9, 2004. ISSN 1528-2511 (Print)
1528-2511 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15027483> >.
- ⁹⁴ SANDOO, A. et al. Anti-TNFalpha therapy may lead to blood pressure reductions through improved endothelium-dependent microvascular function in patients with rheumatoid arthritis. **J Hum Hypertens**, v. 25, n. 11, p. 699-702, Nov 2011. ISSN 1476-5527 (Electronic)
0950-9240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21525886> >.
- ⁹⁵ CONTE FDE, P. et al. Endothelins modulate inflammatory reaction in zymosan-induced arthritis: participation of LTB4, TNF-alpha, and CXCL-1. **J Leukoc Biol**, v. 84, n. 3, p. 652-60, Sep 2008. ISSN 0741-5400 (Print)
0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18515326> >.
- ⁹⁶ AGGARWAL, B. B. et al. The role of TNF and its family members in inflammation and cancer: lessons from gene deletion. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 1, n. 4, p. 327-41, Dec 2002. ISSN 1568-010X (Print)
1568-010X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14561180> >.
- ⁹⁷ MONTECUCCO, F. et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) induces integrin CD11b/CD18 (Mac-1) up-regulation and migration to the CC chemokine CCL3 (MIP-1alpha) on human neutrophils through defined signalling pathways. **Cell Signal**, v. 20, n. 3, p. 557-68, Mar 2008. ISSN 0898-6568 (Print)
0898-6568 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18164590> >.
- ⁹⁸ ISSEKUTZ, A. C. et al. The role of tumour necrosis factor-alpha and IL-1 in polymorphonuclear leucocyte and T lymphocyte recruitment to joint inflammation in adjuvant arthritis. **Clin Exp Immunol**, v. 97, n. 1, p. 26-32, Jul 1994. ISSN 0009-9104 (Print)
0009-9104 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8033415> >.
- ⁹⁹ SACHS, D. et al. Cooperative role of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and neutrophils in a novel behavioural model that concomitantly demonstrates articular inflammation and hypernociception in mice. **Br J Pharmacol**, v. 162, n. 1, p. 72-83, Jan 2011. ISSN 1476-5381 (Electronic)
0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20942867> >.
- ¹⁰⁰ LI, P. et al. Systemic tumor necrosis factor alpha mediates an increase in peripheral CD11bhigh osteoclast precursors in tumor necrosis factor alpha-transgenic mice. **Arthritis Rheum**, v. 50, n. 1, p. 265-76, Jan 2004. ISSN 0004-3591 (Print)
0004-3591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14730625> >.
- ¹⁰¹ PRIEUR, A. M.; ROUX-LOMBARD, P.; DAYER, J. M. Dynamics of fever and the cytokine network in systemic juvenile arthritis. **Rev Rhum Engl Ed**, v. 63, n. 3, p. 163-70, Mar 1996. ISSN 1169-8446 (Print)
1169-8446 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8731233> >.
- ¹⁰² DAI, S. M.; NISHIOKA, K.; YUDOH, K. Interleukin (IL) 18 stimulates osteoclast formation through synovial T cells in rheumatoid arthritis: comparison with IL1 beta and tumour necrosis factor alpha. **Ann Rheum Dis**, v. 63, n. 11, p. 1379-86, Nov 2004. ISSN 0003-4967 (Print)
0003-4967 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15479886> >.
- ¹⁰³ POLZER, K. et al. Interleukin-1 is essential for systemic inflammatory bone loss. **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 1, p. 284-90, Jan 2010. ISSN 1468-2060 (Electronic)
0003-4967 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19196726> >.
- ¹⁰⁴ EBERHARDT, W. et al. Amplification of IL-1 beta-induced matrix metalloproteinase-9 expression by superoxide in rat glomerular mesangial cells is mediated by increased activities of NF-kappa B and activating protein-1 and involves activation of the mitogen-activated protein kinase pathways. **J Immunol**, v. 165, n. 10, p. 5788-97, Nov 15 2000. ISSN 0022-1767 (Print)
0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11067938> >.
- ¹⁰⁵ PETTIPHER, E. R.; HIGGS, G. A.; HENDERSON, B. Interleukin 1 induces leukocyte infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial joint. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 83, n. 22, p. 8749-53, Nov 1986. ISSN 0027-8424 (Print)
0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3490671> >.

- ¹⁰⁶ HALLETT, J. M. et al. Novel pharmacological strategies for driving inflammatory cell apoptosis and enhancing the resolution of inflammation. **Trends Pharmacol Sci**, v. 29, n. 5, p. 250-7, May 2008. ISSN 0165-6147 (Print)
0165-6147 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18407359> >.
- ¹⁰⁷ LOPES, F. et al. Resolution of neutrophilic inflammation by H₂O₂ in antigen-induced arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 63, n. 9, p. 2651-60, Sep 2011. ISSN 1529-0131 (Electronic)
0004-3591 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21567381> >.
- ¹⁰⁸ CUNHA, T. M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **J Leukoc Biol**, v. 83, n. 4, p. 824-32, Apr 2008. ISSN 0741-5400 (Print)
0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18203872> >.
- ¹⁰⁹ BEZERRA, M. M. et al. Neutrophils-derived peroxynitrite contributes to acute hyperalgesia and cell influx in zymosan arthritis. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 374, n. 4, p. 265-73, Jan 2007. ISSN 0028-1298 (Print)
0028-1298 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17171392> >.
- ¹¹⁰ BARSANTE, M. M. et al. Blockade of the chemokine receptor CXCR2 ameliorates adjuvant-induced arthritis in rats. **Br J Pharmacol**, v. 153, n. 5, p. 992-1002, Mar 2008. ISSN 0007-1188 (Print)
0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17891165> >.
- ¹¹¹ NISHIMURA, A. et al. Attenuation of monosodium urate crystal-induced arthritis in rabbits by a neutralizing antibody against interleukin-8. **J Leukoc Biol**, v. 62, n. 4, p. 444-9, Oct 1997. ISSN 0741-5400 (Print)
0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9335313> >.
- ¹¹² MATSUKAWA, A. et al. Involvement of growth-related protein in lipopolysaccharide-induced rabbit arthritis: cooperation between growth-related protein and IL-8, and interrelated regulation among TNFalpha, IL-1, IL-1 receptor antagonist, IL-8, and growth-related protein. **Lab Invest**, v. 79, n. 5, p. 591-600, May 1999. ISSN 0023-6837 (Print)
0023-6837 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10334570> >.
- ¹¹³ MOON, S. J. et al. Engagement of toll-like receptor 3 induces vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in human rheumatoid synovial fibroblasts. **Korean J Intern Med**, v. 25, n. 4, p. 429-35, Dec 2010. ISSN 1226-3303 (Print)
1226-3303 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21179282> >.
- ¹¹⁴ GIERUT, A.; PERLMAN, H.; POPE, R. M. Innate immunity and rheumatoid arthritis. **Rheum Dis Clin North Am**, v. 36, n. 2, p. 271-96, May 2010. ISSN 1558-3163 (Electronic)
0889-857X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20510234> >.
- ¹¹⁵ SMOLEN, J. S.; AVILA, J. C.; ALETAHA, D. Tocilizumab inhibits progression of joint damage in rheumatoid arthritis irrespective of its anti-inflammatory effects: disassociation of the link between inflammation and destruction. **Ann Rheum Dis**, Nov 25 2011. ISSN 1468-2060 (Electronic)
0003-4967 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22121130> >.
- ¹¹⁶ MIRCIC, M.; KAVANAUGH, A. Inhibition of IL6 in rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis. **Exp Cell Res**, v. 317, n. 9, p. 1286-92, May 15 2011. ISSN 1090-2422 (Electronic)
0014-4827 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21439276> >.
- ¹¹⁷ AGARWAL, S. K. Biologic agents in rheumatoid arthritis: an update for managed care professionals. **J Manag Care Pharm**, v. 17, n. 9 Suppl B, p. S14-8, Nov 2011. ISSN 1944-706X (Electronic)
1083-4087 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22073935> >.
- ¹¹⁸ BRESNIHAN, B. et al. Effects of anakinra monotherapy on joint damage in patients with rheumatoid arthritis. Extension of a 24-week randomized, placebo-controlled trial. **J Rheumatol**, v. 31, n. 6, p. 1103-11, Jun 2004. ISSN 0315-162X (Print)
0315-162X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15170922> >.
- ¹¹⁹ KIELY, P. D. et al. Biologic agents for rheumatoid arthritis--negotiating the NICE technology appraisals. **Rheumatology (Oxford)**, Nov 23 2011. ISSN 1462-0332 (Electronic)
1462-0324 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22039226> >.

- ¹²⁰ REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-51, Nov 1993. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8229312> >.
- ¹²¹ DE-MATOS, I. M. et al. Evidence for a role of mast cells in the lung edema induced by Tityus serrulatus venom in rats. **Toxicon**, v. 39, n. 6, p. 863-7, Jun 2001. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11137547> >.
- ¹²² MOGHADASIAN, M. H.; FROHLICH, J. J.; MCMANUS, B. M. Advances in experimental dyslipidemia and atherosclerosis. **Lab Invest**, v. 81, n. 9, p. 1173-83, Sep 2001. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11555665 >.
- ¹²³ MOORE, K. J. et al. Loss of receptor-mediated lipid uptake via scavenger receptor A or CD36 pathways does not ameliorate atherosclerosis in hyperlipidemic mice. **J Clin Invest**, v. 115, n. 8, p. 2192-201, Aug 2005. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16075060 >.
- ¹²⁴ FARIA, A. M.; WEINER, H. L. Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. **Adv Immunol**, v. 73, p. 153-264, 1999. ISSN 0065-2776 (Print) 0065-2776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10399007> >.
- ¹²⁵ TARANTINO, G. et al. Spleen: A new role for an old player? **World J Gastroenterol**, v. 17, n. 33, p. 3776-84, Sep 7 2011. ISSN 1007-9327 (Print) 1007-9327 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21987619> >.
- ¹²⁶ GOODISON, S.; URQUIDI, V.; TARIN, D. CD44 cell adhesion molecules. **Mol Pathol**, v. 52, n. 4, p. 189-96, Aug 1999. ISSN 1366-8714 (Print) 1366-8714 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10694938> >.
- ¹²⁷ GALIS, Z. S. et al. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. **J Clin Invest**, v. 94, n. 6, p. 2493-503, Dec 1994. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7989608 >.
- ¹²⁸ LI, T. et al. Heme oxygenase-1 inhibits progression and destabilization of vulnerable plaques in a rabbit model of atherosclerosis. **Eur J Pharmacol**, v. 672, n. 1-3, p. 143-52, Dec 15 2011. ISSN 1879-0712 (Electronic) 0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22004613> >.
- ¹²⁹ BOULLIER, A. et al. Scavenger receptors, oxidized LDL, and atherosclerosis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 947, p. 214-22; discussion 222-3, Dec 2001. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11795269> >.
- ¹³⁰ PREISS, D. J.; SATTAR, N. Vascular cell adhesion molecule-1: a viable therapeutic target for atherosclerosis? **Int J Clin Pract**, v. 61, n. 4, p. 697-701, Apr 2007. ISSN 1368-5031 (Print) 1368-5031 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17394445> >.
- ¹³¹ HODGKINSON, C. P. et al. Advanced glycation end-product of low density lipoprotein activates the toll-like 4 receptor pathway implications for diabetic atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 28, n. 12, p. 2275-81, Dec 2008. ISSN 1524-4636 (Electronic) 1079-5642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18818414> >.
- ¹³² GALKINA, E.; LEY, K. Leukocyte influx in atherosclerosis. **Curr Drug Targets**, v. 8, n. 12, p. 1239-48, Dec 2007. ISSN 1873-5592 (Electronic) 1389-4501 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18220701> >.
- ¹³³ MIYOSHI, T. et al. Deficiency of inducible NO synthase reduces advanced but not early atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Life Sci**, v. 79, n. 6, p. 525-31, Jul 4 2006. ISSN 0024-3205 (Print)

- 0024-3205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16516241> >.
- ¹³⁴ WAGSATER, D. et al. MMP-2 and MMP-9 are prominent matrix metalloproteinases during atherosclerosis development in the Ldlr(-/-)Apob(100/100) mouse. **Int J Mol Med**, v. 28, n. 2, p. 247-53, Aug 2011. ISSN 1791-244X (Electronic)
1107-3756 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21567073> >.
- ¹³⁵ CHEVRIER, I. et al. Myeloperoxidase genetic polymorphisms modulate human neutrophil enzyme activity: genetic determinants for atherosclerosis? **Atherosclerosis**, v. 188, n. 1, p. 150-4, Sep 2006. ISSN 0021-9150 (Print)
0021-9150 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16289072> >.
- ¹³⁶ NORTH, R. J. The concept of the activated macrophage. **J Immunol**, v. 121, n. 3, p. 806-9, Sep 1978. ISSN 0022-1767 (Print)
0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/80431> >.
- ¹³⁷ BAETTA, R.; CORSINI, A. Role of polymorphonuclear neutrophils in atherosclerosis: current state and future perspectives. **Atherosclerosis**, v. 210, n. 1, p. 1-13, May 2010. ISSN 1879-1484 (Electronic)
0021-9150 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19931081> >.
- ¹³⁸ MCCARTHY, D. A. et al. Adhesion molecules are upregulated on dendritic cells isolated from human blood. **Immunology**, v. 92, n. 2, p. 244-51, Oct 1997. ISSN 0019-2805 (Print)
0019-2805 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9415033> >.
- ¹³⁹ CROSS, A. et al. Neutrophil gene expression in rheumatoid arthritis. **Pathophysiology**, v. 12, n. 3, p. 191-202, Oct 2005. ISSN 0928-4680 (Print)
0928-4680 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16112850> >.
- ¹⁴⁰ CHORNY, A.; PUGA, I.; CERUTTI, A. Innate signaling networks in mucosal IgA class switching. **Adv Immunol**, v. 107, p. 31-69, 2010. ISSN 1557-8445 (Electronic)
0065-2776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21034970> >.
- ¹⁴¹ MAGNUSSON, K. E.; STJERNSTROM, I. Mucosal barrier mechanisms. Interplay between secretory IgA (SIgA), IgG and mucins on the surface properties and association of salmonellae with intestine and granulocytes. **Immunology**, v. 45, n. 2, p. 239-48, Feb 1982. ISSN 0019-2805 (Print)
0019-2805 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7037617> >.
- ¹⁴² TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. **Int Immunopharmacol**, v. 1, n. 4, p. 625-35, Apr 2001. ISSN 1567-5769 (Print)
1567-5769 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11357875> >.
- ¹⁴³ YAMANAKA, D. et al. Effect of Agaricus brasiliensis-derived cold water extract on Toll-like receptor 2-dependent cytokine production in vitro. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, Nov 29 2011. ISSN 1532-2513 (Electronic)
0892-3973 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22126586> >.
- ¹⁴⁴ XAVIER, R. J.; PODOLSKY, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 427-34, Jul 26 2007. ISSN 1476-4687 (Electronic)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17653185> >.
- ¹⁴⁵ MATRICON, J. [Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease]. **Med Sci (Paris)**, v. 26, n. 4, p. 405-10, Apr 2010. ISSN 0767-0974 (Print)
0767-0974 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20412746> >.
- ¹⁴⁶ IZCUE, A.; COOMBES, J. L.; POWRIE, F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 313-38, 2009. ISSN 0732-0582 (Print)
0732-0582 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19302043> >.
- ¹⁴⁷ FORLAND, D. T. et al. Effect of an extract based on the medicinal mushroom Agaricus blazei Murill on expression of cytokines and calprotectin in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. **Scand J Immunol**, v. 73, n. 1, p. 66-75, Jan 2011. ISSN 1365-3083 (Electronic)
0300-9475 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21129005> >.

- 148 COWLAND, J. B.; BORREGAARD, N. The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules. **J Leukoc Biol**, v. 66, n. 6, p. 989-95, Dec 1999. ISSN 0741-5400 (Print)
0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10614782> >.
- 149 MAJOR, A. S.; JOYCE, S.; VAN KAER, L. Lipid metabolism, atherogenesis and CD1-restricted antigen presentation. **Trends Mol Med**, v. 12, n. 6, p. 270-8, Jun 2006. ISSN 1471-4914 (Print)
1471-4914 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16651026> >.
- 150 JOYCE, S.; VAN KAER, L. CD1-restricted antigen presentation: an oily matter. **Curr Opin Immunol**, v. 15, n. 1, p. 95-104, Feb 2003. ISSN 0952-7915 (Print)
0952-7915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12495740> >.
- 151 COHEN, N. R.; GARG, S.; BRENNER, M. B. Antigen Presentation by CD1 Lipids, T Cells, and NKT Cells in Microbial Immunity. **Adv Immunol**, v. 102, p. 1-94, 2009. ISSN 0065-2776 (Print)
0065-2776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19477319> >.
- 152 VAN KAER, L. NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. **Curr Opin Immunol**, v. 19, n. 3, p. 354-64, Jun 2007. ISSN 0952-7915 (Print)
0952-7915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17428648> >.
- 153 TUPIN, E. et al. CD1d-dependent activation of NKT cells aggravates atherosclerosis. **J Exp Med**, v. 199, n. 3, p. 417-22, Feb 2 2004. ISSN 0022-1007 (Print)
0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744994> >.
- 154 AHN, W. S. et al. Natural killer cell activity and quality of life were improved by consumption of a mushroom extract, *Agaricus blazei* Murill Kyowa, in gynecological cancer patients undergoing chemotherapy. **Int J Gynecol Cancer**, v. 14, n. 4, p. 589-94, Jul-Aug 2004. ISSN 1048-891X (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15304151 >.
- 155 ANDERSON, G. et al. Fibroblast dependency during early thymocyte development maps to the CD25+ CD44+ stage and involves interactions with fibroblast matrix molecules. **Eur J Immunol**, v. 27, n. 5, p. 1200-6, May 1997. ISSN 0014-2980 (Print)
0014-2980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9174611> >.
- 156 STEWART, C. R. et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. **Nat Immunol**, v. 11, n. 2, p. 155-61, Feb 2010. ISSN 1529-2916 (Electronic)
1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20037584> >.
- 157 BUONO, C. et al. B7-1/B7-2 costimulation regulates plaque antigen-specific T-cell responses and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. **Circulation**, v. 109, n. 16, p. 2009-15, Apr 27 2004. ISSN 1524-4539 (Electronic)
0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15096453> >.
- 158 LAWSON, C.; WOLF, S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. **Pharmacol Rep**, v. 61, n. 1, p. 22-32, Jan-Feb 2009. ISSN 1734-1140 (Print)
1734-1140 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19307690> >.
- 159 AKIYAMA, H.; KONDO, K. [Agaricine and phenylhydrazine derivatives in *Agaricus bisporus* and *Agaricus blazei* Murrill]. **Shokuhin Eiseigaku Zasshi**, v. 48, n. 6, p. J397-401, Dec 2007. ISSN 0015-6426 (Print)
0015-6426 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18203508> >.
- 160 AUKRUST, P. et al. The complex role of T-cell-based immunity in atherosclerosis. **Curr Atheroscler Rep**, v. 10, n. 3, p. 236-43, Jun 2008. ISSN 1534-6242 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18489852 >.
- 161 Association of Official Analytical Chemists. General referee reports. **J Assoc Off Anal Chem**, v. 72, n. 1, p. 62-137, Jan-Feb 1989. ISSN 0004-5756 (Print)
0004-5756 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2715138> >.

- ¹⁶² BERNARDSHAW, S. et al. Effect of an extract of the mushroom *Agaricus blazei* Murill on expression of adhesion molecules and production of reactive oxygen species in monocytes and granulocytes in human whole blood ex vivo. **APMIS**, v. 115, n. 6, p. 719-25, Jun 2007. ISSN 0903-4641 (Print) 0903-4641 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17550380> >.
- ¹⁶³ WHERRY, E. J. T cell exhaustion. **Nat Immunol**, v. 12, n. 6, p. 492-9, Jun 2011. ISSN 1529-2916 (Electronic) 1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21739672> >.
- ¹⁶⁴ YI, J. S.; COX, M. A.; ZAJAC, A. J. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. **Immunology**, v. 129, n. 4, p. 474-81, Apr 2010. ISSN 1365-2567 (Electronic) 0019-2805 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20201977> >.
- ¹⁶⁵ SAVILL, J. Apoptosis in resolution of inflammation. **J Leukoc Biol**, v. 61, n. 4, p. 375-80, Apr 1997. ISSN 0741-5400 (Print) 0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9103222> >.
- ¹⁶⁶ DEVITT, A.; MARSHALL, L. J. The innate immune system and the clearance of apoptotic cells. **J Leukoc Biol**, v. 90, n. 3, p. 447-57, Sep 2011. ISSN 1938-3673 (Electronic) 0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21562053> >.
- ¹⁶⁷ OGAWA, Y.; DURU, E. A.; AMEREDES, B. T. Role of IL-10 in the resolution of airway inflammation. **Curr Mol Med**, v. 8, n. 5, p. 437-45, Aug 2008. ISSN 1566-5240 (Print) 1566-5240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18691071> >.
- ¹⁶⁸ CLANCY, R. M.; BUYON, J. P. Clearance of apoptotic cells: TGF-beta in the balance between inflammation and fibrosis. **J Leukoc Biol**, v. 74, n. 6, p. 959-60, Dec 2003. ISSN 0741-5400 (Print) 0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12960252> >.
- ¹⁶⁹ AKIYAMA, H. et al. Agaritine from *Agaricus blazei* Murrill induces apoptosis in the leukemic cell line U937. **Biochim Biophys Acta**, v. 1810, n. 5, p. 519-25, May 2011. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21382445> >.
- ¹⁷⁰ ITOH, H.; ITO, H.; HIBASAMI, H. Blazein of a new steroid isolated from *Agaricus blazei* Murrill (himematsutake) induces cell death and morphological change indicative of apoptotic chromatin condensation in human lung cancer LU99 and stomach cancer KATO III cells. **Oncol Rep**, v. 20, n. 6, p. 1359-61, Dec 2008. ISSN 1021-335X (Print) 1021-335X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19020714> >.
- ¹⁷¹ JIN, C. Y. et al. Bcl-2 and caspase-3 are major regulators in *Agaricus blazei*-induced human leukemic U937 cell apoptosis through dephosphorylation of Akt. **Biol Pharm Bull**, v. 30, n. 8, p. 1432-7, Aug 2007. ISSN 0918-6158 (Print) 0918-6158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17666799> >.
- ¹⁷² CECIL, D. L. et al. The pattern recognition receptor CD36 is a chondrocyte hypertrophy marker associated with suppression of catabolic responses and promotion of repair responses to inflammatory stimuli. **J Immunol**, v. 182, n. 8, p. 5024-31, Apr 15 2009. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19342682> >.
- ¹⁷³ SELVI, E. et al. CD36 and CD14 immunoreactivity of Reiter cells in inflammatory synovial fluids. **Ann Rheum Dis**, v. 59, n. 5, p. 399-400, May 2000. ISSN 0003-4967 (Print) 0003-4967 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10836959> >.

Anexo A – Certificado do Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFMG (CETEA/UFMG) I (Aterosclerose)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- CETEA -**

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 157/2007**, relativo ao projeto intitulado **"Influência da suplementação oral do cogumelo *Agaricus blazei* Murrill na resposta imunológica relacionada à aterosclerose"**, que tem como responsável **Jacqueline Isaura Alvarez Leite**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **5/ 12/2007**.

Este certificado expira-se em **5/ 12 / 2012**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 157/2007**, related to the project entitled **"Influence of oral supplementation of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill in the atherosclerosis related immune response"**, under the supervision of **Jacqueline Isaura Alvarez Leite**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **December 5, 2007**.

This certificate expires in **December 5, 2012**.

Belo Horizonte, 5 de Dezembro de 2007.



Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3455-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetes - cetes@prmg.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

Anexo B – Certificado do Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFMG (CETEA/UFMG) II (Artrite)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -**

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 119/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Efeito da suplementação dietética com o cogumelo *agaricus blazei murrii* na resposta inflamatória em modelo murino de artrite**", que tem como responsável(is) **Mauro Martins Teixeira**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **11/ 08/2010**.

Este certificado expira-se em **11/ 08/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 119/2010**, related to the project entitled "**Effect of dietary supplementation with *agaricus blazei murrii* in inflammatory response in murine model of arthritis**", under the supervisors of **Mauro Martins Teixeira**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 11, 2010**.

This certificate expires in **August 11, 2015**.

Belo Horizonte, 13 de Agosto de 2010.

Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antonio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3489-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@pcca.ufmg.br

(Mod Cert. v1.0)

Anexo C – Certificado de qualidade do produto *Agaricus blazei* utilizado no estudo



CETAL S/C LTDA. - Centro Tecnológico de Análise de Alimentos

Rua Tenente Onofre Rodrigues de Aguiar, n.º 740 - Vila Industrial
 CEP 08770-040 - Mogi das Cruzes - S.P. - Brasil
 Telefone: 55 11 4699-2001 - Fax: 55 11 4699-3001
<http://www.cetal.com.br> e mail: lab@cetal.com.br



CERTIFICADO DE ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA n° 1393/08

Estabelec./Cliente: MINASFUNGI DO BRASIL - COOP. PRODUTORES DE CÔGUMELoS DA RMBH		Preq.n°: 601/08	
Endereço: TRAVESSA DOIS MIL CENTO E ONZE, 36A			
Município/UF: BELO HORIZONTE/MG		CEP: 31872-403	
Tel.: (31) 3435-9617		Fax.: (31) 3435-9617	
Produto/Anoteira: CÔGUMELO AGARICUS BLAZEI			
Lote: *****	Marca: *****	Data fabric: 12/2007	
Data/Hora Colheita: - - 0:00h	Temp. colheita: *****	Data Validade: 07/2008	
Data/Hora Receb. amostra: 18/06/2008 16:25	Data inicio da an.: 26/06/2008	Data final an.: 27/06/2008	Data emissão: 27/06/2008
Obs.:			

RESULTADOS

ANÁLISE	RESULTADO	MÉTODO
BETA-GLUCAN	9,80g/100g	AOAC

ESTE RESULTADO É RESTRITO PARA A AMOSTRA ANALISADA.



IZILDA DA CRUZ DE ARAÚJO
GERENTE DE LABORATÓRIO



ADRIANA HITOMI MATSUDA - CRQ 15219 F
RESPONSÁVEL PELO LABORATÓRIO



CETAL S/C LTDA. - Centro Tecnológico de Análise de Alimentos

Rua Tenente Onofre Rodrigues de Aguiar, n.º 740 - Vila Industrial

CEP 08770-040 - Mogi das Cruzes - S.P. - Brasil

Telefone: 55 11 4699-2001 - Fax: 55 11 4699-3001

http://www.cetal.com.br

e mail: lab@cetal.com.br



MARKA DE QUALIDADE E CONFIANÇA

CERTIFICADO DE ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA n° 1209/08

Estabelec./Cliente:	MINASFUNGI DO BRASIL - COOP. PRODUTORES DE COGUMELOS DA RMBH			Prop.n°:	622/08
Endereço:	TRAVESSA DOIS MIL CENTO E ONZE, 36A				
Município/UF:	BELO HORIZONTE/MG	CEP:	31872-403		
Tel.:	(31) 3435-9617	Fax.:	(31) 3435-9617		
Produto/Amostra:	COMPOSTO PARA INFUSÃO COGUMELO -AGÁRICOS BLAZEI - ENERGYVITA				
Lote:	-----	Marca:	ENERGYVITA	Data fabrico:	05/2008
Data/Mesa Colheita:	-	Temp. colheita:	-----	Data Validade:	-----
Data/Mesa Recebimento da amostra:	03/06/2008	16.00h	Data inicio da an.:	04/06/2008	Data final an.:
				09/06/2008	Data emissão:
Obs.:	-----				

RESULTADOS

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL			
ANÁLISE	PORÇÃO DE 100g	%VD(*)	MÉTODO
VALOR ENERGÉTICO	317kcal/1332kJ	16%	Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos - Ministério da Saúde, Resolução - RDC nº360, de 23 de dezembro de 2003
CARBOIDRATOS	37g	12%	
PROTEÍNAS	23g	31%	MTFQ-048 Rev. 01: Determinação de proteínas em alimentos. AOAC 18th, chapter 12, method 12.1.07, p-7, 2005.
GORDURAS TOTAIS	8,4g	15%	FQ-002 Rev. 00: Determinação de lipídios em alimentos. Ref. Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e Seus Ingredientes - II Métodos Físicos e Químicos - 1981.
GORDURAS SATURADAS	1,0g	5%	FQ-039 Rev. 01: Determinação de ácidos graxos saturados e insaturados por Cromatografia a gás- Ref.: SAKUMA, A.M. et Al Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. P. 148-155.
GORDURA TRANS	0g	(**)	
FIBRA ALIMENTAR	13g	53%	FQ-029 Rev. 00: Determinação de fibra solúvel e insolúvel em alimentos. Ref.: Delwiche, S. (Ed.) Cereal Foods. IN: HORWITZ, W. (Ed.) Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th ed. Gaithersburg: AOAC, 2006. Chap. 32. Official Method 991.43 (32.1.17) p. 7-10.
SÓDIO	45mg	2%	MTFQ-002 Rev. 02: Determinação de Componentes Inorgânicos em Alimentos. Ref.: Shimadzu. Analysis Guidebook, Food Product Analyses. C 180-E059A, p. 108-109, 2003

(*)Valores Diários de referência com base em uma dieta de 2000kcal, ou 8400kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidade energéticas.

(**) VD não estabelecido.

ESTE RESULTADO É RESTRITO PARA A AMOSTRA ANALISADA


IZOLDA DA CRUZ DE AGUIAR

GERENTE DE LABORATÓRIO


ADRIANA TETONI MATSUDA - CRQ 16219 F
RESPONSÁVEL PELA LABORATÓRIO



CERTIFICADO
 ISO 9001:2000
 No. 3952-2005-AQ-
 SPA-INMETRO

Hidrocepe - Serviços de Qualidade Ltda

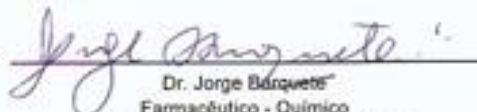
Exame	14659	Dt. Recepção:	18/6/2008
Client	Fundação Renato Azeredo	Fone:	3319-8700
Ender.	Rua: Bedran Saad Bedran, 446	Fax:	
Bairro	Nova Suissa	CNPJ/CPF	01166492000152
Cidade:	Belo Horizonte	Insc.	
Estado:	MG	E-mail:	diretoriageral@framinas.org
CEP:	30480620		
Grupo de	Outros	Data	18/6/2008
Coletado Por:			
Solicitante:	Dr. William César Bento Régis		
Responsável:			

OS	Dados da Amostra	Parâmetros/Análises	Resultado	Referências
06880	Cogumelo Agaricus Blazei - Energy Vita, Produção: 12/2007 Validade: 07/2008	Ferro Total	50,65 mg/kg	
		Potássio - K	2,19%	
		Cálcio - Ca	290,94 mg/kg	
		Sódio - Na	442,15 mg/kg	
		Magnésio - Mg	774,42 mg/kg	

OBSERVAÇÕES: Os resultados expressos neste certificado se referem somente ao material recebido.

Data : 1/7/2008

Ass. Responsável Técnico :


 Dr. Jorge Barquete
 Farmacêutico - Químico
 CRF 6-2090 - CPF 008.747.016-00

Licença nº MG 018/2004 - MAPA, para exercer controle de qualidade de produtos veterinários.
 Registrado na FEAM F076804/2005
 Av. Álvares Cabral, 1354 - Lourdes BH/MG CEP 30170-001 - Telefax: (31)3335-6284
 www.hidrocepe.com.br // hidrocepe@hidrocepe.com.br

LAUDO DE ENSAIOS LABORATORIAIS

CLIENTE: MINASFUNGI DO BRASIL – COOP. PROD. DE COGUMELOS DA REG. METROP. BH.
ENDEREÇO: TRAVESSA DOIS MIL CENTO E ONZ, 36A – RIBEIRO DE ABREU.
CIDADE: BELO HORIZONTE/MG
CONTATO: SRA. ADRIANE
TEL.: (31) 3435-9617
E-MAIL: adrianeaguilar@minasfungi.com.br
DATA DA COLETA: NÃO CONSTA
DATA DE ENVASE: NÃO APLICÁVEL
DATA ENTRADA DA AMOSTRA: 12/08/08
DATA DE VALIDADE: NÃO APLICÁVEL
DATA EMISSÃO DO LAUDO: 27/08/08
COLETOR: O INTERESSADO

COGUMELO AGARICUS BLAZEI MURRIL 100g

ENSAIOS	UNIDADES	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	ANÁLISES DA AMOSTRA	MÉTODO
Vitamina A (Retinol)	µg/100g	0,17	366	CR0049*
Vitamina B ₁ (Thiamina)	mg/100g	0,003	4,25	CR0052*
Vitamina B ₂ (Riboflavina)	mg/100g	0,07	16,85	CR0052*
Vitamina B ₃ (Niacina)	mg/100g	0,013	58,8	CR0052*
Vitamina B ₅ (Pantotenato de Calcio)	mg/100g	0,03	45	CR0052*
Vitamina C (Ac. Ascórbico)	mg/100g	0,002	57,1	CR0052*
Vitamina D ₂ (Ergocalciferol)	µg/100g	5,0	<5,0	CR0049*
Colina	mg/100g	1,0	33,6	CR0049*
Vitamina H (Biotina)	µg/100g	5	4529	CR0052*
Vitamina K ₂ (Menaquinona)	µg/100g	0,14	<0,14	CR0049*
Ergosterol	mg/100g	0,01	93,6	**

METODOLOGIA:

*A.O.A.C. INTERNATIONAL. *Official methods of analysis*. 18th ed, Maryland/USA: A.O.A.C. International, 2005 – Current Through – Revision 1, 2006.

**Farmacopéia Portuguesa

Os resultados das análises laboratoriais apresentadas se referem exclusivamente à amostra analisada.

EDILSON ANTÔNIO TORRES
COORDENADOR CROMATOGRAFIA
CRQ IV: 04438677



Centro de Qualidade Analítica Ltda – Av. Julio Diniz, 27 – Jd. N.S. Auxiliadora – Pabx/Fax (019) 3241-1555
CEP: 13075-420 – Campinas, SP – Brasil – CNPJ 54.692.645/0001-61 – IE Isento – I.M. 4381-8
URL: www.cqa.com.br - e-mails: vendas@cqa.com.br - financeiro@cqa.com.br

Laboratório ISO-17025 habilitado pela ANVISA sob sigla ANALI-050
Veja o escopo completo em http://www.anvisa.gov.br/relbras/200/analisanalitico_C60.htm

NATURAL AMAZON HERBS PRODUÇÃO DE EXTRATOS LTDA.

Rod. Romildo Prado Nº 3334- Louveira / SP,

TEL: (19) 3878-3543 CNPJ: 07.593.366/0001-60 INSC. EST. 421.076.738.119

Denominação comum: Agaricus pó

Nome científico: Agaricus blazei Murril.

Família: Agaricaceae

Colheita/Validade: 08/2008 – 08/2010

Origem/Procedência: Brasil

Cliente/Fornecedor: Minasfungi / Natural Amazon Herbs

Nº NF/Pedido: ---

Método de secagem: Estufa

Parte usada: Fungo inteiro

Nº Lote: PAGA0009GR

Irradiação: Sim

IBAMA N° 996334

Autorização MS 1.06845.7

Nº CEVS: 352730690-245-000002-1-3

CRFN°: 545031-7

Insc. Mun.: 057240

CERTIFICADO DE ANÁLISE Nº 00009

ANÁLISE FÍSICO QUÍMICAS			
ANÁLISE	RESULTADO	ESPECIFICAÇÃO	MÉTODOS / REFERÊNCIA
Aspecto	Pó grosso	Pó grosso	Visual
Cor	Amarelo escuro	Amarelo a amarelo escuro	Visual
Sabor/Odor	De acordo	Característicos	Organoléptico
pH (sol 10%)	6,5	5,0 +/- 1,5	Korolkovas Andrejus, 1984
Umidade (%)	7,19 %	Máximo 10 %	Farmacopéia Brasileira IV ed
Cinzas totais (%)	5,11 %	Máximo 7,5 %	Farmacopéia Brasileira IV ed
Densidade (g/mL)	0,289 g/mL	Min. 0,200 g/mL	Farmacopéia Portuguesa IV ed 1997
Matéria estranha	Ausente	Ausente	Farmacopéia Brasileira IV ed
Solubilidade	Insolúvel	Insolúvel	Visual

OBS:

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA			
ANÁLISE	RESULTADO	ESPECIFICAÇÃO	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA
<i>Pseudomonas sp</i>	De acordo	Ausente/g	WHO, 98
<i>Salmonella sp</i>	De acordo	Ausente/g	WHO, 98
<i>E. coli</i>	De acordo	Ausente/g	WHO, 98
Fungos / Leveduras	De acordo	<100 UFC/g	WHO, 98
Contagem Total Bactérias	De acordo	<1000 UFC/g	WHO, 98
<i>Staphylococcus aureus</i>	De acordo	Ausente/g	WHO, 98

OBS:


Dra. Ligia Cristina Marques Cortes
Farmacêutica Responsável
CRF-SP: 26.443


Dr. Henrique Simionato Inacio
Farmacêutico
CRF-SP: 45.017


Daniele Dias Beccaria
Responsável Microbiológico
CRQ 55595

* Armazenar em local seco e arejado, longe de umidade e calor.

* N.R. significa teste não realizado;

* Por se tratar de um produto de origem vegetal/ natural poderá haver variação de cor.

* Não nos responsabilizamos pelas qualidades do produto se o mesmo for manipulado de forma inadequada.

Anexo D – Artigo Pro-inflammatory effects of the mushroom *Agaricus blazei* and its consequences on atherosclerosis development

Eur J Nutr
DOI 10.1007/s00394-011-0270-8

ORIGINAL CONTRIBUTION

Pro-inflammatory effects of the mushroom *Agaricus blazei* and its consequences on atherosclerosis development

Juliana L. Gonçalves · Eric H. Roma · Ana Cristina Gomes-Santos · Edenil C. Aguilar · Daniel Cisalpino · Luciana R. Fernandes · Angélica T. Vieira · Dirce R. Oliveira · Valbert N. Cardoso · Mauro M. Teixeira · Jacqueline I. Alvarez-Leite

Received: 2 September 2011 / Accepted: 21 October 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract

Purpose Extracts of the mushroom *Agaricus blazei* (*A. blazei*) have been described as possessing immunomodulatory and potentially cancer-protective activities. However, these effects of *A. blazei* as a functional food have not been fully investigated in vivo.

Methods Using apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-}) mice, an experimental model of atherosclerosis, we evaluated the effects of 6 or 12 weeks of *A. blazei* supplementation on the activation of immune cells in the spleen and blood and on the development of atherosclerosis.

Results Food intake, weight gain, blood lipid profile, and glycemia were similar between the groups. To evaluate leukocyte homing and activation, mice were injected with ^{99m}Tc-radiolabeled leukocytes, which showed enhanced

leukocyte migration to the spleen and heart of *A. blazei*-supplemented animals. Analysis of the spleen showed higher levels of activation of neutrophils, NKT cells, and monocytes as well as increased production of TNF- α and IFN- γ . Circulating NKT cells and monocytes were also more activated in the supplemented group. Atherosclerotic lesion areas were larger in the aorta of supplemented mice and exhibited increased numbers of macrophages and neutrophils and a thinner fibrous cap. *A. blazei*-induced transcriptional upregulation of molecules linked to macrophage activation (CD36, TLR4), neutrophil chemotaxis (CXCL1), leukocyte adhesion (VCAM-1), and plaque vulnerability (MMP9) were seen after 12 weeks of supplementation.

Conclusions This is the first in vivo study showing that the immunostimulatory effect of *A. blazei* has proatherogenic repercussions. *A. blazei* enhances local and systemic inflammation, upregulating pro-inflammatory molecules, and enhancing leukocyte homing to atherosclerosis sites without affecting the lipoprotein profile.

Keywords *A. blazei* · Diet · Atherosclerosis · Inflammation · ApoE^{-/-} mice

J. L. Gonçalves · E. H. Roma · A. C. Gomes-Santos · E. C. Aguilar · L. R. Fernandes · A. T. Vieira · M. M. Teixeira · J. I. Alvarez-Leite (✉)
Department of Biochemistry and Immunology,
Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte,
Minas Gerais 31270-901, Brazil
e-mail: jalvarezleite@gmail.com

D. Cisalpino
Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences,
Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte,
Minas Gerais 31270-901, Brazil

D. R. Oliveira
Department of Basic Nursing, Faculty of Nursing,
Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte,
Minas Gerais 30130-100, Brazil

V. N. Cardoso
Department of Clinical and Toxicological Analysis,
Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Minas Gerais,
Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil

Background

Extracts from the mushroom *Agaricus blazei* (*A. blazei*) have been reported to be medicinal [1] and have been studied for their immunostimulatory effects [2–5]. Among these effects are the induction of nitric oxide (NO) secretion in murine macrophages [5] and transcriptional upregulation of cytokines such as IL-8, IL-6, IL1- β , IL2, and TNF- α [6, 7]. These effects can be ascribed to the high concentration of proteoglycans and β -glucans, important

Published online: 16 November 2011

 Springer