

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Priscila Raquel Martins

**EFEITO DE PEPTIDOGLUCANAS
EXTRAÍDAS DO COGUMELO *Agaricus blazei*
SOBRE A ATIVIDADE CANDIDACIDA DE
MACRÓFAGOS PERITONEAIS MURINOS**

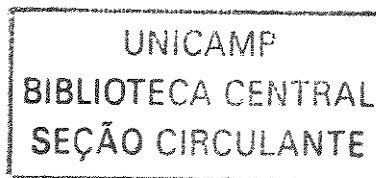
Orientador: Prof. Dr. Ramon Kaneno

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 Bióloga – Priscila Raquel Martins.

Campinas, 27 de agosto de 2004.

Prof. Dr. Ramon Kaneno
- Orientador -

**Campinas
2004**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Priscila Raquel Martins

**EFEITO DE PEPTIDOGLUCANAS
EXTRAÍDAS DO COGUMELO *Agaricus blazei*
SOBRE A ATIVIDADE CANDIDACIDA DE
MACRÓFAGOS PERITONEAIS MURINOS**

Orientador: Prof. Dr. Ramon Kaneno

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Curso de Pós-
Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do título
de Mestre em Farmacologia

**Campinas
2004**

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	M366e
V	EX
TOMBO BC/	61887
PROC.	16-86-05
C	☐
D	☒
PREÇO	11.00
DATA	11-09-05
Nº CPD	

Bibid: 341425

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

M366e Martins, Priscila Raquel
Efeito de peptidoglucanas extraídas do cogumelo *Agaricus blazei*
sobre a atividade candidacida de macrófagos peritoneais murinos /
Priscila Raquel Martins. Campinas. SP : [s.n.]. 2004.

Orientador : Ramon Kaneno
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Cândida albicans. 2. Macrófagos. 3. Cogumelos. I. Ramon
Kaneno. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Ramon Kaneno

Membros:

Profª. Drª. Silvia de Barros-Mazon

Profª. Drª. Ângela Maria Victoriano de Campos Soares

Profª. Drª. Dagmar Ruth Stach Machado

Drª. Ana Lúcia Tozzi Spinardi-Barbisan

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

Data: 27/08/04

*“A vida não é um corredor reto e tranqüilo que
nós percorremos livres e sem empecilhos,
mas um labirinto de passagens,
pelas quais nós devemos procurar nosso
caminho, perdidos e confusos, de vez em quando
presos em um beco sem saída.*

*Porém, se tivermos fé,
uma porta sempre será aberta para nós,
não talvez aquela sobre a qual nós mesmos nunca pensamos,
mas aquela que definitivamente
se revelará boa para nós.”*

A. J. Cronin

DEDICATÓRIA

A ti meu Deus,

pela força nas horas de fraqueza,

pela sustentação nos momentos de dúvida,

pela lucidez em perceber minhas falhas,

pelas bênçãos e maravilhas de Tuas mãos recebidas!

Aos meus pais Lourdes e Florisvaldo,

pelo amor, carinho e dedicação de

sempre, que tudo fizeram pela minha formação

moral, afetiva e intelectual.

*Ao Prof. Dr. Ramon Kaneno por ter me recebido em seu laboratório, que
pacientemente compreendeu as minhas ansiedades, orientando e contribuindo
para minha formação, pela confiança, amizade e seu exemplo profissional.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao Wagner Loyola, pela participação nas análises de expressão de receptores de manose realizadas.

À Profa. Dra. Fátima Sugizaki, pelo fornecimento das amostras de Candida albicans utilizadas.

Aos Profs. Dr. Júlio Toshime Toyama, Dr. Luis Claudio Di Stasi, Dr. Luis Cuadrado pelo suporte técnico e auxílio na preparação da fração ATF.

Aos Professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia pela contribuição na minha formação e amizade cultivada durante esses anos.

Aos Funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia que dedicaram seus trabalhos e contribuíram para esta conquista, deixo a minha gratidão e a minha amizade.

Aos colegas e amigos do Departamento de Microbiologia e Imunologia pelos ótimos momentos de conversa e pelo agradável convívio no nosso ambiente de trabalho.

As amigas Fabiane, Giovanna, Graziela, Lindsey, Maria Carolina e Vanessa que dividiram comigo as alegrias e tristezas do dia-a-dia profissional, pela amizade, carinho e ajuda.

Às amigas “congas” e às amigas Virgínia, Raquel, Patrícia, Luisa e Carol pelos momentos de descontração, pelas gargalhadas e, sem dúvida, pela eterna amizade.

Ao Carlinhos (MI) pelo fornecimento dos animais utilizados nesse trabalho.

Aos funcionários do Biotério do Departamento de Patologia, UNESP, Paulo César Georgeti (PC) e Glória Ap. Rodrigues pelo apoio na manutenção e manejo dos animais utilizados nesse estudo.

Ao setor bibliotecário do campus da UNESP de Botucatu que auxiliou na organização das referências citadas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo suporte financeiro que permitiu a realização deste estudo (Proc.98/07726-5R) Projeto Temático de Cogumelos Comestíveis e Medicinais.

Aos animais

“Foste um instrumento de nosso aprendizado?

Foste apenas um objeto de experiência?

Não

*Foste para nós, vítimas solicitadas pela ciência, para benefício da
humanidade, porém apesar do teu olhar mudo e de não teres a permissão
da palavra, isso não nos impedirá de dizer-te sempre:*

MUITO OBRIGADA!!

(Desconhecido)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
RESUMO.....	13
INTRODUÇÃO.....	14
OBJETIVOS.....	27
MATERIAL E MÉTODOS.....	29
RESULTADOS	36
DISCUSSÃO	44
CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	52
ABSTRACT	68

LISTA DE ABREVIATURAS

A. blazei – *Agaricus blazei*

ATF – peptidoglicanas oxalato-solúvel ácido-tratada ispladas de *A. blazei*

β -glucanas – beta glucanas

BSA-FITC – BSA manosilada conjugada com isotiocianato de fluoresceína

C. albicans – *Candida albicans*

Con-A – concanavalina-A

DO – densidade óptica

GM-CSF – fator estimulador de crescimento granulócito-macrófago

HMQC – espectroscopia de correlação heteronuclear

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

IL – interleucina

IFN- γ - interferon gama

MGG – corante May-Grunwald-Giemsa

MR – receptor de manose

NO – óxido nítrico

O₂⁻ - ânion superóxido

OH⁻ - radical hidroxila

PRR – receptor de reconhecimento de padrões

ROIs – reativos intermediaries do oxigênio

RNM – ressonância magnética nuclear

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

TGF- β - fator de crescimento e transformação beta

UFC – unidade formadora de colônias

RESUMO

A atividade imunomoduladora de cogumelos medicinais é atribuída principalmente às β -glucanas. Neste estudo, avaliamos o efeito de peptidoglucanas extraídas do cogumelo *Agaricus blazei* (ATF) quanto à atividade candidacida, expressão de receptores de manose e produção de H_2O_2 e NO por macrófagos peritoneais murinos. Camundongos normais BALB/c receberam três inoculações intraperitoneais de solução salina (grupo controle) ou fração ATF (grupo ATF) e após 48 horas os macrófagos peritoneais foram coletados e ensaiados contra leveduras de *Candida albicans*. Nossos resultados indicam que o tratamento aumentou a atividade candidacida de macrófagos, produção de H_2O_2 e expressão de receptores de manose, contudo, o tratamento não alterou a produção de NO. Nossos resultados sugerem que a fração ATF pode aumentar a resistência contra agentes infecciosos devido à estimulação da atividade microbica de macrófagos.

Palavras-chave: *Candida albicans*, macrófagos, cogumelos.

Introdução

INTRODUÇÃO

A *Candida albicans* (*C.albicans*) é um fungo pertencente ao grupo dos Deuteromicetos, que se apresenta como leveduras, de forma oval, com brotamento, que produz pseudo-hifas tanto em cultura quanto em tecidos e exsudatos (EDMAN, 1998). Trata-se de um membro da microbiota normal das mucosas no trato respiratório, gastrointestinal e genital feminino que, em condições particulares, pode atuar como patógeno oportunista (EDMAN, 1998). Frequentemente, provoca infecções em indivíduos imunocomprometidos, como pacientes diabéticos (DONDEERS, 2002), portadores de HIV (KLEIN et al., 1984) e pacientes com câncer sob tratamento quimioterápico (RIDOLA et al., 2004). Em casos de endocrinopatias como o hipotireoidismo, hipoadrenalismo e diabetes, há um aumento na predisposição a candidíase, associado ao aumento da glicemia e deficiência imune (MARTINS, 1980). A incidência de *Candida* também aumenta durante a gravidez devido a um aumento na concentração de glicogênio pelas células da mucosa vaginal, causando desconforto para a paciente (SALVATORE, 1980).

A resistência a *C. albicans* depende da coordenação entre defesa imune adaptativa e inata sendo a fagocitose por neutrófilos e macrófagos crucial para este processo. A candidíase invasiva está associada a defeitos na função fagocítica, como observado em pacientes neutropênicos e em pacientes com infecção crônica granulomatosa ou mieloperoxidase deficiente (COHEN et al., 1981).

Algumas vezes, o fungo pode provocar doença sistêmica progressiva em pacientes debilitados ou imunossuprimidos, sobretudo, se houver comprometimento da imunidade celular. Uma condição extrema é a

candidíase mucocutânea crônica, associada com uma disfunção específica de células T (KLEIN et al., 1984).

Com relação à destruição de microrganismos por células fagocíticas, o mecanismo envolve seu reconhecimento/fixação da superfície celular e processo de morte seguindo a fagocitose ou endocitose. A fagocitose é mais eficaz em presença das opsoninas como IgG e IgM, ou fragmentos do complemento ativados por esses anticorpos ou pela via alternativa. Portanto, a imunidade contra *C. albicans* depende da ativação dos linfócitos B e CD4+ (GORCZYNSKI & STANLEY, 2001).

Os fagócitos ativados produzem reativos intermediários do oxigênio (ROIs) como H_2O_2 , O_2^- e OH^- além de óxido nítrico (NO) que são altamente tóxicos (GOLDSBY et al., 2000). Assim, a produção destes fatores, bem como o aumento de sua capacidade de aderência e espreadimento, de sua atividade microbicida e da produção de fatores solúveis, têm sido utilizados como indicadores do estado de ativação destas células (FECCHIO, 1989; CALVI et al., 2003).

Calderone et al. (1994) sugeriram que a ligação dos fungos aos polimorfonucleares levaria à produção de oxidantes citotóxicos como H_2O_2 e O_2^- que exerceriam atividade fungicida. O peróxido de hidrogênio é gerado a partir da redução do NADPH, que passa os elétrons para o citocromo da membrana celular e faz com que ocorra a redução do ânion superóxido pela NADPH oxidase. Pela influência da superóxido dismutase, transforma-se em peróxido de hidrogênio e depois em radicais hidroxilas (OH) microbicidas, agindo toxicamente nos microrganismos no ambiente extracelular (ROOT & METCALF, 1977 apud PICK & KEISARE, 1980). O aumento da produção deste metabólito do oxigênio é considerado uma medida da ativação macrofágica. Estes metabólitos, além das atividades microbicidas e

citotóxicas, possuem importantes propriedades imunorreguladoras e inflamatórias (LOS et al., 1995; WEISS, 1989). Steinhagen & Furth (1993) demonstraram que o aumento da atividade candidicida por granulócitos ativados com rIFN- γ foi devido a um aumento na produção de radicais reativos do oxigênio.

Outro fator tóxico que pode estar envolvido na ação fungicida é o NO, cuja síntese ocorre a partir da oxidação do aminoácido L-arginina, por ação de enzimas chamadas de NO sintase (NOS) que removem o nitrogênio guanidina terminal da L-arginina formando L-citrulina e NO (MOILANEN et al., 1999). Há três tipos de NOS: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível por citocinas (iNOS) (MOILANEN et al., 1999; COTRAN et al., 2000). A eNOS e nNOS são essencialmente expressas em baixos níveis e, podem ser ativadas rapidamente, por um aumento dos íons cálcio citoplasmáticos na presença de calmodulina. O influxo de cálcio para dentro dessas células acarreta uma rápida produção de NO. A iNOS, em contraste, é induzida quando os macrófagos são ativados por citocinas (IFN- γ) ou outros agentes como lipopolissacárides (LPS) e muramil dipeptídeo (MDP); não havendo necessidade de aumento intracelular de cálcio (COTRAN et al., 2000). Níveis altos de produção de NO por uma variedade de células parecem limitar a replicação de bactérias, helmintos, protozoários, vírus, bem como células tumorais, sob o risco de lesão inflamatória potencial das células e tecidos do hospedeiro (MOILANEN et al., 1999; COTRAN et al., 2000). O macrófago é o produtor mais proeminente de NO em meio inflamatório. Alguns estímulos inflamatórios que induzem a expressão de iNOS, também induzem a produção de arginase, que depleta arginina. A regulação da iNOS ocorre principalmente por transcrição gênica, que pode ser ativada por citocinas pró-inflamatórias como IL-1, TNF- α e IFN- γ e endotoxina (LPS), enquanto os glicocorticóides e

as citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e TGF- β , são inibitórias. Na maioria dos sistemas, porém, combinações de citocinas são geralmente indutoras mais potentes de NO do que citocinas utilizadas isoladamente (MONCADA & HIGGS, 1993).

Existe uma variedade de moléculas de superfície que aumentam a função fagocítica como receptores de complemento (CR1 e CR3), receptores para a porção Fc de anticorpos (FcR) e receptores de reconhecimento de padrões (PRR), como os receptores de manose (MR), o qual está envolvido no reconhecimento e fagocitose de microrganismos não-opsonizados.

O MR pode se ligar diretamente à glicana presente na *C. albicans* (STAHL & EZEKOWITZ, 1998). A transfecção transitória do receptor humano de manose para células COS-1 demonstrou que o receptor é suficiente para mediar a ligação de *C. albicans* e *Pneumocystis carinii* (EZEKOWITZ et al., 1990; EZEKOWITZ et al., 1991), exemplos de patógenos que têm parede celular rica em manose.

O MR é uma proteína transmembrânica de 180 kDa com cinco domínios: uma região amino terminal rica em cisteína, um domínio contendo fibronectina do tipo II, uma série de oito domínios de reconhecimento de carboidrato tipo lectina (CRDs), um domínio transmembrânico e um domínio carboxi-terminal citoplasmático. O reconhecimento da manose e fucose é restrito ao CRDs (TAYLOR et al., 1992; MULLIN, et al., 1994; MULLIN, et al., 1997). Entretanto, evidências indicam que glicoproteínas ligadas a açúcares sulfatados são reconhecidos pelo domínio rico em cisteína (FIETE et al., 1998). O grau de homologia entre CRDs-MR de camundongos e humanos é de 76-92%, com maior similaridade no CRD 4.

Foi primeiramente identificado em células de Kupffer de ratos como um sistema de captura específico de glicoproteínas fucosilada e manosilada/N-

acetilglucosamina terminal (SCHLESINGER et al., 1978). Estudos têm demonstrado sua presença em macrófagos peritoneais (STAHL & GORDON, 1982) e alveolares (STAHL & EZEKOWITZ, 1978), bem como fagócitos mononucleares humanos (SHEPHERD et al., 1982).

Admite-se que esse receptor pode mediar a fagocitose de microrganismo não-opsonizado interagindo com polissacarídeos da parede celular, bem como manana fúngica, cápsula bacteriana, lipopolissacáride e lipoarabinomanana (OFEK et al., 1995).

O envolvimento do MR na fagocitose da *C. albicans* e resposta antifúngica têm sido demonstrados. Loyola et al., (2002) sugeriram que o tratamento com Con-A aumentou a atividade desses receptores e isso estava associado com uma maior atividade candidacida.

Em numerosos estudos, tem sido indicado que produtos obtidos de cogumelos possuem propriedades imunopotenciadoras, entre estes, destacam-se os cogumelos comestíveis e medicinais, cujo consumo é particularmente difundido entre os povos orientais, gerando considerável interesse em possíveis agentes farmacológicos antitumorais. Os cogumelos comestíveis possuem importantes valores nutricionais e diferentes componentes bioativos cujo conteúdo e propriedades medicinais dependem da maneira pela qual são preparados para consumo (CHANG, 1996), isto é, concentração, fase de coleta, diluente utilizado, método de extração, entre outros fatores, como tem indicado estudos prévios (EIRA et al., 2000).

A principal substância bioativa de cogumelos são polissacarídeos obtidos do corpo de frutificação (MIZUNO et al., 1990a; MIZUNO et al., 1990b; FUJIMIYA et al., 1998; EBINA & FUJIMIYA, 1998) e a atividade imunomoduladora é atribuída principalmente às β -glucanas (MIZUNO et al., 1990a.; ITO et al., 1997; EBINA & FUJIMIYA, 1998).

A potencialização da resposta imune celular, pelos polissacarídeos ou complexo protéicos-polissacarídicos pode resultar na ativação de muitos tipos de células imune que são de grande importância para a manutenção da homeostasia.

Entre as diferentes espécies de cogumelos estudadas, há relatos de que complexos polissacarídicos provenientes do cogumelo *Tricholoma mongolium* foram capazes de ativar macrófagos, estimulando a apresentação de antígenos por estas células, aumentando a proliferação de células T e inibindo o crescimento do sarcoma 180 implantado em camundongos BALB/c (WANG et al., 1996 a). Esses mesmos autores demonstraram também que o complexo polissacarídeo-peptídeo extraído do cogumelo *Coriolus versicolor* aumentou a resposta de células T a mitógenos tanto *in vivo* como *in vitro*, porém não exerceu atividade citotóxica direta contra diferentes linhagens de células (WANG et al., 1996b). Leung et al. (1997) isolaram do cogumelo *Flammulina velutipes* um polissacarídeo que, quando injetado no peritônio de camundongos, foi capaz de induzir proliferação de linfócitos esplênicos, dilatação vascular e reação hemorrágica.

Kim et al. (1996) extraíram da cultura de micélio do cogumelo *Phellinus linteus*, 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 NK, macrófagos e a resposta humoral. Além disso, esse mesmo polissacarídeo prolongou a sobrevivência de camundongos inoculados com células de melanoma (B16F10) e reduziu a frequência de metástases pulmonares em camundongos inoculados com células de câncer pulmonar (NCI-H23) embora não exercesse citotoxicidade direta para estas duas linhagens de células tumorais concluindo

assim, que a atividade antitumoral desse polissacarídeo é devido a potencialização da imunidade do hospedeiro (HAN et al., 1999).

Liu et al. (1998) isolaram uma 1-3- β -D-glucana (lentinana) do cogumelo *Lentinulas edodes* (*L. edodes*) e demonstraram que após sua adição em culturas celulares (murinas e humanas), a expressão de genes codificadores de IL-2 e TNF- α aumentaram de maneira dose-dependente, sugerindo que *L. edodes* pode induzir resposta imunológica dependente dos linfócitos T. Esses autores também observaram que, de modo similar à lentinana, o PSPC (complexo polissacarídeo-proteína extraído de *L. edodes*), também apresenta ação imunomoduladora. Os polissacarídeos administrados a camundongos normais, aumentam a expressão de mRNA de IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IFN- γ e GM-CSF em macrófagos peritoneais e células mononucleares do baço (LIU et al., 1999).

Suzuki et al. (1990) avaliaram o efeito da administração oral de 1,3- β -glucana extraída do fungo *Sclerotinia sclerotium* (SSG) sobre a atividade funcional de macrófagos peritoneais e observaram que este composto foi capaz de aumentar a atividade fagocítica, atividade candidacida, produção de H₂O₂ e IL-1.

β -glucanas de fungos também são capazes de induzir a síntese de óxido nítrico (NO) por macrófagos e a intensidade da síntese de NO depende da estrutura da β -glucana (OHNO et al., 1996; HASHIMOTO et al., 1997). Macrófagos ativados por citocinas ou lipopolissacarídeos (LPS) secretam NO o qual é tóxico para células tumorais e microrganismos (NORRIS et al., 1995; MACMICKING et al., 1995; MOON et al., 1999).

Complexos polissacarídicos obtidos do cogumelo *Agaricus blazei* ss. Heinem. (*A. blazei*), também têm sido alvo de estudos. O *A. blazei* é um

cogumelo comestível, também conhecido como cogumelo-do-sol, cogumelo princesa, cogumelo Piedade, himmematsutake e Royal agaricus. Recentemente, foi classificado como espécie nova, sendo denominado *Agaricus brasiliensis* (WASSER et al., 2002). Faz parte de uma divisão do Reino Fungi - Basidiomycota - representada por organismos saprófitas que necessitam de matéria orgânica encontrada na natureza para o seu desenvolvimento. Esse cogumelo tem excelente valor nutricional, contendo água, proteínas, gorduras (ácidos graxos), fibras, minerais (Cu, Zn, Mn, P, Fe, Ca) e vitaminas (B1, B2, C, K, D, niacina, entre outras) (MIZUNO et al., 1990a).

Há relatos de que *A. blazei* é originário do Brasil, de onde foi levado para o Japão (MIZUNO et al 1990a), onde se iniciaram pesquisas sobre suas prováveis propriedades medicinais. Nas investigações iniciais sobre as propriedades do cogumelo *A. blazei*, Kawagishi et al. (1989, 1990) realizaram extrações seqüenciais com etanol, oxalato de amônio e hidróxido de sódio e através de cromatografia em gel obtiveram várias frações do produto, que foram testadas quanto à atividade antitumoral no modelo de sarcoma 180. Os melhores resultados foram apresentados por uma fração de baixo peso molecular denominada FIII-2-b, constituída principalmente de cadeias simples de (1→6) β -glucopiranosil como elemento glucana e 43,3% de proteínas, com alto teor de alanina e leucina, e baixo teor de metionina, histidina e tirosina.

Os estudos realizados por Mizuno et al. (1990b), indicaram que a ação imunoestimulante é devida às β -glucanas presentes tanto na porção solúvel quanto insolúvel das preparações aquosas de *A. blazei*. Este mesmo grupo utilizando micélios de *A. blazei* cultivados em meio líquido, isolou ainda um segundo polissacarídeo, com atividade antitumoral contra o Sarcoma 180,

completamente diferente do isolado do corpo de frutificação, o β -(1→6) – glucana.

A ação antitumoral dos produtos isolados deste cogumelo é atribuída a sua atividade imunoestimulante, desde que o complexo protéico-polissacarídico isolado, denominado ATOM (antitumor organic substance Mie), não apresentou atividade citotóxica direta contra diferentes linhagens de células tumorais testadas (Ito et al. 1997). Assim, há relatos de que produtos do cogumelo *A. blazei* têm a capacidade de estimular mecanismos imunológicos como a atividade *natural killer* (FUJIMIYA et al., 1998; KANENO et al., 2004). Em relação aos macrófagos, Ito et al. (1997) demonstraram que os compostos proteoglicanos estimulam a atividade fagocítica de macrófagos, enquanto que Sorimachi et al. (2001) observaram que componentes de *A. blazei* são capazes de ativar macrófagos, resultando num aumento da produção de TNF- α , IL-8 e NO in vitro.

A análise de linfócitos esplênicos usando citometria de fluxo mostrou que as porcentagens de células T (CD3⁺), T auxiliares (CD4⁺) e células T citolíticas (CD8⁺) estavam aumentadas em animais oralmente tratados com uma fração extraída de *A. blazei* solúvel em água quente quando comparados com animais tratados apenas com salina, sugerindo, desta forma, que polissacarídeos de *A. blazei* podem exercer um efeito profilático efetivo, protegendo o homem contra o câncer, pela estimulação de linfócitos T citotóxicos (MIZUNO et al., 1998). Ao contrário, Nakajima et al (2002), não encontraram diferenças significativas nas porcentagens de células CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺ mas, demonstraram que a fração solúvel em água quente induziu aumento na produção de anticorpos, aumentou a população de células MAC-1⁺ (granulócitos, monócitos e células NK) e CD-25⁺ (macrófagos, linfócitos T e B ativadas). Esse extrato ainda aumentou a expressão de mRNA de IL-6 e

IL-1 β , tanto em macrófagos peritoneais como em células esplênicas, sugerindo que o aumento na produção de anticorpos induzido pelo extrato ocorreu devido à produção de IL-1 β e IL-6 por células T e macrófagos ativados, resultando na diferenciação de célula B e produção de anticorpos.

Nos estudos realizados pelo nosso grupo, não foi observado efeito significativo da administração de extrato aquoso de *A. blazei* sobre a produção de anticorpos antitumorais, porém, o tratamento foi capaz de inibir o crescimento do tumor de Ehrlich subcutâneo e o extrato obtido à temperatura ambiente (22°C) foi mais eficiente que aqueles obtidos a 60 ou 100°C, em aumentar a sobrevivência dos animais (SANTOS, 1998). O extrato aquoso não foi capaz de aumentar a resposta linfoproliferativa e nem a atividade das células NK, entretanto, o extrato hexânico de *A. blazei* foi capaz de restaurar a atividade de células NK inibida pela presença do tumor (KANENO et al., 2004).

Fujimiya et al. (1998) relataram que as proteoglicanas oxalato-solúveis e submetidas a tratamento ácido (ATF) isoladas de basideocarpos de *A. blazei* conferem proteção contra o desenvolvimento do fibrossarcoma induzido por metilcolantreno (Meth A) quando administrados *in situ*. Esses autores observaram ainda que o tratamento confere proteção contra o desenvolvimento de um segundo implante tumoral em local distante do sítio primário. Esses autores sugerem que a inibição do desenvolvimento tumoral deve-se à estimulação da atividade NK, evidenciada pelo aumento de células NK1.1⁺ no sítio tumoral. Os dados apresentados indicam que o tratamento favorece a geração de células citotóxicas específicas, uma vez que apresentam atividade lítica contra células tumorais singênicas (Meth A). Além disso, observaram que a fração ATF induz apoptose nas células tumorais *in vitro*

como caracterizado pela fragmentação de DNA e expressão do marcador Apo2.7.

A atividade tumoricida da ATF pode ser devida à presença de (1-4)- α -D-glucana e (1-6)- β -D-glucana na razão de 1:2 (massa molecular 170 kDa) da fração final purificada (FUJIMIYA et al., 1998). Posteriormente, esses autores isolaram uma fração de baixo peso molecular a LM-3 (20kDa), também contendo complexos α -glucana e β -glucana juntos com grande quantidade de proteínas (60% glicose e 40% proteína) consistindo de proteoglicana, contendo principalmente α -(1,4)- β -glucana. Essa fração apresentou atividade tumoricida mais intensa quando comparada ao controle, às frações LM-1 (24kDa), LM-2 (24kDa) e ao ATF (170kDa) (FUJIMIYA et al., 1999). Neste mesmo estudo, os autores observaram também o efeito da administração intratumoral dos extratos oxalato-solúvel (OSE) ou oxalato-solúvel ácido-tratado (ATF) e ambos demonstraram atividade similar, indicando que o tratamento ácido não afeta a atividade tumoricida das frações extraídas (FUJIMIYA et al., 1999). Os resultados obtidos por Oshiman et al. (2002), demonstraram que a administração oral da ATF resultou em uma notável regressão do tumor. Assim, os autores sugerem que a simples hidrólise ácida de produtos naturais pode não apenas trazer benefícios na prática oncológica, mas também ser uma proveitosa formulação de produtos naturais para quimioterapia oral. Além disso, nosso grupo também demonstrou previamente que a fração ATF retarda o crescimento do tumor subcutâneo de Ehrlich quando administrada subcutaneamente (BELIK, 2003).

Além de sua atividade antitumoral, estudos têm demonstrado que polissacarídeos de cogumelos têm propriedades antimicrobianas (SAKAGAMI et al., 1991), antiviral (SORIMACHI et al., 1990),

hepatoprotetor (OOI, 1996), antifibrótico (PARK et al., 1997), antiinflamatório (CZARNECKI & GRZYBEK, 1995), andidiabético (hipoglicêmico) (HIKINO & MIZUNO, 1989) e hipocolesterolêmico (CHEUNG, 1996).

Considerando que compostos presentes no basidiocarpo de *A. blazei* são capazes de estimular mecanismos específicos e não-específicos da resposta imune, o presente trabalho foi desenvolvido para testar a hipótese de que a ATF é capaz de favorecer a imunidade antiinfeciosa através da estimulação da atividade candidacida de macrófagos peritoneais murinos.

Objetivos

OBJETIVOS

Avaliar a atividade candidacida e o estado de ativação de macrófagos peritoneais de camundongos tratados com peptidoglucanas extraídas do cogumelo *Agaricus blazei* (fração ATF), observando-se:

- a-) atividade candidacida *in vitro* de macrófagos;
- b-) produção espontânea de H_2O_2 ;
- c-) produção espontânea de NO;
- d-) expressão de receptores de manose.

Material e Métodos

MATERIAL E MÉTODOS

1- Animais

Camundongos BALB/c com 8 semanas de idade foram adquiridos do biotério do Departamento de Medicina Tropical e Diagnóstico por Imagem da UNESP - Botucatu e mantidos no biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UNESP - Botucatu, recebendo água e ração balanceada *ad libitum*. Todos os procedimentos de manutenção, manuseio e eutanásia dos animais foram realizados de acordo com as normas de conduta estabelecidas pelo COBEA (protocolo n° 039/04 – CEEA).

2- Preparação da fração ácido-tratada oxalato solúvel de *A. blazei* (ATF)

As amostras do cogumelo *A. blazei* seco e pulverizado, foram fornecidas pelo Prof. Dr. Augusto Ferreira da Eira, responsável pelo Módulo de Cogumelos do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas - UNESP - Botucatu.

Cerca de 800g do cogumelo *A. blazei*, foram cortados em pedaços pequenos e triturados em um moedor de lâminas, e o produto resultante foi submetido à extração, de acordo com protocolo desenvolvido por Fujimiya et al. (1998) e já adaptado às nossas condições de trabalho (BELIK, 2003), com 6,4 litros de etanol 80% em ponto de fervura por 15 horas (extração repetida três vezes). O resíduo insolúvel foi separado por centrifugação a 5000 xg por 10 minutos e extraído por três vezes com 5 litros de água destilada em ponto de fervura por 15 horas. O resíduo insolúvel foi novamente separado por centrifugação a 5000 xg por 10 minutos e extraído duas vezes em 5 litros de oxalato de amônio 5% em ponto de fervura por 10 horas (extração repetida

duas vezes). O extrato solúvel em oxalato de amônio foi filtrado, dialisado e liofilizado. O produto foi dialisado por cerca de 72 horas e a redução dos níveis de amônia foi acompanhada pelo teste com reativo de Nessler.

O material foi então tratado com HCl 1M por 24 horas à temperatura ambiente. O pH foi ajustado para 7,0 por adição de NaOH 1M e depois foi feita remoção do material particulado por centrifugação. O sobrenadante foi esterilizado por filtração (membrana Millipore 0,22µm) e liofilizado para utilização posterior (FUJIMIYA et al., 1998; EBINA & FUJIMIYA, 1998). Após o tratamento ácido, observou-se que cada ml do produto continha 27,64 mg de matéria seca da fração ATF. Para o tratamento dos animais a fração foi reconstituída com solução salina à concentração de 5mg/ml.

A análise feita pelo Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar constatou a presença de (1→6)-β-D-glucana e a determinação de proteínas totais indicou a ocorrência de 13,4% de proteínas, sendo o restante representado por açúcares (BELIK, 2003).

3- Grupos de estudo

ATF - animais normais, tratados intraperitonealmente com 0,5mg/0,1ml da fração ATF por 3 dias consecutivos (n = 6 animais).

Controle - animais normais, tratados intraperitonealmente com 0,1ml de solução salina 0,9% por 3 dias consecutivos (n = 6 animais).

4-Suspensão de *Candida albicans*

O isolado H-428/03 de *Candida albicans*, originalmente obtido de um paciente atendido no Hospital das Clínicas, FMB-UNESP, foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Maria Fátima Sugizaki do Departamento de Microbiologia e Imunologia, IBB-UNESP. Os fungos na forma leveduriforme

foram repicados em meio de cultura Sabouroud 4% glucose-Agar (Microbiology) e mantidos a 35°C por 24h. Após esse período, foram removidos mediante lavagem com PBS estéril, analisada a viabilidade através de microscopia de fase (99% de viabilidade) e ressuspensos a uma concentração de 2×10^6 leveduras/mL.

5- Obtenção de Macrófagos peritoneais

Quarenta e oito horas após o último tratamento, os animais eutanizados por deslocamento cervical e, os macrófagos peritoneais foram obtidos mediante a inoculação de 10 mL de PBS gelado da cavidade peritoneal. Após o inóculo, o abdômen foi massageado por 30 segundos, o líquido peritoneal coletado e transferido para tubos de plástico (Falcon). Este procedimento foi repetido por duas vezes para cada animal e os tubos centrifugados por 10 minutos a 200 xg. As células foram ressuspensas com meio de cultura (RPMI 1640 suplementado com 10% soro bovino fetal e 1% L-glutamina).

6- Recuperação de fungos viáveis

Macrófagos peritoneais obtidos conforme descrito no item 5, foram plaqueados em placa de cultura com 24-alvéolos a uma concentração final de 8×10^4 células/alvéolos e incubados por 2h a 37°C e 5% CO₂. As células não aderentes foram removidas e a monocamada de células aderentes desafiadas com 2×10^6 leveduras (proporção MØ:leveduras – 1:25) por 30 minutos (culturas experimentais) a 37°C e 5% CO₂. Suspensões de leveduras diluídas em RPMI, na mesma concentração foram semeadas em alguns alvéolos na ausência de macrófagos (culturas controle). Após esse período, as células foram lisadas e lavados cada alvéolo com água destilada estéril (volume final

de 2mL). Essa suspensão foi diluída 1:300 com água destilada estéril e 100 µl de cada suspensão foram semeados em triplicata em placas contendo meio de cultura Sabouroud. A suspensão foi semeada, com o auxílio de bastões de vidro em forma de L, por toda a superfície do meio de cultura. A seguir, as placas de Petri foram incubadas em estufa a 35°C por 24h. A recuperação dos fungos viáveis foi detectada através da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) e calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ recuperação de fungos viáveis} = \frac{\text{média das UFC das culturas experimentais}}{\text{média das UFC das culturas controle}} \times 100$$

7- Ensaio de fagocitose

Macrófagos peritoneais obtidos conforme descrito no item 5, foram plaqueados a uma concentração de $1,5 \times 10^5$ células/câmara e incubados por 2h a 37°C e 5% CO₂. As células não aderentes foram removidas e a monocamada de células aderentes desafiadas com $7,5 \times 10^5$ leveduras (proporção MØ:leveduras-1:5) por 30 minutos. Após esse período, as lâminas foram lavadas, secas, coradas com May-Grunwald-Giemsa (MGG) e analisadas em microscópio.

8- Determinação da liberação espontânea de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

Seguindo o método descrito por Pick & Mizel (1981), macrófagos peritoneais obtidos conforme descrito no item 5 foram distribuídos em placa de cultura de 96 alvéolos (Corning) (2×10^5 células/alvéolo). Após 2 h a 37°C e 5% CO₂, células não aderidas foram removidas e a monocamada de macrófagos reincubada a 37°C por 24h. Após esse período, o sobrenadante da

cultura de macrófagos foi coletado e reservado para dosagem de NO. Às células aderentes foram adicionados 100µl de solução de vermelho fenol contendo 140mM NaCl, 10mM K₂HPO₄, 5,5 mM dextrose e 5,5 mM de peroxidase de raiz forte para determinação de H₂O₂.

Uma hora após, a reação foi interrompida com 10 µl de NaOH 1M e a absorbância foi determinada em microleitor de ELISA, com filtro de 620nm, contra um branco constituído de solução de vermelho fenol. Os resultados foram expressos em nmoles de H₂O₂ por 2x10⁵ células, comparando-se a D.O. com uma curva padrão em concentrações conhecidas de H₂O₂.

9- Determinação da liberação espontânea de Óxido Nítrico (NO)

Com o sobrenadante das culturas de macrófagos previamente reservado (item 8), foi feita dosagem da produção de NO pelo método colorimétrico baseado na reação de Griess (GREEN, 1981). Aos sobrenadantes, foram adicionados 100µl do reagente de Griess, que contém NEED 0,1% (naphthyl-ethyl-enediamine) diluído em água destilada, e sulfanilamida 1% diluída em H₃PO₄ 5%, os quais foram misturados em volumes iguais no momento da reação. As amostras foram lidas em microleitor de ELISA em comprimento de onda de 540nm contra um branco constituído por reagentes de Griess. Os resultados foram expressos em µmoles de NO por 2x10⁵ células, comparando-se a D.O. com uma curva padrão em concentrações conhecidas de NO.

10- Análise da expressão de receptor de manose

Macrófagos peritoneais obtidos conforme descrito no item 5 foram distribuídos em lamínulas de vidro (4x10⁵ células) e incubados por 1h a 37°C e 5% CO₂. Como grupo controle positivo, foram utilizados macrófagos peritoneais de animais inoculados com 500µg de concanavalina A (ConA).

Após 1h de incubação, as células aderentes foram lavadas com meio de cultura completo, a monocamada fixada com formalina a 10% e incubadas com α -D-BSA manosilada conjugada com isotiocianato de fluoresceína (BSA-FITC) por 15 minutos. As lâminas foram montadas e analisadas em microscópio de fluorescência.

11- Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo teste t de Student não-pareado através do programa estatístico InStat, Graph-Pad, San Diego, USA, assumindo como verdadeira cada hipótese em que a probabilidade de erro foi menor que 5% ($p < 0,05$).

Resultados

RESULTADOS

1- Atividade candidacida e fagocitose

Na figura 1 estão expressos os resultados da porcentagem de recuperação de leveduras viáveis de *C. albicans* a partir da cultura de macrófagos peritoneais de camundongos tratados com PBS (controle) ou 0,5 mg/dia da fração ATF durante 3 dias consecutivos. A atividade fungicida foi avaliada após 30 minutos de co-cultivo dos macrófagos com as leveduras

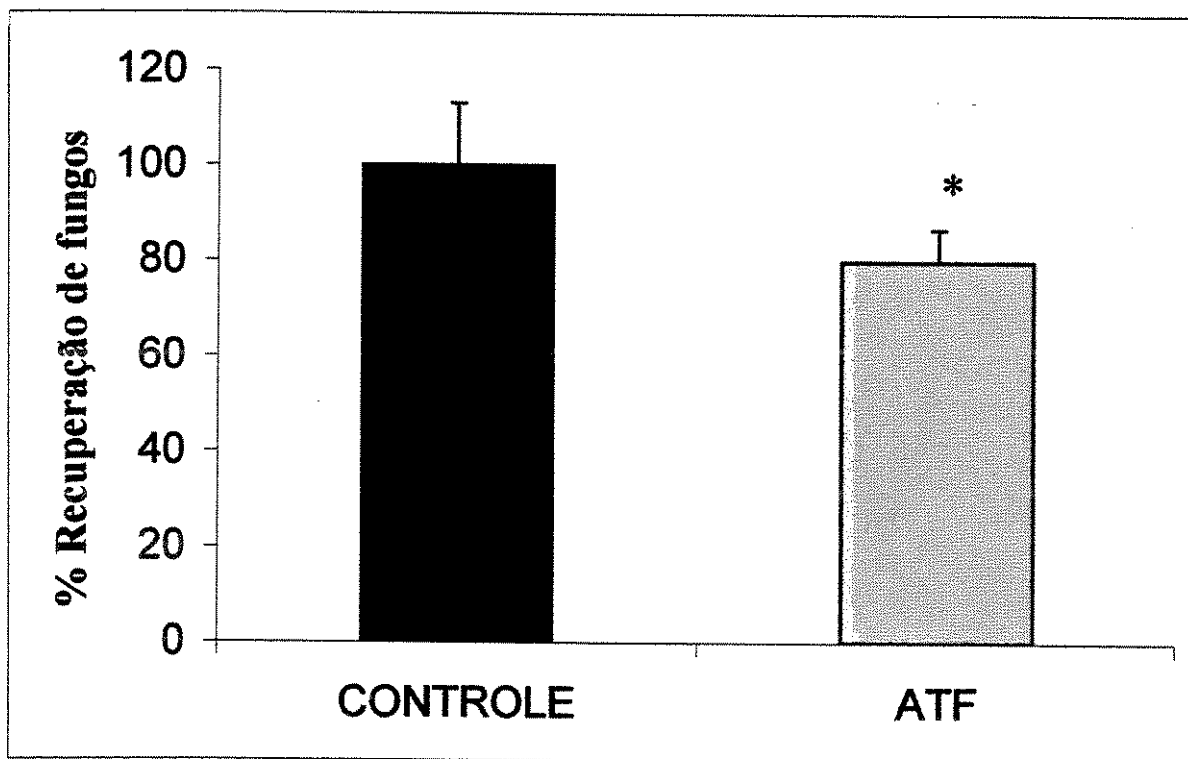


Figura 1 – Efeito da inoculação da fração ATF sobre a atividade candidacida de macrófagos peritoneais contra *C. albicans*. Resultados representados pela média $\pm$ SD. (* $t=3,276$ com 10 graus de liberdade, $p=0,0083$).

Os resultados demonstram uma significativa diminuição na porcentagem de recuperação de fungos nas culturas de macrófagos tratados com ATF ($80 \pm 6,8$) quando comparados com as co-culturas controle (100 ± 13), sugerindo que macrófagos peritoneais de camundongos tratados com 0,5 mg/dia com a fração ATF durante 3 dias consecutivos exercem atividade candidacida.

As figuras 2A e 2B mostram, respectivamente, o efeito da inoculação da fração ATF sobre a atividade de macrófagos peritoneais de camundongos tratados com PBS e macrófagos tratados com ATF. Observa-se na figura 2B, que macrófagos tratados com ATF apresentam maior quantidade de vacúolos digestivos, indicando grande quantidade de partículas fagocitadas.

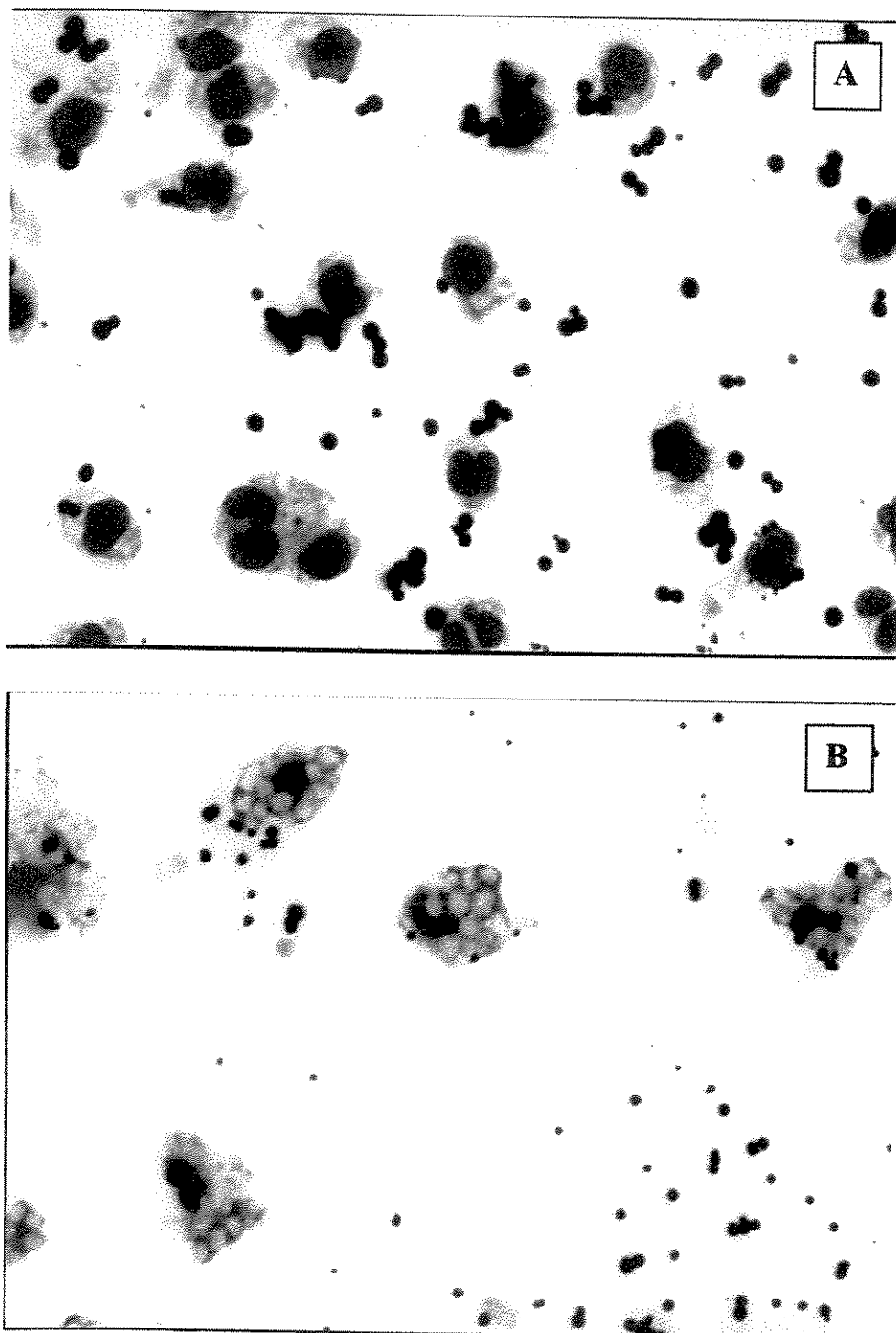


Figura 2 – Efeito da inoculação da fração ATF sobre a atividade fagocítica de macrófagos peritoneais de camundongos tratados com PBS (A), e ATF (B). Coloração MGG (400x).

2- Liberação espontânea de H_2O_2 e NO

A análise do efeito da inoculação da fração ATF sobre a produção espontânea de H_2O_2 por macrófagos peritoneais murinos está representada na figura 3.

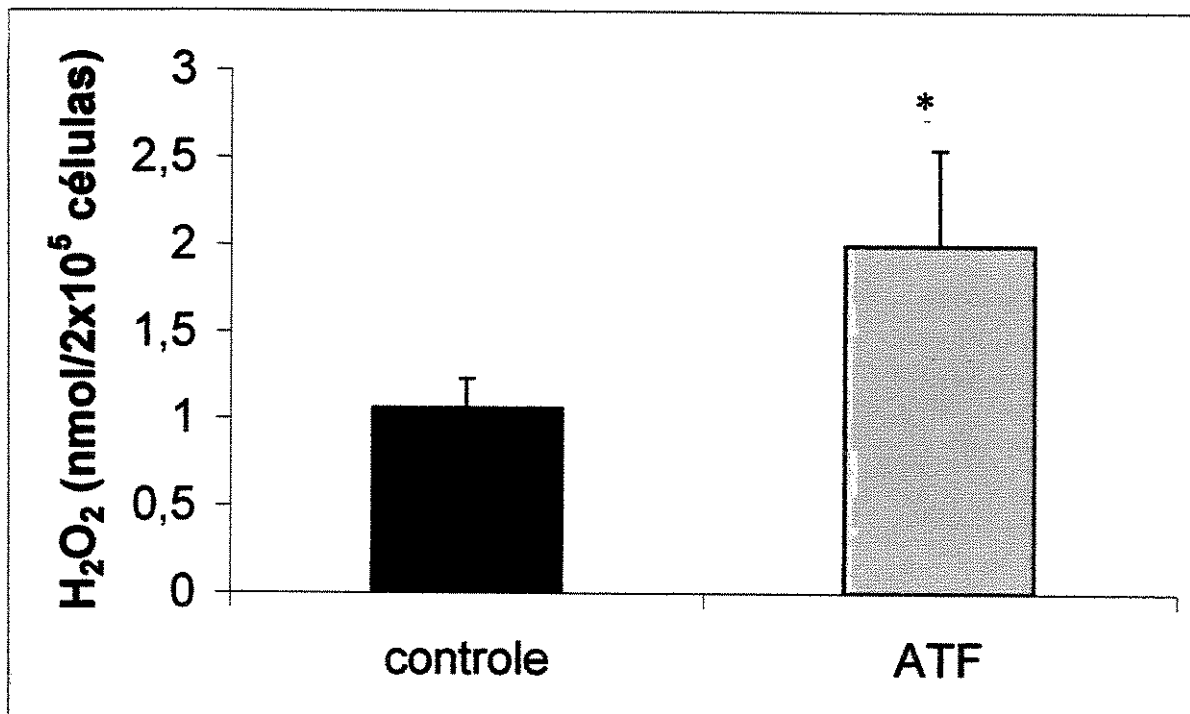


Figura 3 – Efeito da inoculação da fração ATF sobre a produção espontânea de H_2O_2 por macrófagos peritoneais. Resultados representados pela média $\pm$ SD. (* $t=4,025$ com 10 graus de liberdade, $p=0,0024$).

Como pode ser observado, o tratamento com essa fração é capaz de aumentar significativamente a produção espontânea de H_2O_2 por macrófagos peritoneais (2,0nmols $\pm$ 0,54) quando comparado ao controle (1,0nmol $\pm$ 0,16).

A figura 4 mostra o efeito da fração ATF sobre a produção espontânea de NO por macrófagos peritoneais.

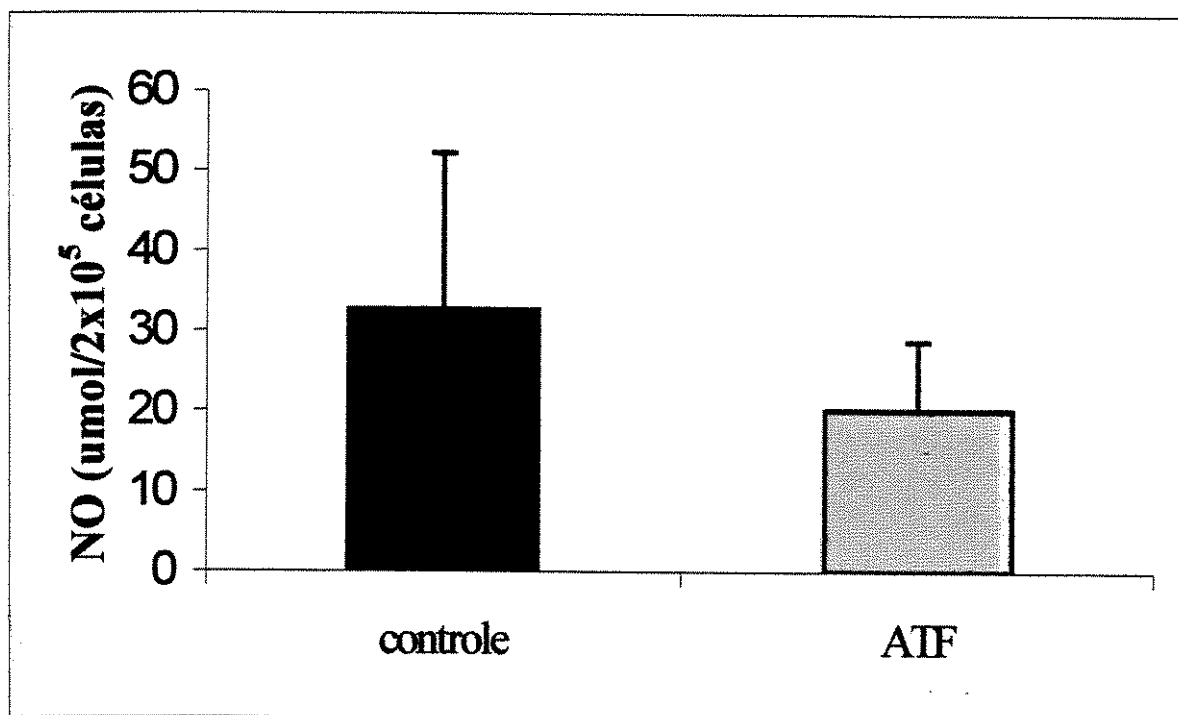


Figura 4 - Efeito da inoculação da fração ATF sobre a produção espontânea de NO por macrófagos peritoneais. Resultados representados pela média $\pm$ SD. ($t=1,543$ com 12 graus de liberdade, $p=0,1489$).

Como pode ser observado, não há diferença estatisticamente significante entre os dois grupos experimentais (controle: $32,67 \pm 19,68$; ATF: $20,13 \pm 8,68$), indicando que o tratamento não é capaz de alterar a produção de NO por macrófagos peritoneais.

3- Expressão de receptores de manose

A figura 5 mostra a expressão de MR por macrófagos peritoneais obtidos de camundongos tratados com PBS (5A), 500 μ g de Con-A (5B) e ATF (5C).

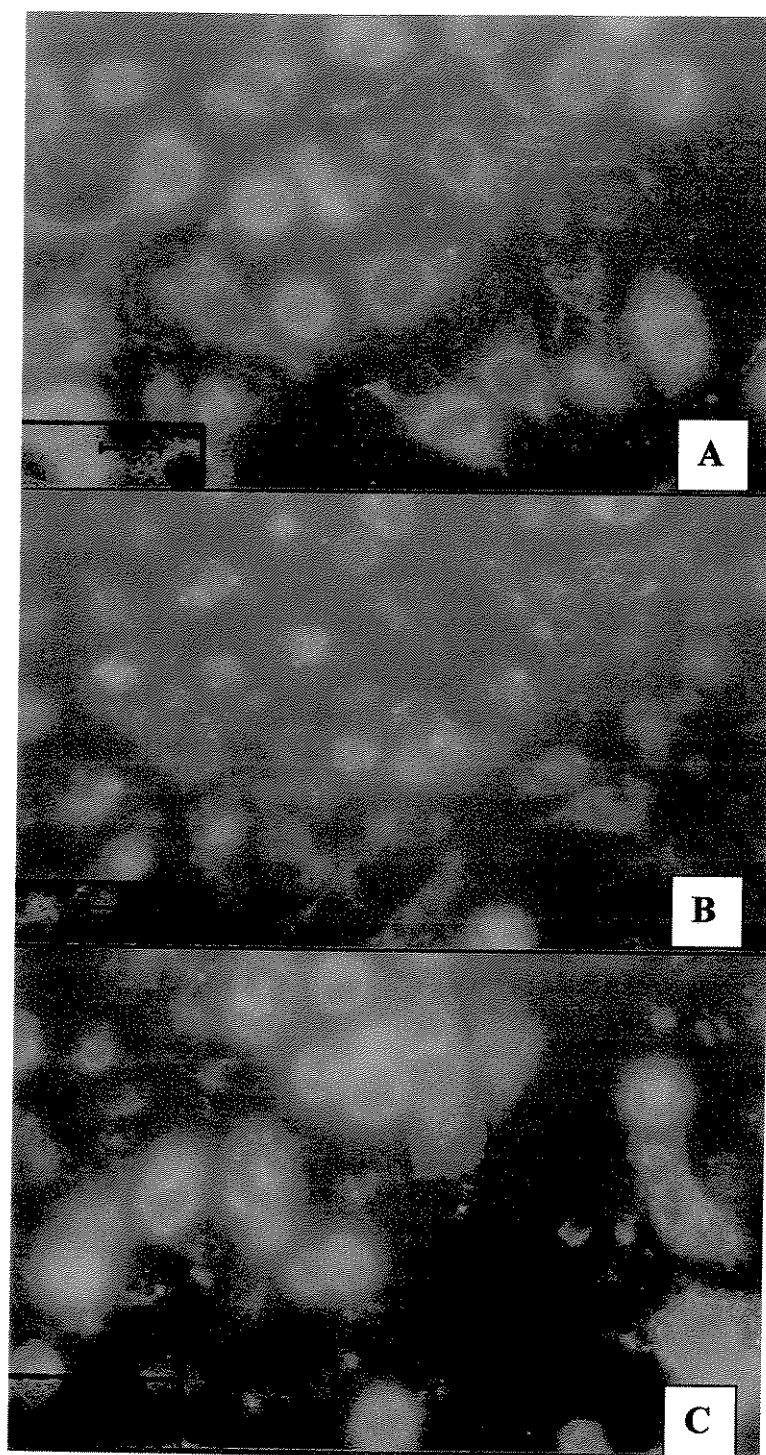


Figura 5 – Expressão de receptor de manose por macrófagos peritoneais obtidos de camundongos tratados com PBS (A), 500 μ g de ConA (B) e ATF (C). 400x.

A figura 5A mostra que somente um pequeno número de fagócitos internalizaram o glicoconjugado manose-FITC-BSA, enquanto que na figura 5B mostra que quase todos os fagócitos exibiram grânulos de glicoconjugado internalizado. A análise da figura 5C mostra que o tratamento com ATF aumenta essa expressão mesmo quando comparado com macrófagos tratados com Con-A (controle positivo).

Discussão

DISCUSSÃO

A atividade antitumoral de *A. blazei* tem sido demonstrada por vários estudos experimentais e atribuída a β -glucanas (MIZUNO et al., 1990a; MIZUNO et al., 1990b; FUJIMIYA et al., 1998; SORIMACHI et al., 2001), contudo, não há relatos sobre seu efeito em doenças infecciosas. O presente estudo revelou que a inoculação i.p. de três doses de ATF a 0,5mg/animal/dia durante três dias consecutivos foi capaz de aumentar a habilidade de macrófagos peritoneais murinos em matar *C. albicans*, como indicado pela menor porcentagem de fungos viáveis recuperados no ensaio de atividade fungicida (figura 1).

A extração da fração ATF utilizada no presente trabalho foi padronizada anteriormente por nosso grupo (BELIK, 2003) com base na metodologia descrita por Fujimiya et al. (1998). A análise por ressonância magnética nuclear (RNM) demonstrou que a fração apresenta um perfil espectrofotométrico similar ao apresentado por Kawagishi et al. (1989, 1990) com a concentração protéica (13,4%) próxima da descrita por Ebina et al. (1998), que trabalharam com a ATF composta de 16,6% de proteína e 76,7% de carboidratos. A análise por RNM de proteoglicanas oxalato-solúveis submetidas ao tratamento ácido, isoladas de basideocarpos de *A. blazei* (fração ATF) realizada por Fujimiya et al. (1998) mostra que a atividade tumoricida pode estar presente principalmente nas frações de alto peso molecular cujo componente principal é a (1 $\rightarrow$ 4)- α -D-glucana com ramificações de (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucana na proporção de 1:2. Como previamente relatado por Belik (2003), a espectroscopia de correlação heteronuclear (HMQC) da fração utilizada indica sua estrutura de (1 $\rightarrow$ 6)- β -glucana.

Fujimiya et al. (1998), demonstraram que a fração ATF inibe o desenvolvimento do fibrossarcoma Meth-A em sistema de simples e duplo enxerto tumoral, observando que a dose de 0,5mg da ATF foi eficiente em inibir o desenvolvimento tumoral. Essa dose foi utilizada anteriormente por nosso grupo (BELIK, 2003) no modelo de desenvolvimento subcutâneo do tumor de Ehrlich; dose que também apresentou os melhores resultados na etapa de padronização dos ensaios do presente estudo.

O menor índice de recuperação de fungos viáveis parece estar associado ao aumento de fagocitose de *C. albicans* (figura 2) e à maior concentração de H_2O_2 produzida espontaneamente pelos macrófagos em cultura (figura 3), sugerindo que a geração de metabólitos reativos de oxigênio (ROIs) pode ser responsável pela maior atividade fungicida dessas células.

O processo de fagocitose também é essencial para a destruição do patógeno, visto que durante o processo, os macrófagos aumentam a produção de ROIs, incluindo O_2^- , OH^- e H_2O_2 (NATHAN & ROOT, 1977; JOHNSTON JR et al., 1978) que exercem ação tóxica sobre os microrganismos (SASADA & JOHNSTON JR, 1980).

De fato, os fagócitos ativados produzem ROIs e NO que são altamente tóxicos aos microrganismos (GOLDSBY et al., 2000). Os fungos, ao se ligarem aos polimorfonucleares também levam à produção de oxidantes citotóxicos como H_2O_2 e O_2^- que exercem atividade fungicida (CALDERONE et al., 1994). Esse resultado é corroborado pelos achados de Steenhagem & Furth (1993) que demonstraram que o aumento na produção de H_2O_2 por granulócitos humanos estimulados com várias concentrações de rIFN- γ levaram a um aumento da atividade candidacida.

Suzuki et al. (1990) demonstraram que a fração β -1,3-glucana obtida do filtrado da cultura do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (SSG), quando

administrada oralmente, aumenta a atividade candidacida de macrófagos peritoneais murinos devido ao aumento de fagocitose, liberação de H_2O_2 e IL-1. Sakurai et al. (1991) demonstraram que essa mesma fração quando administrada intraperitonealmente também aumenta a quantidade de IL-1, aumentando a produção de fatores estimuladores de colônias (CSF) que, por sua vez, promove a proliferação de macrófagos alveolares e o aumento da atividade candidacida, sugerindo que esse polissacarídeo pode ser efetivo na terapia contra infecções microbianas.

Ding et al. (1988) estudaram a produção de NO por macrófagos peritoneais estimulados *in vitro* com 12 citocinas (IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , M-CSF, GM-CSF, TGF- β , TNF- α , TNF- β) e observaram que somente o IFN- γ era capaz de induzir a produção de NO. Por outro lado, Macmicking et al. (1995) observaram que além do IFN- γ , outras citocinas (IL-1, IL-6, TNF- α) também foram capazes de aumentar a iNOS enquanto que a IL-4, IL-8, IL-10, IL-13 e o TGF- β , promoveram sua inibição. Do mesmo modo, Ohno et al. (1996) demonstraram que a administração de (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucana, uma glucana solúvel extraída da *Grifola frondosa* (GRN), aumentou a produção de NO por macrófagos peritoneais murinos. Esses mesmos autores encontraram expressão do mRNA IFN- γ no fígado e em células peritoneais de camundongos tratados com GRN e sugeriram que β -glucanas têm a capacidade de aumentar a síntese de NO por macrófagos peritoneais, mediada pelo IFN- γ . Em nosso estudo, entretanto, o aumento da atividade candidacida parece não envolver a produção espontânea de NO uma vez que não encontramos diferenças significativas entre o grupo tratado com ATF e o grupo controle (figura 4), sugerindo que o tratamento não envolveu a síntese de IFN- γ .

A facilitação da fagocitose pode ser consequência do aumento na expressão de MR, que é um tipo de receptor caracterizado como receptor de padrões de reconhecimento (PRR). Sua expressão está associada à fagocitose de microrganismos, habilitando os macrófagos à ingestão de certas partículas não opsonizadas como *C. albicans* (ASTERIE-DEQUEKER et al., 1998), *Escherichia coli* (OFEK et al., 1995) e *Mycobacterium tuberculosis* (SHEPHERD & HOIDAL, 1990).

Na realidade, observamos que o aumento da expressão induzida pela ATF foi mais intenso que o próprio controle positivo (figura 5). Glicoproteínas manosiladas são reconhecidas por esses receptores os quais promovem endocitose pelos macrófagos e células dendríticas, aumentando a apresentação do peptídeo junto às moléculas do MHC de classe II (SALUSTO et al., 1995). A ligação do microrganismo ao MR causa sinalização intracelular associada com várias mudanças funcionais no macrófago, incluindo a liberação de ânion superóxido (BERTON & GORDON, 1983) e síntese de citocinas como IL-1, IL-6 e GM-CSF (YAMAMOTO et al., 1997). Assim, acreditamos que o aumento da produção de H₂O₂ encontrado em nossos experimentos também esteja associado às mudanças na expressão de MR pelos macrófagos de animais tratados com ATF. A ação do MR também parece facilitar a integração de peptídeos junto às moléculas do MHC (SALUSTO et al., 1995; YAMAMOTO et al., 1997), indicando que esta estrutura pode exercer um importante papel no desenvolvimento da resposta imune específica.

Embora os MR contribuam para a fagocitose de microrganismos, sua expressão indica um estado de não-ativação dos macrófagos, desaparecendo sob a ação do IFN- γ . Assim, o IFN- γ induz diminuição da expressão dos MR pelos fagócitos ativados como resultado da redução da transcrição de seus

mRNA (HARRIS et al., 1992). Marodi et al. (1993) observaram que macrófagos tratados com IFN- γ exibiram uma alta capacidade de matar *C. albicans* associado a uma diminuição da expressão de MR. Contudo, eles demonstraram que os MR que permaneceram acessíveis após o tratamento com essa citocina foram capazes de aumentar significativamente a fagocitose dependente de MR.

Coerente com esses relatos, no presente estudo, observamos que macrófagos de animais tratados com ATF tiveram a expressão de MR aumentada, sugerindo que essas células não foram ativadas por IFN- γ , fato compatível com a ausência de efeito sobre a produção de NO.

É possível pensar que o aumento da expressão de MR e da atividade candidacida sejam devidos à estimulação de populações de linfócitos Th2. De fato, Longoni et al. (1998) observaram que a IL-10 aumenta a expressão de MR em células dendríticas derivadas de monócitos humanos quando medido pela ligação a FICT-dextran. Além disso, Stein et al. (1992) demonstraram que a IL-4, protótipo de citocina Th2, também aumenta a expressão de receptor de superfície e endocitose mediado pelo MR. Essa idéia é sustentada por observações anteriores realizadas por nosso grupo (BELIK, 2003) de que a inoculação subcutânea de ATF não foi capaz de induzir a produção *in vitro* de IFN- γ ou TNF- α , mas aumentou a produção de IL-10.

Assim, nossos resultados sugerem que a fração ATF pode aumentar a resposta imune contra agentes infecciosos devido à estimulação da atividade microbicida de macrófagos. Considerando que o aumento da produção de H₂O₂ não foi acompanhado do aumento da produção de NO, nossos dados sugerem, ainda, que o aumento de H₂O₂ pode, por si só, ser eficiente em promover essa atividade.

Conclusão

CONCLUSÃO

- Macrófagos peritoneais murinos ativados por peptidoglucanas oxalato solúvel ácido-tratada de *A.blazei* (fração ATF) exercem maior atividade candidacida.
- Esse aumento da atividade candidacida parece estar relacionado com o aumento da produção de H_2O_2 , fagocitose e expressão de receptores de manose.
- O aumento da atividade candidacida não parece envolver a produção de NO.

Referências

REFERÊNCIAS *

ASTERIE-DEQUEKER, C.; N'DIAYE, E.N.; LECEBEC, V. et al. Mycobacteria are internalized into human macrophages through the mannose receptor and bypass the respiratory burst. **Eur. J. Haematol.**, Copenhagen, v.60, p.330-331, 1998.

BELIK, A.V.F. **Ação da fração polissacarídica de *Agaricus blazei* sobre o desenvolvimento tumoral, a atividade linfoproliferativa e a produção de citocinas por esplenócitos de camundongos com tumor subcutâneo de Ehrlich.** 2003. 64p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

BERTON, G.; GORDON, S. Modulation of macrophage mannosyl-specific receptors by cultivation on immobilized zymosan. Effects on superoxide-anion release and phagocytosis. **Immunology**, Oxford, v.49, p.705-715, 1983.

CALDERONE, R.; DIAMOND, R., SENET, J.M. et al. Host cell-fungal cell interations. **J.Med.Vet.Mycol.**, Abingdon, v.32, p.151-164, 1994.

CALVI, S.A.; PERAÇOLI, M.T.S.; MENDES, R.P. et al. Effect of cytokines on the *in vitro* fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. **Microbes Infect.**, Paris, v.5, p.107-113, 2003.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

CHANG R. Functional properties of edible mushrooms. **Nutr. Rev.**, Washington, v.54, p.S91-S93, 1996.

CHEUNG, P.C.K. The hypocholesterolemic effect of extracellular polysaccharide from the submerged fermentation of mushroom. **Nutr. Res.**, Tarrytown, v.16, p.1953-1957, 1996.

COHEN, M.S.; ISTURIZ, R.E.; MALECH, H.L. et al. Fungal infection in chronic granulomatous disease - The importance of the phagocyte in defense against fungi. **Am. J. Med.**, New York, v.71, p.59-65, 1981.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins Pathologic basis of diseases. 6.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000.1251p.

CZARNECKI, R.; GRZYBEK, J. Antiinflammatory and vasoprotective activities of polysaccharides isolated from fruiting bodies of higher fungi P.I. polysaccharides from *Trametes gibbosa* (Pers.:Fr.) Fr. (Polyporaceae). **Phytother. Res.**, West Sussex, v.9, p.123-127, 1995.

DING, A.H.; NATHAN, C.; STUEHR, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J. Immunol.**, Weinheim, v.141, p.2407-2412, 1988.

DONDERS, G.G. Lower genital tract infections in diabetic women. **Curr. Infect. Dis. Rep.**, Philadelphia, v.4, p.536-539, 2002.

EBINA, T.; FUJIMIYA, Y. Antitumor effect of a peptide-glucan preparation extracted from *Agaricus blazei* in a double-grafted tumor system in mice. **Biotherapy**, Tokyo, v.11, p.259-256, 1998.

EIRA, A.F.; PINTO, A.V.F.S.; FONTANARI, L.M. et al. Efeitos da temperatura de preparação sobre a ação antitumoral de extratos de cogumelos comestíveis. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 52., 2000, Brasília. **Anais . . .** Brasília: UnB, 2000.

EDMAN, J.C. Micologia Médica. In: JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. **Microbiologia médica**. 20.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan S.A., 1998. p.420-443.

EZEKOWITZ, R.A.B.; SASTRY, K.; BAILLY, P. et al. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-I cells. **J. Exp. Med.**, Calcutta, v.172, p.1785-1794, 1990.

EZEKOWITZ, R.A.B.; WILLIAMS, D.; KOZIEL, H. et al. Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. **Nature**, London, v.351, p.155-158, 1991.

FECCHIO, D. **Inflamação e tumor de Ehrlich: efeitos da modulação da resposta inflamatória sobre o crescimento tumoral**. 1989. 106p. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FIETE, D.; BERANEK, M.C.; BAENZIGER, J.U. A cysteine-rich domain of the "mannose"receptor mediates GalNAc-4-SO₄ binding. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.95, p.2089-2093, 1998.

FUJIMIYA, Y.; SUZUKI, Y.; OSHIMAN, K. 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.**, Heidelberg, v.46, p.147-159, 1998.

FUJIMIYA, Y.; SUZUKI, Y.; KATAKURA, R. et al. Tumor-specific cytotoxic and immunopotentiating effects of relatively low molecular weight products derived from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill. **Anticancer Res.**, Kato Patissia, v.19, p.113-118, 1999.

GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B.A. **Immunology**. 4.ed. New York, Freeman, 2000. 670p.

GORCZYNSKI, R. & STANLEY, J. **Imunologia médica**. 1.ed. Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso, 2001. 355p.

GREEN, L.C. Nitrite biosynthesis in man. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v.18, p.7764-7768, 1981.

HAN, S.B.; LEE, C.W.; JEON, Y.J. et al. The inhibitory of polysaccharide isolated from *Phelinus linteus* on tumor factor growth and metastasis. **Immunopharmacology**, New York, v.41, p.157-164, 1999.

HARRIS, N.; SUPER, M.; RITS, M. et al. Characterization of murine macrophage mannose receptor: demonstration that the downregulation of receptor expression mediated by interferon- γ occurs at the level of transcription. **Blood**, New York, v.80, p.2363-2373, 1992.

HASHIMOTO, T.; OHNO, N.; ADACHI, Y. et al. Nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages by fungal β -glucans. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v.20, p.1006-1009, 1997.

HIKINO, H.; MIZUNO, T. Hypoglycemic actions of some heteroglycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. **Planta Med.**, Stuttgart, v.55, p.385, 1989.

ITO, H.; SHIMURA, K.; ITOH, 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.**, Kato Patissia, v.17, p.277-284, 1997.

JOHNSTON JR, R.B.; GODZIK, C.A.; COHN, Z.A. Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. **J. Exp. Med.**, Calcutta, v.148, p.115-127, 1978.

KANENO, R.; FONTANARI, L.M.; SANTOS, S.A. et al. Effect of extracts from Brazilian sun-mushroom (*Agaricus blazei*) on the NK activity and lymphoproliferative responsiveness of Ehrlich tumor-bearing mice. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.42, p.909-916, 2004.

KAWAGISHI, H.; INAGAKI, R.; KANAO, T. et al Fractionation and antitumor activity of the water-soluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v.186, p.267-273, 1989.

KAWAGISHI, H.; KANAO, T.; INAGAKI, R. et al Formolysis of a potent antitumor (1→6) - β -D-glucan-protein complex from *Agaricus blazei* fruiting bodies and antitumor activity of the resulting products. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v.12, p.393-403, 1990.

KIM, H.M.; HAN, S.B.; OH, G.T. et al. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. **Int. J. Immunopharmacol.**, Oxford, v.18, p. 295-303, 1996.

KLEIN, R.S.; HARRIS, C.A.; SMALL, C.B. et al. Oral candidiasis in high-risk patients as the initial manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome. **N. Engl. J. Med.**, Waltham, v.311, p.354-358, 1984.

LEUNG, M.Y.K.; FUNG, K.P., CHOY, Y.M. The isolation and characterization of an immunomodulatory and anti-tumor polysaccharide preparation from *Flammulina velutipes*. **Immunopharmacology**, New York, v.35, p.255-263, 1997.

LIU, M.; KONG, F.; GAO, Y., et al. Induction of immunomodulating cytokine by a new polysaccharide-peptide complex from culture mycelia of *Lentinus edodes*. **Immunopharmacology**, New York, v.40, p.187-198, 1998.

LIU, F.; OOI, V.C.E., FUNG, M.C. Analysis of immunomodulating cytokine mRNAs in the mouse induced by mushroom polysaccharides. **Life Sci.**, Elmsford, v.64, p.1005-1011, 1999.

LONGONI, D.; PIEMONTI, L.; BERNASCONI, S. et al. Interleukin-10 increases mannose receptor expression and endocytic activity in monocyte-derived dendritic cells. **Int. J. Clin. Lab. Res.**, Heidelberg, v.28, p.162-169, 1998.

LOS, M.; SCHENK, H.; HEXEL, K. et al. IL-12 gene expression and NF- κ B activation through CD28 requires reactive oxygen production by 5-lipoxygenase. **Embo. J.**, Oxon, v.14, p.3731-3740, 1995.

LOYOLA, W.; GAZIRI, D.A.; GAZIRI, L.C. et al. Concanavalin A enhances phagocytosis and killing of *Candida albicans* by mice peritoneal neutrophils and macrophages. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, Amsterdam, v.33, p.201-208, 2002.

MACMICKING, J.D.; NATHAN, C.; HOM, G. et al. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Cell**, Cambridge, v.81, p.641-650, 1995.

MARODI, L.; SCHREIBER, S.; ANDERSON, D. et al. Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon-gamma: increased phagocytosis, killing and calcium signal mediated by a decreased number of mannose receptors. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 91, p.2596-2601, 1993.

MARTINS, J.E.C. Etiopatogenia e aspectos clínicos das candidíases superficiais, cutâneas e cutânea-mucosas. In: LACAZ, C.S. (Ed). **Candidíases**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1980. p.79-88.

MIZUNO, M.; MORIMOTO, M.; MINATO, K. et al., Polysaccharide from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, Tokyo, v.62, p.434-37, 1998.

MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T. Antitumor activity and some properties of water-soluble polyssacarides from Himematsutake, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murril. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v.54, p.2889-2896, 1990a.

MIZUNO, T; TINAGARI, R.; KANAO, T. Antitumor activity and some properties of water-soluble polyssacarides from Himematsutake, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murril. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v.54, p. 2897-2905, 1990b.

MOILANEN, E.; WHITTLE, B.; MONCADA, S. Nitric oxide as a factor in inflammation. In: GALLIN, J.I.; SNYDERMAN, R. (3 ed.). **Inflammation: basic principles and Clinical correlates**. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, 1999. p.787-800.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine nitric oxide pathway. **N. Engl. J. Med.**, Waltham, v.329, p.2002-2012, 1993.

MOON, E.Y.; RHEE, D.K.; PYO, S. Involvement of NO, H₂O₂ and TNF- α in the reduced antitumor activity of murine peritoneal macrophages by aflotoxin B1. **Cancer Lett.**, Amsterdam, v.136, p.167-176, 1999.

MULLIN, N.P.; HALL, K.T.; TAYLOR, M.E. Characterization of ligand binding to a carbohydrate-recognition domain of the macrophage mannose receptor. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.269, p.28405-28413, 1994.

MULLIN, N.P.; HITCHEN, P.G.; TAYLOR, M.E. Mechanism of Ca²⁺ and monosaccharide binding to a C-type carbohydrate-recognition domain of the macrophage mannose receptor. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.272, p.5668-5681, 1997.

NAKAJIMA, A.; ISHIDA, T.; KOGA, M. et al. Effect of hot water extracted from *Agaricus blazei* murrill on antibody-producing cells in mice. **Int. Immunopharmacol.**, New York, v.2, p.1205-1211, 2002.

NATHAN, C.F.; ROOT, R.K. Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophages dependence on sequential activation and triggering. **J. Exp. Med.**, Calcutta, v. 146, p.1648-1662, 1977.

NORRIS, K.A.; SCHRIMPF, J.E.; FLYNN, J.L. et al. Enhancement of macrophage microbicidal activity: supplemental arginine and citrulline augment nitric oxide production in murine peritoneal macrophages and promote intracellular killing of *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.**, Washington, v.63, p.2793-2796, 1995.

OFEK, I.; GOLDHAR, J.; KEISARI, Y. et al. Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v.49, p.239-276, 1995.

OHNO, N.; EGAWA, Y.; HASHIMOTO, T. et al. Effect of β -glucans on the nitric oxide synthesis by peritoneal macrophage in mice. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v.19, p.608-612, 1996.

OOI, V.E.C. Hepatoprotective effect of some edible mushrooms. **Phytother. Res.**, West Sussex, v.10, p.536-538, 1996.

OSHIMAN, K.; FUJIMIYA, Y. EBINA, T. Orally administered β -1,6-d-Polyglucose extracted from *Agaricus blazei* results in tumor regression in tumor-bearing mice. **Planta Med.**, Stuttgart, v.68, p.610-614, 2002.

PARK, E.J.; KO, G.; KIM, J. et al. Antifibrotic effects of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*, glycyrrhizin, and pentoxifyline in rats with cirrhosis induced in biliary obstruction. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v.20, p.417-420, 1997.

PICK, E.; KEISARE, Y. A simple colorimetric method for measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v.38, p.161-172, 1980.

PICK, A.; MIZEL, A. A rapid microassay of the measurements of superoxid and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using automatic enzyme immunoassay reader. **J. Immunol.**, Weinheim, v.46, p.2111-2126, 1981.

RIDOLA, V.; CHACHATY, E.; RAIMONDO, G. et al. Candida infections in children treated with conventional chemotherapy for solid tumors (transplant recipients excluded): The Institut Gustave Roussy Pediatrics Department experience. **Pediatr. Blood Cancer**, Hoboken, v.42, p.332-337, 2004.

SAKAGAMI, H.; AOKI, T.; SIMPSON, A. et al. Induction of immunopotential activity by a protein-bound polysaccharide, PSK (Review). **Anticancer Res.**, Kato Patissia, v. 11, p.993-1000, 1991.

SAKURAI, T.; SUZUKI, I.; KINOSHITA, A. et al. Effect of intraperitoneally administered β -1,3-glucan, SSG, obtained from *Sclerotinia sclerotiorum* IFO 9395 on the functions of murine alveolar macrophages. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokyo, v.39, p.214-217, 1991.

SALLUSTO, F.; CELLA, M.; DANIELI, C. et al. Dendritic cells use macropinocytosis and the receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. **J. Exp. Med.**, Calcutta, v.182, p.389-400, 1995.

SALVATORE, C.A. Candidíase vulvovaginal. In: LACAZ, C.S. (Ed). **Candidíases**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1980. p.113-120.

SANTOS, S. A. Efeito de extratos de *Agaricus blazei* sobre a atividade de células natural killer (NK) e o estado funcional de macrófagos peritoniais de camundongos portadores do tumor de Ehrlich na forma subcutânea. 1998. Monografia - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SASADA, M.; JOHNSTON JR., R.B. Macrophage microbicidal activity. Correlation between phagocytosis-associated oxidative metabolism and the killing of candida by macrophages. **J. Exp. Med.**, Calcutta, v.152, p.85-98, 1980.

SCHLESINGER, P.H.; DOEBBER, T.W.; MANDELL, B.F. et al. Plasma clearance of glycoproteins with terminal mannose and N-acetylglucosamine by liver non-parenchymal cells. Studies with beta-glucuronidase, N-acetyl-beta-D-glucosaminidase, ribonuclease B and agalacto-orosomucoid. **Biochem. J.**, London, v.176, p.103-109, 1978.

SHEPHERD, V.L.; CAMPBELL, E.J.; SENIOR, R.M. et al. Characterization of the mannose/fucose receptor on human mononuclear phagocytes. **J. Reticuloendothel. Soc.**, New York, v.32, p.423-431, 1982.

SHEPHERD, V.L.; HOIDAL, J.R. Clearance of neutrophil-derived myeloperoxidase by the macrophage mannose receptor. **Am. J. Respr. Cell. Mol. Biol.**, New York, v.2, p.335-340, 1990.

SORIMACHI, K.; NIWA, A.; YAMAZAKI, S. et al. Anti-viral activity of water-solubilized lignin derivatives *in vitro*. **Agric. Biol. Chem.**, London, v.54, p.1337-1339, 1990.

SORIMACHI, K.; AKIMOTO, K.; IKEHARA, Y. et al. Secretion of TNF- α , Il-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei* Murill fractions *in vitro*. **Cell Struct. Funct.**, Okayama, v.26, p.103-108, 2001.

STAHL, P.; RODMAN, J.S.; MILLER, M.J. et al. Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates, and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v.75, p.1399-1403, 1978.

STAHL, P.; GORDON, S. Expression of a mannosyl-fucosyl receptor for endocytosis on cultured primary macrophages and their hybrids. **J. Cell. Biol.**, Stuttgart, v.93, p.49-56, 1982.

STAHL, P.; EZEKOWITZ, R. A. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. **Curr. Opin. Immunol.**, London, v.10, p.50-55, 1998.

STEIN, M.; KESHAV, S.; HARRIS, N. et al. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. **J. Exp. Med.**, Calcutta, v.176, p.287-292, 1992.

STEVENHAGEN, A.; FURTH, R. Interferon-gamma activates the oxidative killing of *Candida albicans* by human granulocytes. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v.91, p.170-175, 1993.

SUZUKI, I.; TANAKA, H.; KINOSHITA, A. et al. Effect of orally administered β -glucan on macrophage function in mice. **Int. J. Immunopharmacol.**, Oxford, v.12, p.675-684, 1990.

TAYLOR, M.E.; BEZOUSKA, K.; DRICKAMER, K. Contribution to ligand binding by multiple carbohydrate-recognition domains in the macrophage mannose receptor. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.267, p.1719-1726, 1992.

WANG, H.X.; NG, T.B.; OOI, V.E. et al. A polysaccharide-peptide complexes from cultured mycelia of the mushroom *Tricoloma mongolium* with immunoenhancing and antitumor activities. **Biochem. Cell Biol**, Ottawa, v.74, p.95-100, 1996a.

WANG, H.X.; NG, T.B.; OOI, V.E. et al. Polysaccharide-peptide complexes from the cultured mycelia of the mushroom *Coriolus versicolor* and their culture medium activate mouse lymphocyte and macrophages. **Int. J. Biochem. Cell Biol**, Oxford, v.28, p.601-607, 1996b.

WASSER, S.P.; DIDUKH, M.Y.; AMAZONAS, M.A.L.A. et al. Is a widely cultivated culinary-medicinal Royal Sun Agaricus (the Himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill? **Int. J. Med. mushrooms**, New York, v.4, p.267-290, 2002.

WEISS, S.J. Tissue destruction by neutrophils. **N. Engl. J. Med.**, Waltham, v.320, p.365, 1989.

YAMAMOTO, Y.; KLEIN, T.W.; FRIEDMAN, H. Involvement of mannose receptor in cytokine interleukin-1beta (IL-1beta), IL-6, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses, but not in chemokine macrophage inflammatory protein 1 beta (MIP-1beta), MIP-2, and KC

responses, caused by attachment of *Candida albicans* to macrophages. **Infect. Immun.**, Washington, v.65, p.1077-1082, 1997.

ABSTRACT

Immunomodulatory activity of medicinal mushrooms is attributed to β -glucans. In the present study we evaluated the effect of peptidoglycans of *Agaricus blazei* (ATF) on the candidacidal activity, the expression of mannose receptors (MR), production of H_2O_2 and NO by murine peritoneal macrophages. Normal BALB/c mice were i.p. treated with 3 inoculations of ATF (ATF group) or salt solution (control group) and after 48hr peritoneal macrophages were assayed against *Candida albicans* yeast forms. Our results indicated that the treatment enhanced the candidacidal activity of peritoneal macrophages and increased the H_2O_2 production and MR expression. However ATF was not able to increase the spontaneous production of NO. The results suggest that ATF can enhance the host resistance against infectious agents due to the stimulation of the microbicidal activity of macrophages.

Keywords: *Candida albicans*, macrophages, mushrooms.