

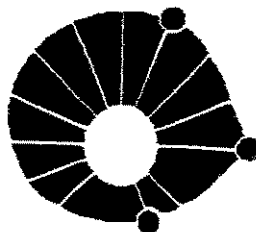
DÉBORA MIGLINSKI

**Avaliação da Atividade Antibacteriana do *Agaricus blazei* Murill
no Modelo Experimental de Infecção com
Listeria monocytogenes: Modulação da Hematopoese como
Mecanismo da Resistência Imunológica**

*Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado,
apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas -
UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da
Farmacêutica - Débora Miglinski.*

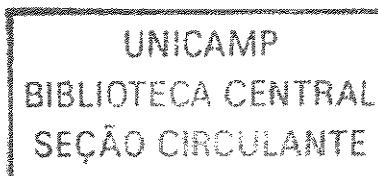
Campinas, 30 de julho de 2004.

Mary Luci de Souza Queiroz
Profª. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz
- Orientadora -



UNICAMP

2004



DÉBORA MIGLINSKI

**Avaliação da Atividade Antibacteriana do *Agaricus blazei* Murill
no Modelo Experimental de Infecção com
Listeria monocytogenes: Modulação da Hematopoese como
Mecanismo da Resistência Imunológica**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-graduação em Farmacologia da
Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do Título de Mestre em
Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Mary L. S. Queiroz



UNICAMP

2004

UNIDADE	DC
Nº CHAMADA	
	UNICAMP
	M588a
V	EX
TOMBO BC/	61668
PROC.	16-86-05
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	13/11/05
Nº CPD	

Biblid 338249

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

M588a Miglinski, Débora

Avaliação da atividade antibacteriana do *Agaricus blazei* murill no modelo experimental de infecção com *Listeria monocytogenes*: Modulação da hematopoese como mecanismo da resistência imunológica. / Débora Miglinski. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : Mary Luci de Souza Queiroz
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Listeriose. 2. Medula óssea. 3. Baço. 4. Unidades hematopoiéticas formadoras de colônias. I. Mary Luci de Souza Queiroz. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

Membros:

Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

Profa. Dra. Marize Campos Valadares

Profa. Dra. Solange Aparecida Malacrida

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/07/2004

Aos meus

Pais, Alexandre e Marilda;

Avós, Antônio e Rosa;

Irmãos, Carlos e Fernando;

Cunhadas, Joseane e Renata;

ao meu namorado Frederico e

principalmente a Deus, dedico este trabalho

em retribuição ao amor, confiança e estímulos permanentes.

“A vida por si só não tem significado. Ela só tem significado se você puder cantar uma canção do eterno, se você puder liberar alguma fragrância do divino, do sagrado, se você puder se tornar uma flor de lótus – imortal, intemporal. Se você puder se tornar puro amor; se você puder embelezar esta existência, se você puder se tornar uma bênção para a existência – só então a vida tem realmente significância; caso contrário, ela é sem finalidade. É como uma tela: você pode continuar carregando-a por toda a sua vida e você pode morrer sob seu peso, mas qual é o sentido disso...? Pinte algo na tela!

O sentido tem de ser criado na vida: o sentido não é algo previamente dado. O que lhe é dado é liberdade, o que lhe é dado é criatividade, o que lhe é dado é vida. Tudo que é necessário para criar significado lhe é dado. Todos os ingredientes essenciais de significado lhe são dados, mas o significado não é dado, o significado tem de ser criado por você. Você tem que se tornar em criador por seus próprios méritos. E quando você se torna um criador por seus próprios méritos, você participa com Deus, você se torna uma parte de Deus”.

Osho

Agradecimentos

Aos meus pais, Alexandre e Marilda, pelo incentivo, pelas críticas e acima de tudo pela paciência e carinho, que sempre tiveram comigo.

Em especial, ao meu avô Nico, que sempre confiou na capacidade da sua “menininha de ouro”. – De onde estiver sei que continua torcendo pela minha vitória. E a minha avó Rosa, pela generosidade e imenso amor que sempre teve e demonstrou por mim.

À Professora Dra. Mary Luci de Souza Queiroz, minha orientadora que, através da sua dedicação, competência e imenso saber, possibilitou a realização deste trabalho e acima de tudo, deu-me a oportunidade de crescimento, não só profissional, mas também emocional e espiritual.

Aos meus amigos do Laboratório: Adriana, Aline, Andréa, Camila, Fernanda, Gustavo, Júlia, Marize, Paula, Rafael, Sílvia Granja, Sílvia Torres, Samara, Solange, Sueli e Vanessa pela solidariedade e companheirismo, que resultaram numa convivência de grande aprendizado.

Ao Setor de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas desta Universidade.

Aos profissionais do Departamento de Comunicação Social do HEMOCAMP:

Agradecimentos

A Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao Departamento de Farmacologia, pela possibilidade de elaboração desta dissertação de Mestrado.

Aos animais, necessários à pesquisa, pois através da utilização da vida – em benefício da vida – pude perceber a amplitude da Criação Divina.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiv
I. INTRODUÇÃO.....	17
I.1. <i>Agaricus blazei</i> Murill.....	18
I.2. Modelo experimental de infecção com <i>Listeria monocytogenes</i>	23
II. OBJETIVOS.....	29
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
III.1. Animais.....	32
III.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	33
III.3. Tratamento.....	35
III.4. Cultura clonal de precursores hematopoéticos.....	36
III.4.1. Medula óssea.....	36
III.4.2. Baço.....	37
III.4.3. Preparação de placas de cultura da medula óssea e do baço em meio semi-sólido.....	37
III.5. Preparação do meio condicionado de células esplênicas (SCM).....	38
III.6. Obtenção do soro dos animais para detecção da atividade dos fatores estimuladores de colônias.....	40

SUMÁRIO

III.7. Peso do baço.....	41
III.8. Realização da curva de sobrevida.....	41
III.9. Análise estatística.....	42
 IV. RESULTADOS.....	 44
IV.1. Efeito do ABM sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos.....	45
IV.1.1 Medula óssea.....	45
IV.1.2 Baço.....	48
IV.2. Efeito do ABM sobre a produção de fatores estimuladores de colônias.....	50
IV.3. Efeito do ABM sobre o peso do baço	53
IV.4. Efeito do ABM na sobrevida de camundongos BALB/c infectados com uma dose letal de <i>Listeria monocytogenes</i>	55
 V. DISCUSSÃO.....	 57
 VI. CONCLUSÕES.....	 64
 VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 66
 VIII. APÊNDICE.....	 87

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

Figura 1. Curva de titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM).....	41
Figura 2. Estudo do crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula.....	47
Figura 3. Estudo do crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço.....	49
Figura 4. Estudo da produção de fatores estimuladores de colônias de células precursoras hematopoéticas.....	52
Figura 5. Estudo do peso do baço.....	54
Figura 6. Avaliação da resistência do animal à uma dose letal de <i>Listeria monocytogenes</i>	56

TABELAS

Tabela 1. Titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM).....	39
Tabela 2. Estudo do crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea (I 24 h).....	88
Tabela 3. Estudo do crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea (I 48 h).....	89
Tabela 4. Estudo do crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea (I 72 h).....	90

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 5. Estudo do crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea (animais controle).....	91
Tabela 6. Estudo do crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço (I 24 h).....	92
Tabela 7. Estudo do crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço (I 48 h).....	93
Tabela 8. Estudo do crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço (I 72 h).....	94
Tabela 9. Estudo do crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos do baço (animais controle).....	95
Tabela 10. Estudo da produção de fatores estimuladores de colônias de células precursoras hematopoéticas da medula óssea (I 24 h).....	96
Tabela 11. Estudo da produção de fatores estimuladores de colônias de células precursoras hematopoéticas da medula óssea (I 48 h).....	97
Tabela 12. Estudo da produção de fatores estimuladores de colônias de células precursoras hematopoéticas da medula óssea (I 72 h).....	98
Tabela 13. Estudo da produção de fatores estimuladores de colônias de células precursoras hematopoéticas da medula óssea (animais controle).....	99
Tabela 14. Estudo do peso do baço (I 24 h).....	100
Tabela 15. Estudo do peso do baço (I 48 h).....	101
Tabela 16. Estudo do peso do baço (I 24 h).....	102
Tabela 17. Estudo do peso do baço (animais controle).....	103

RESUMO

Neste trabalho avaliamos o efeito imunomodulador do extrato seco do *Agaricus blazei* Murill (ABM) sobre o crescimento e diferenciação dos precursores hematopoéticos de granulócitos-macrófagos (CFU-GM) na medula óssea e no baço de camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes*. Além disso, a atividade estimuladora de colônias do soro, as alterações no peso do baço e a resistência dos animais frente à infecção também foram avaliados. Para a realização deste estudo, camundongos BALB/c foram tratados previamente à infecção com três diferentes doses de ABM nas concentrações de 500, 1000 e 1500mg/Kg, administradas por gavagem, por sete dias consecutivos. Posteriormente, os animais foram infectados intraperitonealmente com uma dose subletal (1×10^3 bactérias/animal) de *Listeria monocytogenes* para avaliação dos parâmetros hematopoéticos e com uma dose letal (6×10^4 bactérias/animal) para avaliação da resistência dos animais frente à infecção, através da realização de uma curva de sobrevida. Nossos resultados demonstraram um decréscimo significativo no número de precursores hematopoéticos da medula óssea, um aumento significativo na hematopoese extramedular e conseqüente esplenomegalia e um aumento na produção de fatores estimuladores de colônias, em animais apenas infectados com *Listeria monocytogenes*. No entanto, quando os animais foram tratados profilaticamente com o ABM, nas

doses de 1000 e 1500mg/kg, observamos uma reversão significativa da mielossupressão induzida pela infecção, resultando em níveis normais de CFU-GM. A inibição do desenvolvimento da esplenomegalia e da hematopoese extramedular, nos grupos de animais infectados e pré-tratados nas três doses estudadas também foram observados. Além disso, um aumento significativo na atividade estimuladora do soro, nos animais infectados e pré-tratados nas três doses estudadas, foram demonstrados em nossos experimentos, sendo que, com as doses de 1000 e 1500mg/Kg um aumento adicional no período de 48h após a infecção foi observado. O tratamento com ABM aumentou a resistência dos animais frente à listeriose, sendo que, a probabilidade de sobrevida para as doses de 1000 e 1500mg/Kg foram de 50% e 80%, respectivamente. Nossos resultados sugerem que o ABM possui uma potente atividade imunomoduladora, capaz de aumentar a sobrevida dos animais infectados com uma dose letal de *Listeria monocytogenes*, possivelmente devida a capacidade desse extrato de restabelecer a hematopoese medular e esplênica.

ABSTRACT

This work analyzed the immunomodulating effect of *Agaricus blazei* Murill (ABM) dried extract on growth and differentiation of hematopoietic precursors of granulocyte-macrophage (CFU-GM) in the bone marrow and spleen of BALB/c mice infected with *Listeria monocytogenes*. We also evaluated the colony stimulating activity of the serum, changes in spleen weight, and the animals resistance to infection. To conduct the research, BALB/c mice were treated prior to the infection with three different doses of ABM (500, 1000 and 1500mg/Kg), via gavage during seven consecutive days. After that the animals were infected intraperitoneally with a sublethal dose (1×10^3 bacteria/animal) of *Listeria monocytogenes* to evaluate the hematopoietic parameters. The animals were likely infected with a lethal dose (6×10^4 bacteria/animal) to evaluate their resistance to infection in a survival curve. The results showed a significant decrease in the hematopoietic precursors of the bone marrow, a significant increase in extramedullary hematopoiesis and consequent splenomegaly, and an increase in the production of colony stimulating factors in the non-treated infected animals. When the animals were previously treated with 1000 and 1500mg/Kg of ABM we observed a significant reversion of infection-induced myelosuppression, to normal levels, splenomegaly inhibition and extramedullary hematopoiesis in the infected and pretreated groups with all the doses. A significant increase in the

serum stimulating activity was also observed in the pretreated infected animals with no additional increase in a period of 48hs after the infection with 1000 and 1500mg/Kg of the extract. The treatment with ABM increased animal resistance to listeriosis, and the probability of survival for the 1000 and 1500mg/Kg doses was 50% and 80% respectively. These results suggested that ABM is a powerful immunomodulator capable of increasing the survival of animals infected with a lethal dose of *Listeria monocytogenes*, possibly due to this extract capacity of restoring marrow and splenic hematopoiesis.

I INTRODUÇÃO

I.1. *Agaricus blazei* Murril

Os cogumelos basidiomicetos são utilizados na medicina popular por todo o mundo desde a antiguidade. No Japão, Rússia, China e USA diferentes polissacarídeos com atividades antitumorais foram extraídos do corpo de frutificação e micélia de várias espécies destes cogumelos medicinais. A maioria destes polissacarídeos não atacam as células tumorais diretamente, mas produzem efeitos antitumorais pela ativação de diferentes respostas imunológicas do hospedeiro. A ação imunomoduladora dos cogumelos é devida principalmente, ao aumento na estimulação de macrófagos (WASSER E WEIS, 1999).

Além de propriedades antitumorais e imunomoduladoras, esses cogumelos produzem redução nos níveis de colesterol no sangue, melhoram a hiperlipidemia, possuem ação antitrombótica (BOBEK et al., 1991 a, b; GUNDE-CIMERMAN et al., 1993, 1995; MIZUNO, 1995).

Entre as inúmeras espécies de cogumelos estudadas, há relatos de que complexos polissacarídicos provenientes do *Tricholoma mongolium* foram capazes de ativar macrófagos, estimulando a apresentação de antígenos por estas células, aumentando a proliferação de células T e consequentemente inibindo o crescimento do Sarcoma 180, implantado em camundongos

BALB/c (WANG et al., 1996). Polissacarídeos isolado do cogumelo *Flammulina velutipes* e injetado no peritônio de camundongos foi capaz de induzir a proliferação de linfócitos esplênicos e exibiu potente atividade antitumoral contra o Sarcoma 180 *in vivo*, embora não tenha apresentado atividade *in vitro* (LEUNG et al., 1997). Culturas de micélio do *Phellinus linteus* produziram um polissacarídeo que exibiu atividade imunoestimulante e antitumoral, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, estimulando a proliferação celular, citotoxicidade das células T citolíticas, aumentando as funções das células Natural Killer (NK), macrófagos, e a resposta humoral (KIM et al., 1996).

Os efeitos sobre a produção de citocinas também tem sido investigados. A lectina purificada do corpo de frutificação do cogumelo comestível *Volvariella volvacea*, demonstrou atividade estimulatória potente sobre linfócitos esplênicos e também aumentou a expressão transcricional de Interleucina-2 (IL-2) e Interferon-gama (INF γ) (SHE et al., 1998). Com o cogumelo *Lentinula edodes*, LIU et al. (1998) relataram que em culturas celulares (murinas e humanas) a expressão de genes codificadores de IL-2 e fator de necrose tumoral alfa (TNF α) aumentaram de maneira dose-dependente, sugerindo que o cogumelo *L. edodes* pode induzir a resposta imunológica dependente de linfócitos T. Com o complexo polissacarídeo-proteína extraído deste mesmo cogumelo, LIU et al. (1999), observaram que

estes polissacarídeos quando administrados em camundongos normais apresentavam ação imunomoduladora, devido a capacidade de aumentar a expressão de mRNA de Interleucina-1 alfa e beta ($IL1\alpha$, $IL1\beta$), $TNF\alpha$, $INF\gamma$ e de Fatores estimuladores de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) em macrófagos peritoneais e células mononucleares do baço de camundongos normais.

Neste trabalho estudamos em especial o *Agaricus blazei* Murill (ABM), também conhecido como Cogumelo do Sol, Cogumelo Piedade, Cogumelo de Deus ou Cogumelo Princesa e como Himematsutake ou Kawariharatake no Japão (MIZUNO et al., 1990 a, b; MENOLI et al., 2001). Trata-se de um basidiomiceto que apresenta um corpo de frutificação comestível. A espécie é originária da região sudeste do Brasil e em 1965, matrizes deste fungo foram levadas ao Japão, que passou a produzir o cogumelo empregando-se tecnologia de cultivo artificial com grande eficiência. Desde então, este cogumelo vem sendo amplamente utilizado como uma iguaria culinária nas cozinhas japonesa e chinesa. No final da década de 80, começou a ser utilizado como produto nutracêutico (alimento fisiologicamente funcional) e investigado por suas propriedades biológicas para o desenvolvimento de novas drogas (MIZUNO et al., 1990 a, b; DELMANTO et al., 2001; MENOLI et al., 2001; TAKAKU et al., 2001).

A análise físico-química do *Agaricus blazei* revelou que proteínas, carboidratos e açúcares representam os principais constituintes deste cogumelo. Fibras, vitaminas (B1, B2 e niacina), esteróides (como o ergosterol) e minerais (K P, Mg, Ca, Na, Cu, B, Zn, Fe, Mn, Mo) também foram determinados (MIZUNO et al., 1990a).

Estudos com o ABM, comprovaram suas ações imunomoduladoras e imunoestimulantes (MIZUNO et al., 1990 a, b; EBINA e FUJIMIYA, 1998; KUO et al., 2002). Trabalhos realizados com o extrato aquoso do ABM demonstraram um aumento na população de células MAC-1+ (granulócitos, monócitos e células NK) e CD25+ (macrófagos, linfócitos T e B). Este extrato também aumentou a expressão de mRNA de IL-1 β e Interleucina-6 (IL-6), tanto em macrófagos peritoneais como em células esplênicas de camundongos (NAKAJIMA et al., 2002). A secreção de citocinas como a IL-8 e o TNF α , pelos macrófagos originários da medula óssea de ratos, e o aumento da secreção de óxido nítrico (NO) *in vitro*, por diferentes frações extraídas do extrato aquoso originário da cultura de micélia e do corpo de frutificação do ABM foram relatados por SORIMACHI et al. (2001). A estimulação das células NK, a geração de células citotóxicas seletivas e a indução de apoptose nas células tumorais *in vitro*, pelo extrato de proteoglicanas extraídas do ABM foram demonstradas (FUJIMIYA et al., 1998).

ITO et al. (1997), observaram que a inibição de diferentes tipos de tumores em ratos, foram mediadas pela ativação de macrófagos peritoneais e alteração do componente C3 do complemento, pelo complexo de polissacarídeos e proteínas (ATOM), extraído do ABM. Neste mesmo contexto, SHIMIZU et al. (2002) demonstraram inibição de células tumorais, *in vitro*, através da ativação dose dependente da via alternativa do complemento pelo ABM e a formação de um complexo opsonizante entre o ABM e iC3b, no soro humano.

O complexo de polissacarídeos e proteínas (1-6)-beta-D-glucan-protein isolados do ABM, inibiu o crescimento de células de fibrosarcoma Meth A, implantados em camundongos, através do aumento da porcentagem esplênica de CD3+, CD4+ e de células GM1-positivas (ITOH et al., 1994). Complementando este trabalho MIZUNO et al. (1998), demonstraram que estes polissacarídeos aumentaram a porcentagem da população de células positivas esplênicas, como células T(CD3+), células T-auxiliares (CD4+) e células T citotóxica (CD8+) em animais normais, tratados oralmente com a fração extraída do ABM solúvel em água, quando comparados com o grupo controle tratados apenas com salina, sugerindo que os polissacarídeos do ABM, podem ser importantes tanto quando usados como uma medida

profilática contra o câncer, ou quando usados como um alimento fisiologicamente funcional.

L2. Modelo experimental de infecção com *Listeria monocytogenes*:

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria gram-positiva, intracitoplasmática, de crescimento rápido, de amplo nicho ecológico e diferentes classes de hospedeiros (PORTNOY et al, 2002). Pertence a uma linhagem de bactérias virulentas causadoras da doença infecciosa denominada Listeriose (VAN SCHOTHORST, 1996). Encontrada no meio ambiente é excretada nas fezes de animais, e amplamente distribuída no solo e na água. Embora existam outros modos de transmissão, a ingestão de alimentos contaminados como peixe cru, marisco, carne, leite, aves domésticas, vegetais e outros, tem sido evidenciada como a maior fonte de infecção. A *Listeria* cresce na presença ou ausência de ar, em pH entre 4,5 e 9 e na temperatura entre 0-45 °C, igualmente a outros microorganismos, podendo sobreviver a longos períodos de congelamento e em alimentos secos. A contaminação por esta bactéria pode ser evitada através de uma higienização adequada e do cozimento dos alimentos (VAN SCHOTHORST, 1996).

A Listeriose em humanos ocorre principalmente em indivíduos imunossuprimidos (ex: uso de drogas imunossupressoras), mulheres grávidas, indivíduos com câncer, AIDS, idosos e crianças. As manifestações clínicas causadas pela Listeriose podem ser gastroenterite, aborto espontâneo, natimortos, septicemia e meningite em recém nascido. Esses sintomas clínicos revelam que a *Listeria monocytogenes* tem uma rara habilidade para atravessar as três barreiras de membrana durante a infecção: a barreira intestinal, a barreira hematoencefálica e a barreira placentária. A infecção em adultos saudáveis é relativamente rara, e em alguns casos tem sido associadas ao uso de antibióticos e a conseqüente exposição a um grande número desta bactéria.

O modelo experimental de infecção pela *Listeria monocytogenes* em camundongos, tem sido amplamente utilizado por mais de 4 décadas para identificação e estudo do mecanismo que envolve a defesa do hospedeiro frente à infecção causada por este patógeno, possibilitando a avaliação de diversos aspectos da imunidade inata e adaptativa (MACKANESS, 1962; MACKANESS e HILL, 1969; NORTH et al., 1997; UNANUE, 1997 a, b; HARTY et al., 2000). De acordo com o modelo de Mackaness, a bactéria inoculada intravenosamente é rapidamente removida da corrente sanguínea para alojarem-se nos tecidos, principalmente no baço e no fígado, onde os hepatócitos também são infectados (MACKANESS, 1962; NORTH, 1970;

HAHN e KAUFMANN, 1981; LEPAY et al., 1985; CONLAN e NORTH, 1991). Durante esta fase, o controle da multiplicação bacteriana é independente das células T. A bactéria após ser fagocitada pelas células do hospedeiro e incorporada ao fagolisossoma celular, produz uma toxina denominada listeriolisina O (LLO) que é capaz de lisar este fagolisossoma permitindo a migração da bactéria para o citoplasma da célula infectada, onde ocorre sua proliferação e conseqüente passagem para células adjacentes, sem extravasar para o ambiente extracelular, iniciando assim sua disseminação (NISHIBORI et al., 1996; SOUTHWICK e PURICH, 1996; DRAMSI et al., 1998; NOMURA et al., 2002).

O processo de resistência do hospedeiro à *Listeria monocytogenes* envolve diferentes mecanismos. A resposta inespecífica mediada por macrófagos e polimorfonucleares que se alojam rapidamente no local da proliferação da bactéria é essencial para o controle inicial do crescimento bacteriano (McLAUHLIN, 1996; BRAUN & COSSART, 2000). A migração dos neutrófilos para o foco da infecção é de suma importância, pois estas células podem sintetizar e liberar citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF α), “quimiocinas” e outros fatores solúveis como leucotrienos (LLOYD e OPPENHEIM, 1992; GRIMMINGER et al, 1990). A depleção de neutrófilos pode levar a uma infecção letal, causada pela *Listeria*, com um aumento da

migração da bactéria para fígado e baço (ROGERS e UNANUE, 1993; CONLAN e NORTH, 1994; RAKHMILEVICH, 1995), essa depleção pode estar relacionada com a carência de IL-1, visto que um dos papéis desta citocina está relacionado com a ativação e mobilização de neutrófilos para o foco da infecção (HAVELL et al., 1992; UNANUE, 1997 a, b; EDELSON e UNANUE, 2000).

Os macrófagos infectados pela *Listeria* produzem e liberam citocinas como IL-1, TNF α , IL-6, IL-12 e INF γ . O TNF α e a IL-12, são duas citocinas chaves na resposta imune inata, que estimulam as células NK a secretarem INF γ (ROGERS et al., 1992; CHEERS e STANLEY, 1988). A combinação de TNF α e INF γ promove a ativação de macrófago, aumentando suas propriedades antimicrobicas (BECKERMAN et al., 1993; BUCHMEIER e SCHEREIBER, 1985; MIELKE et al., 1993; ROGERS et al., 1994; TRINCHIERI, 1993) e conduzindo a uma maior expressão das moléculas de classe II do complexo de histocompatibilidade principal (MHC classe II). O INF γ também é capaz de estimular a produção de NO pelos macrófagos quando em cultura com *Listeria* (BECKERMAN et al., 1993). A IL-6 tem ação sobre o estroma medular, estimulando a produção de células precursoras, aumentando a resistência do animal frente à infecção.

Enquanto a IL-12, TNF α , IL-1 e IL-6 produzidas por macrófagos infectados promove a imunidade do indivíduo contra à infecção, outras citocinas tem efeito antagonista. O balanço entre essas citocinas é de particular importância no contexto da diferenciação de subtipos de células T em Th1 e Th2. A IL-10 é uma citocina que inibe o desenvolvimento de Th1 e tem efeito negativo na apresentação de antígeno para macrófagos (MOORE et al., 1993). A IL-10 diminui a produção de IL-12 pelos macrófagos e diminui a resposta das células NK aos estímulos da IL-12 e do TNF α (TRIPP et al., 1993).

Como já vimos, a migração das células fagocitárias para o local de replicação da bactéria na fase inicial da infecção é essencial para o estabelecimento da resistência do hospedeiro (NORTH, 1970; BENNET e BAKER, 1977; LEPAY et al., 1985; ROSEN et al., 1989; BINCOLETTTO et al., 1996). Estas células fagocitárias são originárias das células primitivas pluripotencias da medula óssea, denominadas células formadoras de colônias (CFCs), as quais, de acordo com o estímulo recebido podem dar origem a qualquer célula sanguínea (METCALF, 1984; QUEIROZ, 1988; BINCOLETTTO et al., 1996). Os fatores estimuladores de colônias (CSFs) responsáveis pelo crescimento, diferenciação e atividade biológica destas células são, o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), o fator estimulador de granulócitos (G-CSF), o fator estimulador

de macrófagos (M-CSF) e a IL-3 ou multi-CSF (STEVENSON et al., 1981, METCALF, 1984, 1989; HUME et al., 1998). No período inicial da infecção os níveis destes fatores estimuladores de colônias aparecem elevados nos animais infectados pela *Listeria monocytogenes*.

Embora os camundongos susceptíveis a esta bactéria apresentem elevados níveis de CSFs séricos, o número de precursores hematopoéticos da medula óssea para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) apresenta-se diminuído no período inicial da infecção, mantendo-se em níveis abaixo do controle por vários dias (WING et al., 1984, 1985). Esses animais apresentam uma multiplicação exacerbada de *Listeria* no fígado conduzindo a uma maior taxa de mortalidade (STEVENSON et al., 1981; WING et al., 1985, 1987; YONG e CHEERS, 1986; CHEERS e STANLEY, 1988; ROSEN et al., 1989).

II OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos protetores da administração do extrato seco do *Agaricus blazei* Murill (ABM) em camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes*. Os parâmetros avaliados foram:

- Número de precursores hematopoéticos da medula óssea e do baço;
- Produção de fatores estimuladores de colônias de células precursoras hematopoéticas da medula óssea;
- Eficácia terapêutica após administração de uma dose letal de *Listeria monocytogenes*.

III MATERIAL E MÉTODOS

III.1. Animais

Para realização dos experimentos foram utilizados camundongos BALB/c machos, com idade entre 8 a 10 semanas, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP (CEMIB). Os camundongos foram mantidos agrupados ao acaso em gaiolas plásticas, em biotério tipo convencional, controlado devido à implantação de sistemas de barreiras de proteção e técnicas de manejo capazes de manter o padrão sanitário SPF dos animais por tempo médio de 4 meses. A temperatura foi mantida em $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo claro-escuro de 12 horas e o regime alimentar foi o clássico, com ração comercial padrão e água estéreis fornecidas *ad libitum*. Os experimentos foram realizados após um período mínimo de acondicionamento às condições do laboratório de 72 horas. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos de 6 ou 10 e submetidos ao tratamento de acordo com o protocolo experimental a seguir:

- a) animais controles;
- b) animais infectados com *Listeria monocytogenes*;
- c) animais tratados com diferentes doses do extrato de *Agaricus blazei* Murill (ABM) (500 mg/kg, 1000 mg/kg e 1500 mg/kg) por 7 dias consecutivos e infectados com *Listeria monocytogenes* ;

d) animais somente tratados com diferentes doses de ABM (500 mg/kg, 1000 mg/kg ou 1500 mg/kg) por 7 dias consecutivos.

Os animais controles receberam apenas o veículo (água estéril) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados com ABM.

III.2. *Listeria monocytogenes*

A bactéria *Listeria monocytogenes* utilizada para infectar os animais, é um cocobacilo gram-positivo, anaeróbio facultativo, móvel por flagelos peritríquios a temperatura ambiente, facilmente cultivável em ágar-sangue.

Esta cepa foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica (Hospital das Clínicas - UNICAMP) após identificação do microrganismo por testes morfológicos e bioquímicos cujos resultados principais foram resumidos a seguir:

- Oxidase – positivo
- Catalase – positivo
- Carboidratos - ação fermentativa
- Xilose - negativo
- Manitol - negativo

- Bile esculina - positivo
- Beta hemólise – positivo
- CAMP-Test: *Staphylococcus aureus* - positivo
 Rhodococcus equi - negativo

Para a manutenção da patogenicidade desta bactéria foram realizados 25 repasses sucessivos em camundongos BALB/c periodicamente. A bactéria foi administrada intraperitonealmente aos animais em solução salina 0,9% e 48 horas após a inoculação do microrganismo, os baços foram isolados em ambiente estéril, macerados e mantidos em BHI por 24 horas. Para obtenção de colônias puras, uma suspensão de *Listeria monocytogenes* foi cultivada em placas de ágar-sangue e após 24 horas de incubação em estufa a 37°C, colônias de bactérias foram isoladas e diluídas em solução salina 0,9% na concentração desejada.

Para a realização dos experimentos o número ideal de microrganismo a ser inoculado foi determinado por espectrofotometria, através da escala de McFarland (Vitek Colorimeter).

As doses de *Listeria monocytogenes* utilizadas neste trabalho foram padronizadas a partir de uma curva de sobrevivência realizada previamente aos experimentos conforme descrito por BINCOLETTTO e QUEIROZ (1996).

Para o estudo dos parâmetros hematológicos foi utilizada a dose subletal de 1×10^3 bactérias/animal e para a avaliação da sobrevivência dos animais uma dose letal de 6×10^4 bactérias/animal. A suspensão de células bacterianas foi inoculada intraperitonealmente 3 horas após a última dose de ABM, em um volume de 0,2 mL por animal.

A resposta hematopoética foi avaliada 24, 48 e 72 horas após a infecção com a dose subletal de *Listeria monocytogenes*.

III.3. Tratamento com extrato do *Agaricus blazei* Murill

O extrato seco do *Agaricus blazei* (ABM) foi gentilmente cedido pela Galena Química e Farmacêutica Ltda (São Paulo-Brasil). Esse extrato continha em sua composição 58,5% de Polissacarídeos, segundo laudo fornecido pela empresa.

Para o tratamento dos animais, o ABM foi ressuspenso em água estéril nas concentrações desejadas a temperatura ambiente e 0,2 mL foram administrados aos camundongos, correspondendo às doses de 500 mg/kg, 1000 mg/kg, ou 1500 mg/kg, por via oral, durante 7 dias consecutivos.

III.4. Cultura clonal de precursores hematopoéticos da medula óssea e do baço de camundongos BALB/c (CFU-GM)

Para enumerar estas células clonogênicas é importante que todas as células multipotenciais presentes na cultura sejam otimizadas a proliferar e que as condições de cultura sejam ajustadas para se evitar a superposição de colônias na placa de Petri, permitindo a identificação de cada colônia. Para isto, o mesmo lote de fator estimulador de colônias (SCM) foi utilizado em concentração máxima, assim como o lote de soro fetal bovino foi selecionado cuidadosamente devido à variação na sua atividade

III.4.1. Medula óssea

Após sacrificar o animal por deslocamento cervical, realizou-se assepsia da pele com álcool 70%. Após exposição do fêmur, removeu-se a cartilagem sobre o orifício na extremidade distal e cortou-se o osso na junção superior.

A medula óssea foi transferida com o auxílio de agulha e seringa para um tubo contendo 5 mL de meio RPMI-1640 (Cultilab, SP, Brasil).

O número de células na suspensão foi contado em câmara hematocitométrica após diluição 1:10 das células em azul de tripan 1% e a concentração da suspensão celular ajustada para 1×10^5 células/mL.

III.4.2. Baço

Após a retirada da medula óssea, realizou-se uma pequena incisão na região lateral esquerda da cavidade peritoneal e o baço foi removido, sendo em seguida lavado com solução salina estéril e transferido para um tubo contendo 9 mL de meio RPMI-1640. Após a verificação do peso, este órgão foi macerado para a obtenção de uma suspensão celular.

O número de células na suspensão foi contado em câmara hematocitométrica após diluição 1:20 das células em azul de tripan 1% e a concentração ajustada para 2×10^5 células/mL.

III.4.3. Preparação das placas de cultura da medula óssea e do baço em meio semi-sólido

A cultura clonal foi realizada em placas de Petri de 35 mm contendo meio semi-sólido que constitui de:

- 30% de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Sigma) 2x concentrado;
- 20% de soro fetal bovino (SFB-Cultilab, SP- Brasil);
- 50% de Bacto-Ágar-Difco, concentração final 0,3%.

A seguir, adicionou-se ao meio o volume apropriado de células concentrações finais de 1×10^5 células/mL para a medula óssea e de 2×10^5 células/mL para o baço e distribuiu-se alíquotas de 2 mL em cada placa já contendo 100 μ L do estímulo apropriado (meio condicionado de células esplênicas - SCM). Após geleificar, incubou-se por 7 dias a 37°C em estufa umidificada e em presença de 5% de CO₂. Após este período, contou-se o número de colônias formadas em microscópio de dissecação em aumento de 40x.

Para estudo morfológico, as colônias foram fixadas com glutaraldeído 2,5% (v/v) e coradas com Luxol Fast Blue/Leishman (METCALF, 1984).

III.5. Preparação do meio condicionado de células esplênicas (SCM)

Baços de camundongos BALB/c foram removidos sob condições assépticas em meio RPMI-1640 e passados delicadamente através de peneira de aço inoxidável estéril.

A concentração da suspensão celular foi ajustada para 2×10^5 células/mL em meio RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino. Adicionou-se ao meio 5×10^{-5} moles/L de 2-mercaptoetanol e 1,65 µg/mL de "pokeweed mitogen" (Sigma). Incubou-se por 7 dias a 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO₂ no ar. Centrifugou-se o sobrenadante e filtrou-se em membranas de 0,45 µm (Millipore).

A atividade do SCM foi determinada utilizando-se a cultura clonal de células progenitoras hematopoéticas em meio semi-sólido. A titulação deste lote de SCM demonstrou que uma diluição de até 1:4 forneceu resultados que estão dentro dos níveis de resposta máxima. Os resultados foram obtidos em duplicata para cada diluição e apresentados na tabela abaixo.

Tabela 1. Titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM).

DILUIÇÃO SCM	CFU-C x 10 ^{2*}
1:1	109,2 ± 4,2
1:2	102 ± 3,5
1:4	105,6 ± 5,1
1:8	75,6 ± 4,2
1:16	57,6 ± 4,0
1:32	34,8 ± 3,0
1:64	7,2 ± 1,2
1:168	0

*Número total de células por fêmur

Resultados obtidos em duplicata por diluição

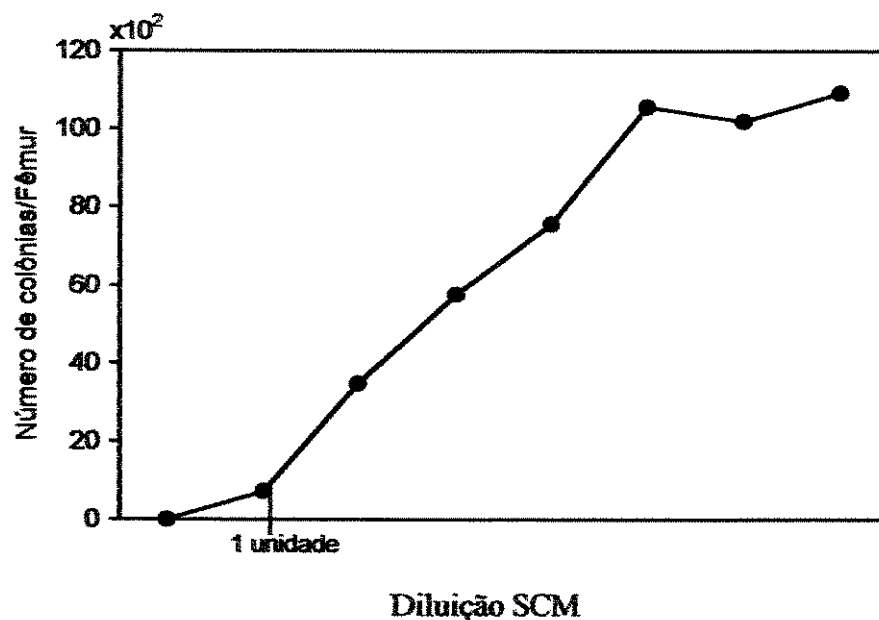
III.6. Obtenção do soro dos animais para detecção da atividade dos fatores estimuladores de colônias

O sangue dos animais foi coletado por punção cardíaca, incubado a 4°C para retenção do coágulo e centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm para obtenção do soro. Um “pool” de soro coletado de 6 animais do mesmo grupo foi armazenado a -20°C até a realização do ensaio. A atividade dos fatores estimuladores de colônias (CSF) no soro foi avaliada pela capacidade promotora do crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea de animais normais em cultura semi-sólida.

Os resultados correspondem as médias $\pm$ DP de 3 amostras por grupo testadas em duplicata.

Essa atividade foi determinada a partir da curva de titulação do meio condicionado de células do baço (SCM) expressa em unidades por mL (Figura 1). Segundo VAN DEN ENGH e BOL (1975), a menor concentração capaz de estimular o crescimento de clones equivale a 1 U de CSF/mL. Os resultados obtidos para a titulação do SCM estão representados na figura 1 (METCALF, 1984).

Figura 1. Titulação do meio condicionado de células esplênicas (SCM).



III.7. Peso do baço dos animais submetidos aos referidos tratamentos

Após remoção do baço (como descrito no item III.4.2), seu peso foi mensurado em miligramas para posterior análise.

III.8. Curva de sobrevida

Para o estudo dos efeitos do tratamento com o ABM na sobrevida dos animais infectados com *Listeria monocytogenes* os animais foram divididos em

quatro grupos experimentais: animais infectados; animais tratados com ABM em três doses diferentes (500, 1000 e 1500mg/kg) (n=20 animais/grupo). Todos os animais foram infectados intraperitonealmente com uma dose letal de *Listeria monocytogenes* (6×10^4 bactérias/animal) 3 horas após a última dose de ABM. Os animais infectados controles receberam o diluente na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados com o ABM. Os animais foram observados por um período de 30 dias.

III.9. Análise estatística

Análise de variância (ANOVA) foi utilizada para verificar a ocorrência de diferenças significativas entre os grupos estudados para as variáveis CFU-GM/fêmur, CFU-GM/baço, atividade estimuladora de colônias e peso do baço. Nos casos em que houve diferença significativa, o teste de Tukey foi utilizado para testar as diferenças mínimas existentes entre todos os grupos.

A curva de sobrevida dos animais foi representada pelo método descrito por Kaplan-Meier, 1958 (COLLET, 1994). A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste não paramétrico de Log-rank. Em todas as medidas o α foi

de 5% bicaudal, ou seja, significância estatística foi considerada para valores de $P < 0,05$.

IV RESULTADOS

IV.1. Efeito do ABM sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos de granulócitos e macrófagos da medula óssea e do baço (CFU-GM) de camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes*

IV.1.1. Medula óssea

Na figura 1 (tabelas 2 à 5 – apêndice) estão representados os resultados obtidos na avaliação da produção de células progenitoras hematopoéticas de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) pela medula óssea de camundongos BALB/c submetidos ao tratamento com ABM durante 7 dias, nas doses de 500, 1000 e 1500mg/Kg, administradas por via oral (gavagem) aos animais previamente à inoculação da bactéria.

Os grupos de animais apenas tratados com ABM nas doses de 500, 1000 e 1500 mg/Kg não apresentaram alterações significativas na resposta mielopoética em relação ao grupo controle não infectado (n=6, $P>0,05$ – ANOVA, Teste de Tukey).

A inoculação da suspensão de bactéria nos camundongos provocou mielossupressão, caracterizada pela redução do número de CFU-GM da medula óssea 48 e 72 horas após infecção, em relação ao grupo controle (n=6,

$P < 0,001$ – ANOVA – Tukey). A mielossupressão foi revertida nos grupos infectados e tratados com ABM nas respectivas doses de 1000 e 1500 mg/Kg nos períodos de 48 e 72 horas após infecção ($n=6$, $P < 0,001$ – ANOVA, Teste de Tukey).

O grupo dos animais infectados e tratados com ABM na dose de 500 mg/Kg, reverteu a mielossupressão causada pela infecção após 48h ($n=6$, $P < 0,01$ – ANOVA, Teste de Tukey), porém não reverteu a mielossupressão no período de 72 horas após a inoculação do bacilo ($n=6$, $P > 0,05$ – ANOVA, Teste de Tukey).

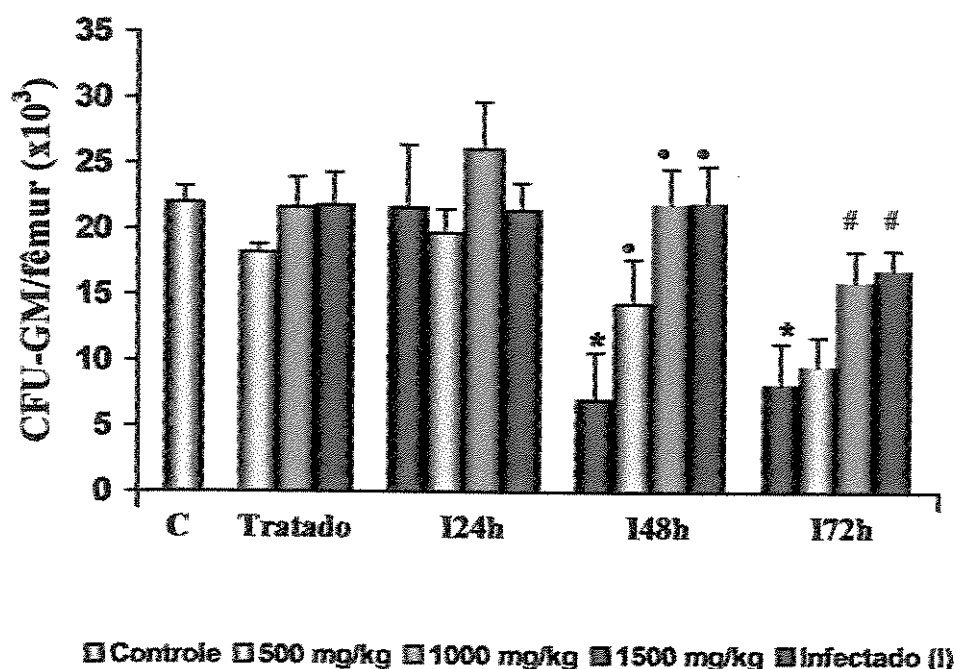


Figura 2- Número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de animais Balb/c, tratados com 500, 1000, 1500 mg/Kg de *Agaricus blazei* Murill, durante 7 dias previamente à inoculação intraperitoneal de uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* (1×10^3 bactéria/animal). Os animais foram sacrificados 24, 48, 72 horas após a infecção. Os grupos de animais somente infectados e controles (não infectados) receberam veículo (água) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrado aos animais tratados. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de 6 animais. $P < 0,001$, ANOVA, Teste Tukey.

* - redução significativa em relação ao grupo controle.

• - aumento significativo em relação ao grupo Infectado 48h.

- aumento significativo em relação ao grupo Infectado 72h.

IV.1.2. Baço

Os resultados obtidos nesta avaliação estão apresentados na figura 2 (tabelas 6 à 9 - apêndice).

A atividade hematopoética extramedular foi avaliada no baço de camundongos BALB/c submetidos ao tratamento com ABM durante 7 dias. Doses de 500, 1000 e 1500 mg/Kg, foram administradas por via oral (gavagem) aos animais previamente à infecção com uma dose subletal de *Listeria monocytogenes*

Na cultura clonal de células esplênicas nenhuma alteração foi observada após o tratamento de camundongos normais (não infectados) com ABM em todas as doses avaliadas (500, 1000 e 1500 mg/kg), quando comparamos com o grupo controle não infectado. No entanto, a atividade hematopoética extramedular ficou evidente nos animais infectados com *Listeria monocytogenes* nos períodos de 48 e 72 horas após inoculação do bacilo em relação ao grupo controle ($n=6$, $P<0,001$ – ANOVA, Teste de Tukey). A administração do ABM reverteu a ativação da mielopoese no baço causada pela infecção. Para todas as doses testadas (500, 1000 e 1500mg/Kg), foram determinados valores normais de CFU-GM no baço desses animais em todos os períodos estudados ($n=6$, $P<0,001$ – ANOVA, Teste de Tukey).

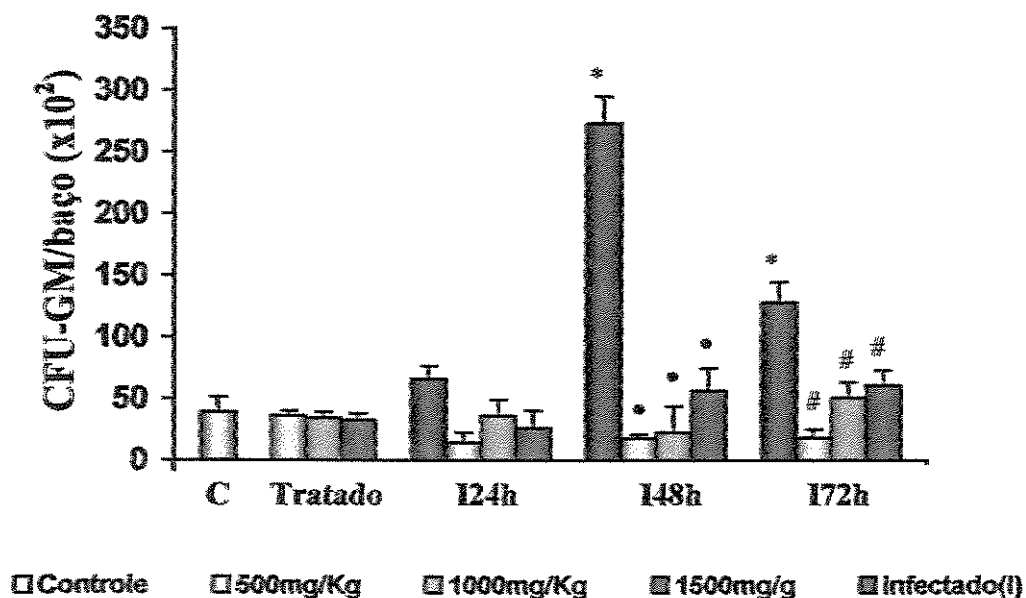


Figura 3- Número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) do baço de animais Balb/c, tratados com 500, 1000 e 1500 mg/Kg de *Agaricus blazei* Murill, durante 7 dias previamente à inoculação intraperitoneal de uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* (1×10^3 bactéria/animal). Os animais foram sacrificados 24, 48, 72 horas após a infecção. Os grupos de animais somente infectados e controles (não infectados) receberam veículo (água) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de 6 animais. $P < 0,001$, ANOVA, Teste Tukey.

*- aumento significativo em relação ao grupo controle.

•- redução significativa em relação ao grupo Infectado 48h.

#- redução significativa em relação ao grupo 72h.

IV.2. Efeito do ABM sobre a produção de fatores estimuladores de colônias de células hematopoéticas em camundongos BALB/c infectados com uma dose subletal de *Listeria monocytogenes*

Os resultados obtidos nesta avaliação estão apresentados na figura 3 (tabelas 10 à 13 - apêndice).

A produção de fatores estimuladores de células precursoras hematopoéticas foi expressa em unidades por mL, de acordo com o protocolo descrito no item III.6 (material e métodos).

Os animais somente tratados com ABM nas doses de 1000 e 1500 mg/Kg tiveram um aumento estatisticamente significativo na concentração de fatores estimuladores de colônias em relação ao grupo controle ($n=6$, $P<0,01$ – ANOVA, Teste de Tukey) e não significativo em relação aos grupos infectados 24 e 72 horas ($n=6$, $P>0,05$ – ANOVA, Teste de Tukey).

O soro dos animais infectados e avaliados apresentou um aumento estatisticamente significativo na atividade estimuladora de colônias (nos três períodos estudados), em relação ao grupo controle não infectado ($n=6$, $P<0,01$ – ANOVA, Teste de Tukey), havendo uma maior concentração desses fatores no sangue dos animais 48 horas após a infecção. No entanto a administração prévia do ABM nas doses de 1000 e 1500 mg/Kg em animais infectados

produziu um aumento adicional na atividade estimuladora de colônia (CSA) nas 48 e 72 horas após a infecção, comparado aos respectivos grupos somente infectados ($n=6$, $P<0,05$ – ANOVA, Teste de Tukey).

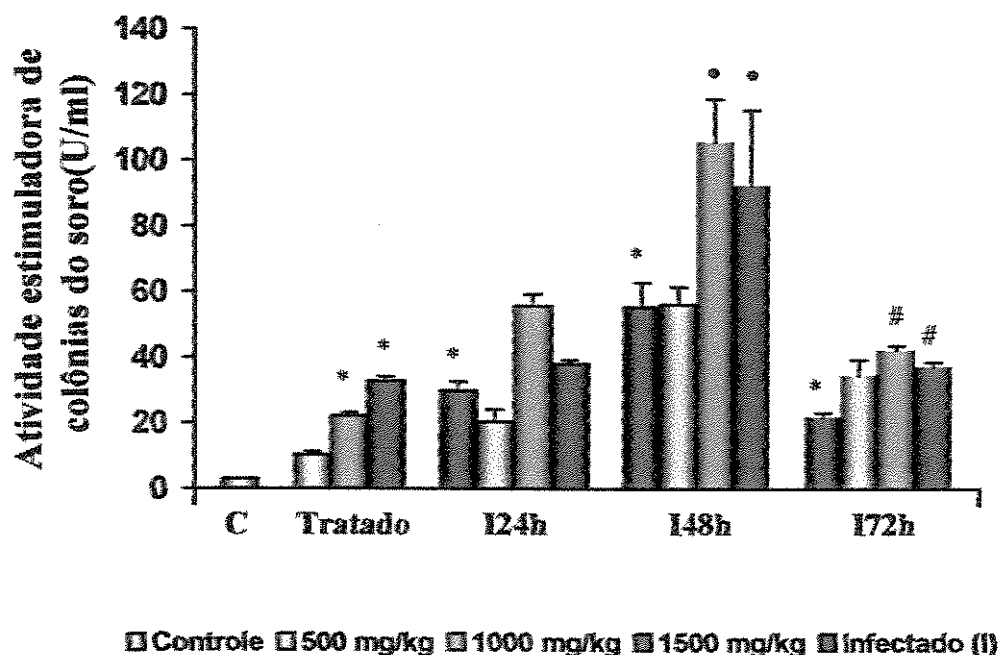


Figura 4. Efeito do tratamento com diferentes doses do ABM sobre a produção de fatores estimuladores de colônias de células hematopoéticas no soro de camundongos infectados com uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* (1×10^3 bactérias/animal). Os resultados correspondem as médias $\pm$ DP de 6 amostras por grupo testadas em duplicata.

*- aumento significativo em relação ao grupo controle.

•- aumento significativa em relação ao grupo Infectado 48h.

#- aumento significativa em relação ao grupo 72h.

IV.3. Efeito do ABM sobre o peso do baço de camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes*

Os resultados obtidos nesta avaliação estão apresentados na figura 4 (tabelas 14 à 17 - apêndice).

O peso do baço dos animais somente tratados com todas as doses do ABM estudadas não apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle não infectado ($n=6$, $P>0,05$ – ANOVA – Teste de Tukey).

Nos grupos infectados com *Listeria monocytogenes* houve aumento estatisticamente significativo no peso deste órgão em relação ao grupo controle, 24, 48 e 72 horas após a infecção ($n=6$, $P<0,001$ – ANOVA, teste de Tukey). Nestes mesmos períodos de tempo, obtivemos uma redução no peso do baço quando os animais infectados foram pré-tratados com 500, 1000 e 1500 mg/kg de ABM por 7 dias, em relação aos grupos apenas infectados nos respectivos períodos ($P<0,001$ – ANOVA, teste de Tukey). O grupo Infectado e tratado com a dose de 500 mg/Kg, reduziu o peso do baço em relação ao grupo correspondente (Infectado 24 horas), porém com o $P<0,05$.

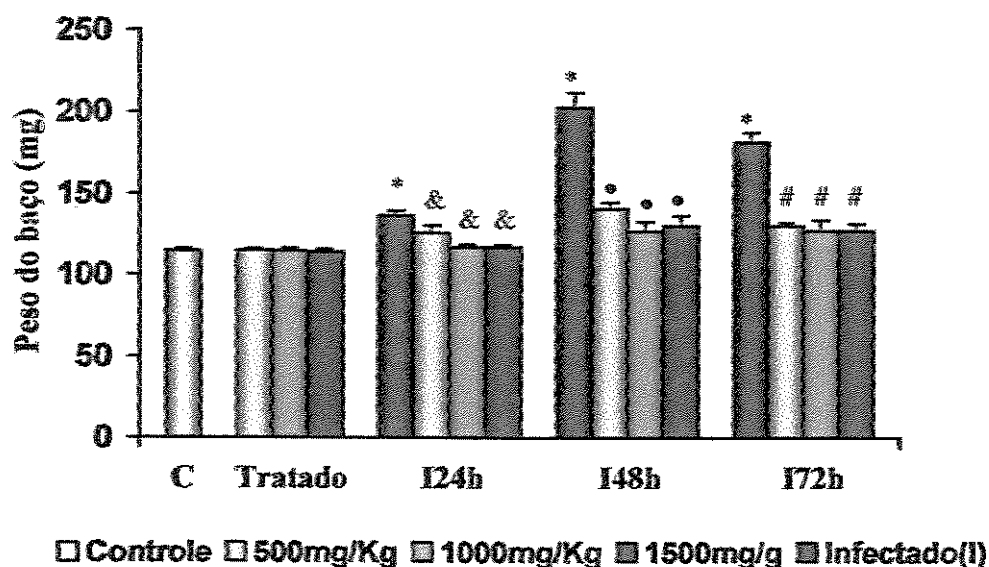


Figura 5: Peso do baço de camundongos BALB/c tratados com extrato seco de ABM (500, 1000 e 1500mg/kg). Os animais foram infectados intraperitonealmente com uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* (1×10^3 bactérias/animal) após receberem tratamento por via oral durante 7 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados 24, 48 e 72 horas após a infecção. Camundongos somente infectados e controles (não infectados) receberam veículo (água) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de 6 animais/grupo.

*- aumento significativo em relação ao grupo controle.

&- redução significativa em relação ao grupo Infectado 24h.

•- redução significativa em relação ao grupo Infectado 48h.

#- redução significativa em relação ao grupo 72h.

IV.4. Efeito do ABM na sobrevida de camundongos BALB/c infectados com uma dose letal de *Listeria monocytogenes*

Os resultados obtidos nesta avaliação estão apresentados na figura 5.

Enquanto o grupo de animais infectados com *Listeria monocytogenes* apresentou 100% de mortalidade até o sexto dia após a inoculação da suspensão de bactérias, o tratamento prévio dos animais com ABM nas doses de 1000mg/kg e 1500 mg/kg aumentou a resistência à infecção. Probabilidades de sobrevida de 50% e 80% foram obtidas para os grupos tratados com estas doses de ABM respectivamente ($P < 0,001$ em relação ao grupo somente infectado-Teste de Log-Rank). Por outro lado, camundongos pré-tratados com a dose de 500mg/Kg do ABM sobreviveram apenas até o 10 dia após a infecção letal com a *Listeria monocytogenes*.

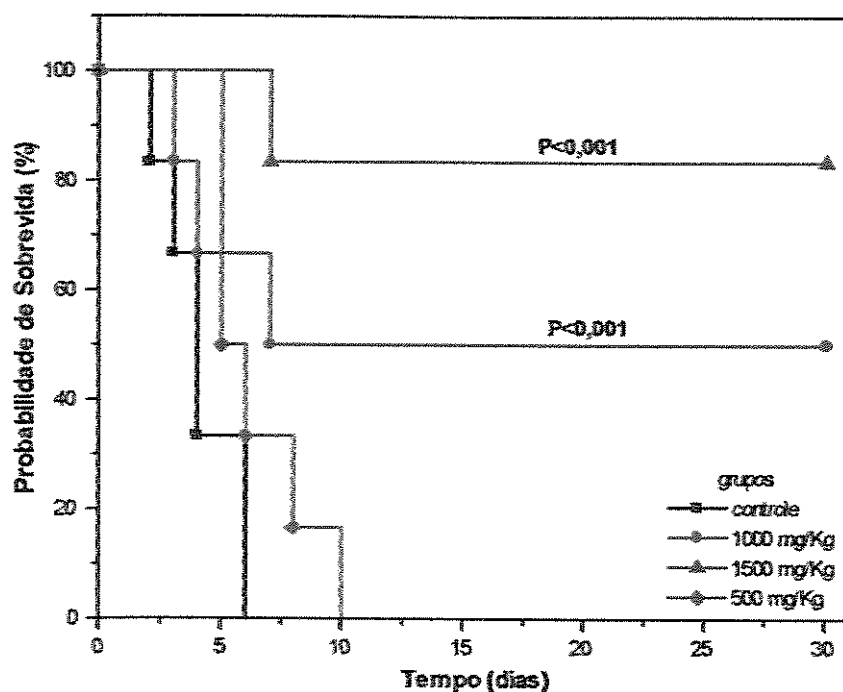


Figura 6: Efeitos do pré-tratamento com 500, 1000, 1500 mg/Kg de ABM, durante 7 dias, sobre a porcentagem de sobrevida em camundongos Balb/c, inoculados com dose letal de *Listeria monocytogenes* (6×10^4 bactérias/animal), n=20, Curva de Kaplan-Meier, P<0,001 em relação ao grupo infectado, Teste de Log-Rank

V DISCUSSÃO

O uso do modelo experimental de *Listeria monocytogenes* em camundongos tem permitido o estudo de vários aspectos da resposta imunológica. Várias células efectoras operam na infecção com *Listeria monocytogenes* como macrófagos, neutrófilos, células NK e células T específicas. Aspectos bioquímicos e celulares da interação dessas células fornecem informações importantes sobre os mecanismos envolvidos na resistência do hospedeiro ao patógeno e contribuem nos estudos que avaliam o impacto de diversos agentes sobre a defesa antibacteriana (UNANUE, 1997 a, b; RAYBOURNE et al., 2001; GOLDFINE e WADSWORTH, 2002).

A Listeriose murina é também um modelo experimental de interação celular envolvida no comprometimento do sistema hematopoético (UNANUE, 1997 a, b; KOLB-MAUER et al., 2002). Sendo a medula óssea o sítio primário de geração e maturação de precursores hematopoéticos e estando as células maduras da série monocítica e granulocítica fundamentalmente envolvidas na resposta inicial à infecção (TRIPP et al., 1993), torna-se interessante avaliar os efeitos do extrato do *Agaricus blazei* Murill (ABM) sobre os progenitores hematopoéticos destas células.

No presente estudo, demonstramos a capacidade do ABM em estimular a resposta hematopoética durante a infecção com *Listeria monocytogenes*. Nossos resultados demonstraram que a administração do extrato nas doses de

1000 e 1500 mg/Kg produziram um aumento sobre o número de células formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos da medula óssea de camundongos infectados com *Listeria monocytogenes*, promovendo uma reversão da mielossupressão induzida pela infecção. Paralelamente, observamos uma reversão no aumento da hematopoese extramedular esplênica, produzida pela infecção, nos animais tratados com as três doses do extrato do ABM (500, 1000 e 1500 mg/Kg) previamente à infecção. Em concordância com esses resultados, obtivemos nos períodos de 48 e 72 horas após a inoculação da bactéria, uma redução do peso do baço nos animais tratados com o extrato do ABM nas três doses (500, 1000 e 1500 mg/Kg), administradas previamente à infecção, controlando a esplenomegalia provocada pela *Listeria monocytogenes*. Outro dado importante relacionado ao tratamento foi a potencialização na atividade estimuladora de colônias no soro, observada nos animais somente tratados com o extrato do ABM, nas doses de 1000 e 1500 mg/Kg em relação ao controle e nos grupos de animais tratados e infectados observou-se um aumento adicional em relação aos respectivos grupos infectados 48 e 72 horas nas doses de 1000 e 1500 mg/Kg do extrato do ABM. Além disso, nossos resultados demonstraram um aumento significativo na sobrevivência dos animais infectados com *Listeria monocytogenes* e tratados com extrato do ABM nas doses de 1000 e 1500 mg/Kg.

Trabalhos em nosso laboratório demonstraram a atividade de compostos naturais, sobre a modulação da resposta hematopoética em camundongos infectados com a *Listeria monocytogenes* (QUADROS et al., 1999; DANTAS et al., 1999a; QUEIROZ et al., 2000a, 2001, 2003; MELO et al., 2001). O extrato da *Chlorella vulgaris* e da *Petiveria alliacea*, demonstraram a capacidade de aumentar a produção de citocinas como a IL-2 e o INF γ e também as células NK (DANTAS et al., 1999b; QUEIROZ et al., 2000b, 2002).

A resistência do hospedeiro à infecção pela *Listeria monocytogenes*, envolve diferentes mecanismos, sendo a migração das células fagocitárias, originárias da medula óssea ao local de replicação da bactéria essencial para a resposta primária à infecção (NORTH, 1970; BENNET e BAKER, 1977; LEPAY et al., 1985; ROSEN et al., 1989; BINCOLETTTO et al., 1996). Um papel central dos macrófagos contra à infecção pela *Listeria monocytogenes* tem sido sugerido pelo fato de que o término da infecção está associado ao aumento da capacidade listericida de macrófagos (KAUFMANN, 1993, 1995; DENIS et al., 1990).

Os macrófagos infectados pela *Listeria monocytogenes* liberam citocinas como IL1, TNF α , IL6, IL12 e INF γ , sendo que, o TNF α e a IL12 estimulam as células NK, que por sua vez secretam INF γ , uma citocina

primordial para a ativação dos macrófagos. Os macrófagos também são fundamentais na ativação das células T, que são necessárias para uma resposta efetiva e para total erradicação do microorganismo (KAUFMANN et al., 1986; FARGEAS et al., 1992; WAGNER et al., 1994).

Neste contexto ITO et al. (1997) relataram que o complexo protéico polissacarídico isolado do ABM, denominado ATOM (antitumor organic substance Mie) não apresentou atividade citotóxica direta contra diferentes linhagens de células tumorais testadas e sim a capacidade de estimular mecanismos imunológicos como a atividade fagocítica de macrófagos. Com o cogumelo *Tricholoma mongolium*, WANG et al. (1996), demonstraram que o complexo polissacarídico extraído deste cogumelo, ativaram macrófagos, estimulando a apresentação de antígenos por estas células, aumentando a proliferação de células T.

O aumento da expressão de mRNA de IL1 α , IL1 β , TNF α , INF γ e GM-CSF em macrófagos peritoneais e células mononucleares do baço, pelo polissacarídeo extraído do cogumelo *Lentinula edodes*, foram relatados por LIU et al. (1999). Trabalhos recentes constatarem que o extrato aquoso do ABM, aumentou a secreção de citocinas importantes como a IL1 β e a IL6 através da estimulação de macrófagos e células T de camundongos, aumentou também a população de células MAC-1+ (granulócitos, monócitos e células

NK) e CD25+ (macrófagos, linfócitos T e B) (NAKAJIMA et al., 2002). O aumento da secreção de citocinas como a IL8 e o TNF α pelos macrófagos foram descritas por SORIMACHI et al. (2001). Essas citocinas são de suma importância, para a resistência do hospedeiro frente a infecção, visto que, a IL1 e o TNF α , possuem um efeito sinérgico sobre a proteção dos animais (ROLL et al., 1990), sendo que suas funções incluem a estimulação da proliferação de linfócitos, aumento da atividade das células NK, alterações no recrutamento e migração de leucócitos, aumento das proteínas da fase aguda pelos hepatócitos, além da estimulação da hematopoese (AKIRA et al., 1990).

A estimulação das células NK, a geração de células citotóxicas específicas e a indução de apoptose nas células tumorais promovidos pelo extrato de proteoglicanas extraídas do ABM, foram relatadas por FUJIMIYA et al. (1998).

A análise de linfócitos esplênicos usando citometria de fluxo mostrou que as percentagens de células T (CD3+), T-auxiliares (CD4+) e células T citolíticas (CD8+) estavam aumentadas em animais tratados com a fração solúvel em água extraída do *Agaricus blazei*, quando comparados com animais tratados apenas com salina (MIZUNO et al., 1998). Polissacarídeos do cogumelo *Flammulina velutipes* administradas i.p. em camundongos, também foram capazes de induzir a proliferação de linfócitos esplênicos

(LEUNG et al., 1997). Esses dados sugerem que o tratamento com o extrato do ABM pode estimular outros mecanismos do sistema imunológico não estudados neste trabalho, os quais incluem parâmetros da resposta inata e da resposta adaptativa, importantes para a recuperação dos animais com listeriose.

Como o extrato seco do cogumelo *Agaricus blazei* Murill testado neste estudo possui em sua composição 58,5% de polissacarídeos, o aumento na sobrevida e a modulação da mielopoese pode ser devida a presença deste composto, capaz de estimular a resposta imunológica.

VI CONCLUSÃO

O presente estudo sobre a atividade profilática do extrato seco do *Agaricus blazei* Murill em camundongos BALB/c infectados com *Listéria monocytogenes* demonstraram:

1. Aumento no número de precursores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos infectados previamente tratados com as doses de 1000 e 1500 mg/Kg de ABM;
2. Prevenção da hematopoese extramedular dos animais infectados que receberam pré-tratamento com ABM nas doses de 500, 1000 e 1500 mg/Kg;
3. Redução da esplenomegalia em animais infectados pré-tratados com 500, 1000 e 1500 mg/Kg de ABM;
4. Aumento na atividade estimuladora de colônias do soro (CSA) de camundongos tratados nas doses de 1000 e 1500 mg/Kg e no soro de animais infectados pré-tratados com ABM nas respectivas doses;
5. Aumento da probabilidade de sobrevivência dos animais infectados em 50 e 80% quando submetidos ao pré-tratamento com as doses de 1000 e 1500 mg/Kg respectivamente.

VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIRA, S.; HIRANO, T.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). **Faseb J**, 4: 2860-7, 1990.

BECKERMAN, K. P.; ROGERS, H. W.; COBERTT, J. A.; SCHREIBER, R. D.; McDANIEL, M. L.; UNANUE, E. R. Release of nitric oxide during the T cell-independent pathway of macrophage activation. **J Immunol**, 150: 888-95, 1993.

BENNET, M.; BAKER, E. E. Marrow-dependent cell function in early stages of infection with *Listeria monocytogenes*. **Cell Immun**, 33: 203-10, 1977.

BINCOLETTO, C.; QUEIROZ, M. L. S. The effect of lead on the bone marrow stem cells of mice infected with *Listeria monocytogenes*. **Vet Human Toxicol**, 38: 186-190, 1996.

BOBEK, P.; GINTER, E.; JURCOVICOVA, M.; KUNIAK, L. Cholesterol-lowering effect of the mushroom *Pleurotus ostreatus* In hereditary hypercholesterolemic rats. **Ann Nutr Metab**, 35(4): 191-5, 1991a.

BOBEK, P.; GINTER, E.; KUNIAK, L.; BABALA, J.; JURCOVICOVA, M.; OZDIN, L. et al. Effect of mushroom *Pleurotus ostreatus* and isolated fungal polisaccharide on serum and liver lipids in Syrian hamsters with hyperlipoproteinemia. **Nutrition**, 7(2): 105-8, 1991b.

BRAUN, L.; COSSART, P. Interactions between *Listeria monocytogenes* and host mammalian cells. **Microbes and Infection**, 2: 803-11, 2000.

BUCHMEIER, N. A.; SCHEREIBER, R. D. Requirement of endogenous interferon-gamma production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. **Proc Natl Acad Sci**, 82(21): 7404-8, 1985.

CHEERS, C.; STANLEY, E. R. Macrophage production during murine listeriosis: colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and susceptible mice. **Infect Immun**, 56: 274-281, 1988.

COLLET, D. Modeling survival data in medical research. In _____ - **Texts in Statistical Science**. London, Chapman & Hall, 1994.p. 1-13.

CONLAN, J. W.; NORTH, R. J. Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium, **J Exp Med**, 174: 744, 1991.

CONLAN, J. W.; NORTH, R. J. Neutrophils are essential for early anti-*Listeria* defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. **J Exp Med**, 179(1):259-68, 1994.

DANTAS, D. C. M.; KANENO, R.; QUEIROZ, M. L. S. The effects of *Chlorella vulgaris* in the protection of mice infected with *Listeria monocytogenes*. Role of Natural Killer cells. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, 21(3): 609-19, 1999b.

DANTAS, D. C. M.; QUEIROZ, M. L. S. Effects of *Chlorella vulgaris* on bone marrow progenitor cells of mice infected with *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Immunopharmacology**, 21: 499-508, 1999a.

DELMANTO, R. D.; DE LIMA, P. L.; SUGUI, M. M.; DA EIRA, A. F.; SALVADORI, D. M.; SPEIT, G. et al. R. Antimutagenic effect of *Agaricus*

blazei Murill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Mutat Res**, 596(1-2): 15-21, 2001.

DENIS, M.; GREGG, E. O. Studies on cytokine activation of listericidal activity in murine macrophages. **Canadian Journal of Microbiology**, 36: 671-5, 1990.

DRAMSL, S.; LEVI, S.; TRILLER, A.; COSSART, P. Entry of *Listeria monocytogenes* into neurons occurs by cell-to-cell spread: an in-vitro study. **Infect Immun**, 66(9): 4461-8, 1998.

EBINA, T.; FUJIMIYA, Y. Antitumor effect of a peptide-glucan preparation extracted from *Agaricus blazei* in a double-grafted tumor system in mice. **Biotherapy**, 11(4): 259-265, 1998.

EDELSON, B. T.; UNANUE, E. R. Immunity to *Listeria* infection. **Current Opinion in Immunology**, 12: 425-31, 2000.

FARGEAS, C.; WU, C. Y.; NAKAJIMA, T.; COX, D.; NUTMAN, T.; DELESPESE, G. Differential effect of transforming growth factor beta on

the synthesis of Th1-and Th2-like limphokines by human T lymphocytes. **Eur J Immunol**, 22 (8):2173-6, 1992.

FUJIMIYA, Y.; SUZUKI, Y.; OSHIMAN, K.; KOBORI, H.; MORIGUCHI, K.; NAKASHIMA, H. et al. Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis. **Cancer Immunol Immunother**, 46: 147-159, 1998.

GOLDFINE, H.; WADSWORTH, S. J. Macrophage intracellular signaling induced by *Listeria monocytogenes*. **Microbes Infect**, 4: 1335-43, 2002.

GRIMMINGER, F.; KREUSLER, B.; SCHNEIDER, U.; BECKER, G.; SEEGER, W. Influence of microvascular adherence on neutrophil leukotriene generation. Evidence for cooperative eicosanoid synthesis. **J Immunol**, 144: 1866-72, 1990.

GUNDE-CIMERMAN, N.; CIMERMAN, A. *Pleurotus* fruiting bodies contain the inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-lovastatin. **Exp Mycol**, 19(1): 1-6, 1995.

GUNDE-CIMERMAN, N.; PLEMENITAS, A.; CIMERMAN, A. *Plerotus* fungi produce mevinolin, an inhibitor of HMG CoA reductase. **FEMS Microbiol Lett**, 113(3): 333-7, 1993.

HAHN, H.; KAUFMANN, S. H. E. The role cell-mediated immunity in bacterial infections. **Rev Infect Dis**, 3: 1221-50, 1981.

HARTY, J. T.; TVINNEREIM, A. R.; WHITE, D. W. CD8⁺ T cell effector mechanism in resistance to infection. **Annu Rev Immunol**, 18: 275-308, 2000.

HAVELL, E. A.; MOLDAWER, L. L.; HELFGOTT, D.; KILIAN, P. L.; SEHGAL, P. B. Type I IL-1 receptor blockade exacerbates murine listeriosis. **J Immunol**, 148: 1486-92, 1992.

HUME, D. A.; PAVLI, P.; DONAHUE, R. E.; FIDLER, I. J. The effect of human recombinant macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) on the murine mononuclear phagocyte in vivo. **J Immunol**, 141: 3405-9, 1998.

ITO, H.; SHIMURA, K.; ITOH, H.; KAWADE, M. Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade strain 101) "Himematsutake" and its mechanisms in tumor-bearing mice. **Anticancer Res**, 17 (1A): 277-284, 1997.

ITOH, H.; ITO, H.; NODA, H. Inhibitory action of a (1-6)-beta-D-glucan-protein complex (FIII-2-b) isolated from *Agaricus blazei* Murill ("himematsutake") on Meth A fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor mechanism. **Jpn J Pharmacol**, 66 (2): 265-271, 1994.

KAUFMANN, S. H. E. Immunity to intracellular bacteria. **Annu Rev Immunol**, 11: 129-163, 1993.

KAUFMANN, S. H. E. Immunity to intracellular microbial pathogens. **Immunology Today**, 16(7): 338-42, 1995.

KAUFMANN, S. H. E.; HUG, E.; DELIBERO, G. *Listeria monocytogenes*-reactive T lymphocyte clones with cytolytic activity against infected target cells. **J Exp Med**, 164: 363-368, 1986.

KIM, H. M.; HAN, S. B.; OH, G. T.; KIM, Y. H.; HONG, D. H.; HONG, N. D.; et al. Stimulating of humoral and cell mediated immunity by polisaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. **Int J Immunopharmacol**, 18: 295-303, 1996.

KOLB-MÄURER, A.; WILHELM, M.; WEISSINGER, F.; BRÖCKER, E.; GOEBEL, W. Interaction of human hematopoietic stem cells with bacterial pathogens. **Blood**, 100 (10): 3703-9, 2002.

KUO, Y. C.; HUANG, Y. L.; CHEN, C.C.; LIN, Y. S.; CHUANG, K. A.; TSAI, W. J. Cell cycle progression and cytokine gene expression of human peripheral blood mononuclear cells modulated by *Agaricus blazei*. **Journal of laboratory and clinical medicine**, 140 (3): 176-187, 2002.

LEPAY, D. A.; STEINMAN, R. M.; NATHAN, C. F.; MURRAY, H. W.; CHON, Z. A. Liver macrophages in murine listeriosis: cell-mediated immunity is correlated with an influx of macrophages capable of generating reactive oxygen intermediates. **J Exp Med**, 161: 1503-12, 1985.

LEUNG, M. Y. K.; FUNG, K. P.; CHOY, Y. M. The isolation and characterization of a immunomodulatory and anti-tumor polysaccharide preparation from *Flammulina velutipes*. **Immunopharmacol**, 35: 255-263, 1997.

LIU, F.; OOL, V. C. E.; FUNG, M. C. Analysis of immuno modulating cytokine mRNAs in the mouse induced by mushroom polysaccharides. **Life Sciences**, 64: 1005-1011, 1999.

LIU, M.; KONG, F.; GAO, Y. Induction of immunomodulating cytokine by a new polysaccharide-peptide complex from culture mycelia of *lentinus edodes*. **Immunopharmacol**, 40: 187-198, 1998.

LLOYD, A. R.; OPPENHEIM, J. J. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. **Immunol Today**, 13: 169-72, 1992.

MACKANESS, G. B. Cellular resistance. **J Exp Med**, 116: 381-90, 1962.

MACKANESS, G. B.; HILL, W. C. The effect anti- lymphocyte globulin on cell-mediated resistance to infection. **J Exp Med.**,129: 1012, 1969.

McLAUCHLIN, J. The relationship between *Listeria* and listeriosis. **Food Control**, 7(4-5): 187-193, 1996.

MELO, A.; JUSTO, G. Z.; QUEIROZ, M. L. S. Stimulation of myelopliesis in *Listeria monocytogenes*- infected mice by an aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*. **Human & Experimental Toxicology**, 20: 38-45, 2001.

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

METCALF, D. Haemopoietic growth factors 1. **Lancet**, 8642: 825-7, 1989.

METCALF, D. The bioassay of colony stimulating factors. In: _ **The hemopoietic colony stimulating factors**. Amsterdan, New York, Oxford, Elsevier, 1984. p. 187-213.

MIELKE, M. E.; EHLERS, S.; HAHN, H. The role of cytokine in experimental listeriosis. **Immunobiology**, 189(3-4): 285-315, 1993.

MIZUNO, M.; MORIMOTO, M.; MINATO, K.; TSUCHIDA, H. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. **Biosci Biotechnol Biochem**, 62 (3): 434-437, 1998.

MIZUNO, T. Bioactive biomolecules of mushrooms: food function and medicinal effect of mushroom fungi. **Food Rev Intern**, 11(1): 7-21, 1995.

MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "Himematsutake," the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. **Agric Biol Chem**, 54(11): 2889-96, 1990a.

MIZUNO, T.; INAGAKI, R.; KANAO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K. et al. Antitumor activity and some properties of water-insoluble hetero-glycans from "Himematsutake," the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. **Agric Biol Chem**, 54(11): 2897-2905, 1990b.

MOORE, K. W.; O'GARRA, A.; MALEBYT, R. W.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T. R. Interleukin-10. **Annu Rev Immunol**, 11: 165-90, 1993.

NAKAJIMA, A.; ISHIDA, T.; KOGA, M.; TAKEUCHI, T.; MAZDA, O.; TAKEUCHI, M. Effect of hot water extract from *Agaricus blazei* Murill on antibody-producing cells in mice. **Inter Immunopharmacol**, 2: 1205-11, 2002.

NISHIBORI, T.; XIONG, H.; KAWAMURA, I.; ARAKAWA, M.; MITSUYAMA, M. Induction of cytokine gene expression by Listeriolysin O and roles of macrophages and NK cells. **Infect Immun**, 64: 3188-95, 1996.

NOMURA, T.; KAWAMURA, I.; TSUCHIYA, K.; KOHDA, C.; BABA, H.; ITO, Y. et al. Essential role of interleukin-12 (IL-12) and IL-18 for gamma interferon production induced by listeriolysin O in mouse spleen cells. **Infect Immun**, 70(3): 1049-55, 2002.

NORTH, R. J. The relative importance of blood monocytes and fixed macrophages to the expression on cell-mediated immunity of infection. **J Exp Med**, 132: 521-34, 1970.

NORTH, R. J.; DUNN, P. L.; CONLAN, J. W. Murine listeriosis as a model of antimicrobial defense. **Immunol Rev**, 158: 27-36, 1997.

PORTNOY, D. A.; AUERBUCH, V.; GLOMSKI, I. J. The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. **Journal of Cell Biology**, 158(3): 409-14, 2002.

QUADROS, M. R.; SOUZA BRITO, A. R. M.; QUEIROZ, M. L. S. *Petiveria alliacea* L. extract protects mice against *Listeria monocytogenes* infection – effects on bone marrow progenitor cells. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, 21(1): 109-24, 1999.

QUEIROZ, M. L. S. Células pluripotenciais em cultura: revisão bibliográfica. **Ciência e Cultura**, 40: 421-6, 1988.

QUEIROZ, M. L. S.; BINCOLETTO, C.; VALADARES, M. C.; DANTAS, D. C. M.; SANTOS, L. M. B. Effects of *Chlorella vulgaris* extract on cytokines production in *Listeria monocytogenes* infected mice. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, 24(3): 483-96, 2002.

QUEIROZ, M. L. S.; JUSTO, G. Z.; PEREIRA DA SILVA, F. R. R.; MÜLLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P. Stimulatory action of *Pluchea quitoc* Extract on the hematopoietic response during murine Listeriosis. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, 22(4): 721-40, 2000a.

QUEIROZ, M. L. S.; JUSTOS, G. Z.; VALADARES, M. C.; PEREIRA DA SILVA, F. R. R. Evaluation of *Caesalpinia ferrea* extract on bone marrow hematopoiesis in the murine models of Listeriosis and Ehrlich ascites tumor. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, 23(3): 367-82, 2001.

QUEIROZ, M. S. L.; QUADROZ, M. R.; SANTOS, L. M. B. Cytokine profile and Natural Killer cell activity in *Listeria monocytogenes* infected mice treated orally with *Petiveria alliacea* extract. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, 22(3): 501-18, 2000b.

QUEIROZ, M. L. S.; RODRIGUES, A. P. O.; BINCOLETTTO, C.; FIGUEIRÊDO, C. A. V.; MALACRIDAS, S. Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with *Listeria monocytogenes*. **International Immunopharmacology**, 3: 889-900, 2003.

RAKHMILEVICH, A. L. Neutrophils are essential for resolution of primary and secondary infection with *Listeria monocytogenes*. **J Leukoc Biol**, 57(6): 827-31, 1995.

RAYBOURNE, R. B.; ROTH, G.; DEUSTER, P. A.; STERNBERGE, M.; SINGH, A. Uptake and killing of *Listeria monocytogenes* by normal human peripheral blood granulocytes and monocytes as measured by flow cytometry and cell sorting. **Immunol Med Microbiol**, 31: 219-25, 2001.

ROGERS, H. W.; SHEEHAN, K. C. F.; BRUNT, L. M.; DOWER, S. K.; UNANUE, E. R.; SCHREIBER, R. D. Interleukin-1 participates in development of anti *Listeria* responses in both normal and scid mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, 89: 1011-5, 1992.

ROGERS, H. W.; TRIPP, C. S.; SCHREIBER, R. D.; UNANUE, E. R. Endogenous IL-1 is required for neutrophil recruitment and macrophage activation during murine listeriosis. **J Immunol**, 153: 2093-101, 1994.

ROGERS, H. W.; UNANUE, E. R. Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. **Infect Immunol**, 61(12): 5090-6, 1993.

ROLL, J. T.; YOUNG, K. M.; KURTZ, R. S.; CUZUPRYNSKI, C. J. Human rTNF alpha augments anti-bacterial resistance in mice: potentiation of its effects by recombinant human rIL-1 alpha. **Immunology**, 69: 316-2, 1990.

ROSEN, H.; GORDON, S.; NORTH, R. J. Exacerbation of murine listeriosis by a monoclonal antibody specific for type 3 complement receptor of mielomonocytic cells. Absence of monocytes at infective foci allows *Listeria* to multiply in non phagocytic cells. **J Exp Med**, 170:37, 1989.

SHE, Q. B.; NG, T.B.; LIU, W. K. A novel lectin with potent immunomodulatory activity isolated from both fruiting bodies and cultured mycelia of the edible mushroom *Volvariella volvacea*. **Biochem Biophys Res Commun**, 247: 106-11, 1998.

SHIMIZU, S.; KITADA, H.; YOKOTA, H.; YAMAKAWA, J.; MURAYAMA, T.; SUGIYAMA, K. et al. Activation of the alternative

complement pathway by *Agaricus blazei* Murill. **Phytomedicine**, 9(6): 536-45, 2002.

SORIMACH, K.; AKIMOTO, K.; IKEHARA, Y.; INAFUKU, K.; OKUBO, A.; YAMAZAKI, S. Secretion of TNF-alpha, IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei* Murill fractions in vitro. **Cell Structure and Function**, 26(2): 103-8, 2001.

SOUTHWICK, F. S.; PURICH, D. L. Intracellular pathogenesis of listeriosis. **New Engl J Med**, 334: 770-6, 1996.

STEVENSON, M. M.; KONGSHAVN, P. A. L.; SKAMENE, E. Genetic linkage of resistance to *Listeria monocytogenes* with macrophage inflammatory responses. **J Immunol**, 127: 402-7, 1981.

TAKAKU, T.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Isolation of antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. **Journal of Nutrition**, 131: 1409-13, 2001.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and its role in the generation of Th1 cells. **Immunology Today**, 14(7): 335-8, 1993.

TRIPP, C. S.; WOLF, S. F.; UNANUE, E. R. Interleukin-12 and tumor necrosis factor α are costimulators of interferon- γ production by Natural Killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin-10 is a physiologic antagonist. **Proc Natl Acad Sci USA**, 90: 3725-9, 1993.

UNANUE, E. R. Inter-relationship among macrophages, natural killer cells and neutrophils in early stages of *Listeria* resistance. **Curr Opinion Immunol**, 9: 35-43, 1997a.

UNANUE, E. R. Studies in listeriosis show the strong symbiosis between the innate cellular system and T-cell response. **Immunological Reviews**, 158: 11-25, 1997b.

VAN DEN ENGH, G. J.; BOL, S. The presence of a CSF enhancing activity in the serum of endotoxin treated mice. **Cell Tiss Kinet**, 8: 579-87, 1975.

VAN SCHOTHORST, M. Sampling plans for *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, 4/5(7): 203-8, 1996.

WAGNER, R. D.; MAROUSER, N. M.; BROWN, J. F.; CZUPRYNSKI, C. J. Treatment with anti interleukin-10 monoclonal antibody enhances early but impairs complete clearance of *Listeria monocytogenes* infection in mice. **Infect Immun**, 62: 2345-53, 1994.

WANG, H. X.; NG, T.B.; OOI V.E.; LIU, W. K.; CHANG S. T. A polysaccharide-peptide complex from cultured mycelia of the mushroom *Tricoloma mongolium* with immunoenhancing and antitumor activities. **Biochem Cell Biol**, 74: 95-100, 1996.

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

WING, E. J.; BARBCZYNSKI, L. K.; WAHEED, A.; SHADDUCK, R. K. Effect of *Listeria monocytogenes* infection on serum levels of colony-

stimulating factor and number of progenitor cells in immune and non-immune animals. **Infect Immun**, 49: 325-8, 1985.

WING, E. J.; MAGEE, D. M.; BARBCZYNSKI, L. K. Analysis of colony-stimulating factors and macrophage progenitor cells in mice immunized against *Listeria monocytogenes* by adoptive transfer. **Infect Immun**, 55: 1843-7, 1987.

WING, E. J.; WAHEED, A.; SHADDUCK, R. K. Changes in serum colony-stimulating factor and monocytic progenitor cells during *Listeria monocytogenes* infection in mice. **Infect Immun**, 45: 180-4, 1984.

YONG, A. M.; CHEERS, C. Colony-forming cells and colony-stimulating activity during listeriosis in genetically resistant or susceptible mice. **Cell Immunol**, 97: 227-37, 1986.

VIII APÊNDICE

Tabela 2. : Número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos BALB/c tratados com extrato seco do *Agaricus blazei* Murill nas doses de 500, 1000 e 1500mg/Kg por via oral durante 7 dias consecutivos, previamente à inoculação de uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* (1×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 24 horas após a inoculação da bactéria. Os animais somente infectados e controles receberam veículo (água) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados.

CFU-GM / Fêmur $\times 10^3$ – Unidade/ml

N	Controle	I	I/ABM 500mg/Kg	I/ABM 1000mg/Kg	I/ABM 1500mg/Kg
1	22,40	15,20	18,20	25,40	22,50
2	22,60	22,20	19,30	30,70	18,40
3	23,80	23,20	18,50	25,10	21,20
4	20,20	22,80	18,80	29,90	24,80
5	21,10	17,50	20,80	20,90	21,46
6	22,30	29,20	23,00	25,10	20,40
X	22,06	21,68	19,76	26,18	21,46
DP	1,25	4,80	7,03	3,60	2,13

I = Animais infectados com *Listeria monocytogenes*

I/ABM Animais tratados com extrato seco do *Agaricus blazei* Murill e infectados com *Listeria monocytogenes*.

Tabela 3. Número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos BALB/c tratados com extrato seco do *Agaricus blazei* Murill nas doses de 500, 1000 e 1500mg/Kg por via oral durante 7 dias consecutivos, previamente à inoculação de uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* (1×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 48 horas após a inoculação da bactéria. Os animais somente infectados e controles receberam veículo (água) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados.

CFU-GM / Fêmur $\times 10^3$ – Unidade/ml

N	Controle	I	I/ABM 500mg/Kg	I/ABM 1000mg/Kg	I/ABM 1500mg/Kg
1	22,40	12,00	11,80	26,7	22,8
2	22,60	11,50	15,25	23,8	17,6
3	23,80	4,30	11,80	20,8	25,9
4	20,20	5,50	20,90	19,9	23,6
5	21,10	4,60	13,50	20,6	20,65
6	22,30	4,30	12,70	19,6	21,65
X	22,06	7,03	14,32	21,9	22,03
DP	1,25	3,68	3,46	2,78	2,81

I = Animais infectados com *Listeria monocytogenes*

I/ABM Animais tratados com extrato seco do *Agaricus blazei* Murill e infectados com *Listeria monocytogenes*

Tabela 4. Número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos BALB/c tratados com extrato seco do *Agaricus blazei* Murill nas doses de 500, 1000 e 1500mg/Kg por via oral durante 7 dias consecutivos, previamente à inoculação de uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* (1×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 72 horas após a inoculação da bactéria. Os animais somente infectados e controles receberam veículo (água) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados.

CFU-GM / Fêmur $\times 10^3$ – Unidade/ml

N	Controle	I	I/ABM 500mg/Kg	I/ABM 1000mg/Kg	I/ABM 1500mg/Kg
1	22,40	5,30	7,30	14,80	16,4
2	22,60	4,00	9,10	12,40	15,6
3	23,80	8,10	13,90	17,10	17,9
4	20,20	11,60	8,20	18,40	15,0
5	21,10	11,40	9,80	15,00	18,5
6	22,30	9,10	9,70	18,40	18,4
X	22,06	8,25	9,66	16,01	16,96
DP	1,25	3,11	2,28	2,37	1,50

I = Animais infectados com *Listeria monocytogenes*

I/ABM = Animais tratados com extrato seco do *Agaricus blazei* Murill e infectados com *Listeria monocytogenes*

Tabela 5. Número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) da medula óssea de camundongos BALB/c tratados com extrato seco do *Agaricus blazei* Murill nas doses de 500, 1000 e 1500mg/Kg por via oral durante 7 dias consecutivos e sacrificados 24 horas após o término do tratamento. Os animais controles receberam veículo (água) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados.

CFU-GM / Fêmur x 10³ – Unidade/ml

N	Controle	ABM 500mg/Kg	ABM 1000mg/Kg	ABM 1500mg/Kg
1	22,40	18,00	22,90	19,40
2	22,60	17,60	21,75	19,90
3	23,80	17,50	23,00	22,75
4	20,20	19,00	18,90	20,20
5	21,10	18,40	18,90	26,10
6	22,30	18,90	24,90	22,30
X	22,06	18,23	21,69	21,77
DP	1,25	0,64	2,35	2,51

ABM Animais tratados com extrato seco do *Agaricus blazei* Murill

Tabela 6. Número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) do baço de camundongos BALB/c tratados com extrato seco do *Agaricu blazei* Murill nas doses de 500, 1000 e 1500mg/kg, por via oral durante 7 dias consecutivos, previamente previamente à inoculação de uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* (1×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 24 horas após a inoculação da bactéria. Os animais somente infectados e controles receberam veículo (água) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados.

CFU-GM / Baço $\times 10^2$ – Unidade/ml

N	Controle	I	I/ABM 500mg/Kg	I/ABM 1000mg/Kg	I/ABM 1500mg/Kg
1	36,00	63,40	30,20	47,90	8,60
2	36,00	45,00	14,40	39,60	13,70
3	36,00	56,20	11,90	52,90	49,70
4	63,36	71,30	14,40	21,60	27,00
5	32,40	69,10	15,00	32,40	28,80
6	31,70	70,00	4,30	21,60	25,60
X	39,24	62,50	15,03	36,00	25,56
DP	11,97	10,23	8,43	15,03	14,30

I = Animais infectados com *Listeria monocytogenes*

I/ABM Animais tratados com extrato seco do *Agaricus blazei* Murill e infectados com *Listeria monocytogenes*

Tabela 7. Número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) do baço de camundongos BALB/c tratados com extrato seco do *Agaricu blazei* Murill nas doses de 500, 1000 e 1500mg/kg, por via oral durante 7 dias consecutivos, previamente previamente à inoculação de uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* (1×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 48 horas após a inoculação da bactéria. Os animais somente infectados e controles receberam veículo (água) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados.

CFU-GM / Baço x 10^2 – Unidade/ml

N	Controle	I	I/ABM 500mg/Kg	I/ABM 1000mg/Kg	I/ABM 1500mg/Kg
1	36,00	312,10	17,30	10,10	57,60
2	36,00	270,00	23,00	34,60	55,40
3	36,00	243,40	18,70	25,90	79,60
4	63,36	269,10	16,20	19,80	55,08
5	32,40	273,40	20,20	69,10	50,40
6	31,70	272,00	15,80	16,20	97,20
X	39,24	273,30	18,53	29,28	65,88
DP	11,97	22,00	2,72	21,23	18,46

I = Animais infectados com *Listeria monocytogenes*

I/ABM Animais tratados com extrato seco do *Agaricus blazei* Murill e infectados com *Listeria monocytogenes*

Tabela 8. Número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) do baço de camundongos BALB/c tratados com extrato seco do *Agaricu blazei* Murill nas doses de 500, 1000 e 1500mg/kg, por via oral durante 7 dias consecutivos, previamente previamente à inoculação de uma dose subletal de *Listeria monocytogenes* (1×10^3 bactérias/animal). Os animais foram sacrificados 72 horas após a inoculação da bactéria. Os animais somente infectados e controles receberam veículo (água) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados.

CFU-GM / Baço $\times 10^2$ – Unidade/ml

N	Controle	I	I/ABM 500mg/Kg	I/ABM 1000mg/Kg	I/ABM 1500mg/Kg
1	36,00	146,60	18,70	70,20	90,70
2	36,00	105,80	28,80	51,50	60,50
3	36,00	118,90	7,20	79,60	61,20
4	63,36	148,60	18,20	46,80	11,00
5	32,40	120,90	19,00	47,50	57,90
6	31,70	128,20	17,00	50,40	60,50
X	39,24	128,17	18,15	57,00	65,33
DP	11,97	16,71	6,86	12,55	12,48

I = Animais infectados com *Listeria monocytogenes*

I/ABM Animais tratados com extrato seco do *Agaricus blazei* Murill e infectados com *Listeria monocytogenes*

Tabela 9: Número de precursores hematopoéticos (CFU-GM) do baço de camundongos BALB/c tratados com extrato seco do *Agaricus blazei* Murill nas doses de 500, 1000 e 1500mg/kg por via oral durante 7 dias consecutivos e sacrificados 24 horas após o término do tratamento. Os animais controle receberam veículo (água) na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados.

CFU-GM / Baço x 10² – Unidade/ml

N	Controle	ABM 500mg/Kg	ABM 1000mg/Kg	ABM 1500mg/Kg
1	36,00	36,20	30,30	25,20
2	36,00	28,90	32,40	36,70
3	36,00	35,50	38,50	40,30
4	63,36	36,30	42,80	30,20
5	32,40	39,50	36,20	31,70
6	31,70	39,40	31,60	30,20
X	39,24	35,96	35,30	32,38
DP	11,97	3,86	4,78	5,34

ABM Animais tratados com extrato seco do *Agaricus blazei* Murill

Tabela 10. Estudo dos efeitos do ABM sobre o a produção de fatores estimuladores de colônias em camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes* (1×10^3 bactérias/animal – i.p.). Os animais foram sacrificados 24 horas após a infecção.

FATORES ESTIMULADORES DE COLÔNIAS – Unidades/ml

N	Controle	I	I/ABM 500mg/Kg	I/ABM 1000mg/Kg	I/ABM 1500mg/Kg
1	3,00	28,40	26,40	60,00	36,60
2	4,00	30,50	23,38	49,80	39,60
3	2,00	27,40	20,30	55,90	37,60
4	3,00	32,50	17,30	57,90	38,64
5	4,00	26,40	16,27	53,89	36,60
6	2,00	33,50	18,30	55,90	38,64
X	3,00	29,78	20,32	55,56	37,94
DP	0,89	2,85	3,89	3,50	1,22

I = Animais infectados com *Listeria monocytogenes*

I/ABM Animais tratados com extrato seco do *Agaricus blazei* Murill e infectados com *Listeria monocytogenes*

Tabela 11. Estudo dos efeitos do ABM sobre o a produção de fatores estimuladores de colônias em camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes* (1×10^3 bactérias/animal – i.p.). Os animais foram sacrificados 48 horas após a infecção.

FATORES ESTIMULADORES DE COLÔNIAS – Unidades/ml

N	Controle	I	I/ABM 500mg/Kg	I/ABM 1000mg/Kg	I/ABM 1500mg/Kg
1	3,00	65,00	48,80	90,50	49,80
2	4,00	47,79	63,00	122,00	91,50
3	2,00	54,90	50,80	91,50	121,00
4	3,00	57,90	56,90	99,66	93,50
5	4,00	61,00	55,90	111,80	96,60
6	2,00	45,70	61,00	118,90	101,69
X	3,00	55,38	56,06	105,73	92,34
DP	0,89	7,51	5,54	13,75	23,40

I = Animais infectados com *Listeria monocytogenes*

I/ABM Animais tratados com extrato seco do *Agaricus blazei* Murill e infectados com *Listeria monocytogenes*

Tabela 12. Estudo dos efeitos do ABM sobre o a produção de fatores estimuladores de colônias em camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes* (1×10^3 bactérias/animal – i.p.). Os animais foram sacrificados 72 horas após a infecção.

FATORES ESTIMULADORES DE COLÔNIAS – Unidades/ml

N	Controle	I	I/ABM 500mg/Kg	I/ABM 1000mg/Kg	I/ABM 1500mg/Kg
1	3,00	20,30	41,69	40,67	37,60
2	4,00	23,38	29,50	43,72	36,60
3	2,00	22,37	30,50	42,71	39,60
4	3,00	20,30	38,60	41,69	35,59
5	4,00	21,35	35,59	40,67	36,60
6	2,00	23,38	31,50	43,72	37,60
X	3,00	21,84	34,56	42,19	37,26
DP	0,89	1,41	4,89	1,40	1,36

I = Animais infectados com *Listeria monocytogenes*

I/ABM Animais tratados com extrato seco do *Agaricus blazei* Murill e infectados com *Listeria monocytogenes*

Tabela 13. Estudo dos efeitos do ABM sobre o a produção de fatores estimuladores de colônias em camundongos BALB/c.

FATORES ESTIMULADORES DE COLÔNIAS – Unidades/ml

N	Controle	ABM 500mg/Kg	ABM 1000mg/Kg	ABM 1500mg/Kg
1	3,00	10,16	23,38	34,57
2	4,00	11,18	21,35	32,54
3	2,00	9,15	20,30	33,55
4	3,00	12,20	22,37	30,50
5	4,00	10,16	23,38	32,54
6	2,00	9,15	22,37	33,55
X	3,00	10,33	22,19	32,87
DP	0,89	1,18	1,19	1,38

ABM Animais tratados com extrato seco do *Agaricus blazei* Murill

Tabela 14. Estudo dos efeitos de diferentes doses de ABM sobre o peso do baço de camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes* (1×10^3 bactérias/animal – i.p.). O baço dos animais foi coletado 24 horas após a infecção.

PESO DO BAÇO (mg)

N	Controle	I	I/ABM 500mg/Kg	I/ABM 1000mg/Kg	I/ABM 1500mg/Kg
1	114	135	125	116	117
2	113	141	133	118	117
3	116	138	123	120	116
4	114	132	124	115	115
5	116	136	130	117	119
6	115	136	120	115	118
X	114,67	136,33	125,83	116,83	117,00
DP	1,2	3,0	4,7	1,9	1,4

I = Animais infectados com *Listeria monocytogenes*

I/ABM Animais tratados com extrato seco do *Agaricus blazei* Murill e infectados com *Listeria monocytogenes*

Tabela 15. Estudo dos efeitos de diferentes doses de ABM sobre o peso do baço de camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes* (1×10^3 bactérias/animal – i.p.). O baço dos animais foi coletado 48 horas após a infecção.

PESO DO BAÇO (mg)

N	Controle	I	I/ABM 500mg/Kg	I/ABM 1000mg/Kg	I/ABM 1500mg/Kg
1	114	190	134	120	134
2	113	209	140	125	132
3	116	206	145	130	138
4	114	195	139	131	130
5	116	203	142	120	120
6	115	214	144	135	127
X	114,67	202,83	140,67	126,83	130,17
DP	1,2	8,9	3,9	6,1	6,2

I = Animais infectados com *Listeria monocytogenes*

I/ABM Animais tratados com extrato seco do *Agaricus blazei* Murill e infectados com *Listeria monocytogenes*

Tabela 16. Estudo dos efeitos de diferentes doses de ABM sobre o peso do baço de camundongos BALB/c infectados com *Listeria monocytogenes* (1×10^3 bactérias/animal – i.p.). O baço dos animais foi coletado 72 horas após a infecção.

PESO DO BAÇO (mg)

N	Controle	I	I/ABM 500mg/Kg	I/ABM 1000mg/Kg	I/ABM 1500mg/Kg
1	114	180	130	120	132
2	113	180	129	121	130
3	116	183	131	123	129
4	114	192	127	131	127
5	116	181	133	136	125
6	115	174	130	132	120
X	114,67	181,67	130,00	127,17	127,17
DP	1,2	5,8	2,0	6,6	4,2

I = Animais infectados com *Listeria monocytogenes*

I/ABM Animais tratados com extrato seco do *Agaricus blazei* Murill e infectados com *Listeria monocytogenes*

Tabela 17. Estudo dos efeitos de diferentes doses do ABM sobre o peso do baço de camundongos BALB/c.

PESO DO BAÇO (mg)

N	Controle	ABM 500mg/Kg	ABM 1000mg/Kg	ABM 1500mg/Kg
1	114	115	113	112
2	113	116	112	115
3	116	114	115	116
4	114	115	116	113
5	116	113	117	114
6	115	116	114	115
X	114,67	114,83	114,50	114,17
DP	1,2	1,1	1,8	1,4

ABM Animais tratados com extrato seco do *Agaricus blazei* Murill