



***Agaricus blazei* Murill no dano tecidual causado pelo tumor de Ehrlich**

Agaricus blazei Murill on tissue damage caused by Ehrlich tumor

Durval Verçosa Júnior¹ , Ana Flávia Machado Botelho^{*2} , Geovanni Dantas Cassali¹ , Marília Martins Melo¹ 

1 Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

2 Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás, Brazil

*Autor correspondente: anaflaviamabo@gmail.com

Resumo: *Agaricus blazei* Murill (ABM) é comercializado mundialmente como alimento medicinal com potencial anticancerígeno. O estudo investigou os efeitos de diferentes extratos de ABM em um modelo de camundongo com tumor de Ehrlich (TE). Diferentes extratos foram produzidos utilizando solução com pH 4 e 7, banho-maria ou banho ultrassônico, com solução de polissacarídeo ou sobrenadante. Camundongos Swiss (n=192) foram separados aleatoriamente em 4 grupos para avaliação dos 4 métodos de extração. Cada grupo de extração consistiu em 2 grupos com ou sem tumor, separados em 4 grupos de tratamento. As avaliações incluíram peso dos órgãos e histologia do baço, rim, gânglios linfáticos, fígado e tumor. Os animais com TE (sem tratamento) apresentaram aumento do peso relativo do baço, todavia, nos animais com TE e tratados com o sobrenadante de ABM a 60°C em pH 7, houve diminuição do peso do baço. O peso do fígado também reduziu em animais com TE, mas tratados com extrato ABM a 60°C em pH 4. Os achados histológicos do baço mostraram aumento no número de macrófagos e, em alguns casos, observou-se leve hipoplasia de polpa branca. Duas frações foram obtidas no extrato de ABM a 60°C em banho ultrassônico, a sobrenadante e a polissacarídica, e os animais com TE tratados com a fração de sobrenadante mostraram uma menor celularidade tumoral e uma menor distância entre a epiderme e a musculatura. Na epiderme das patas desses animais foram vistas áreas livres de células tumorais, menores áreas de necrose e infiltração celular, demonstrando menor crescimento tumoral. Os resultados sinalizam que o extrato de ABM a 60°C em pH 7 produzido através de banho ultrassônico tem o maior potencial terapêutico que deve ser mais explorado.

Palavras-chave: camundongo; polissacarídeos; câncer; cogumelos.

Abstract: *Agaricus blazei* Murill (ABM) is commercialized worldwide as a medicinal food with anticancer potential. The study investigated the effects of different ABM extracts on a mouse model of transplantable Ehrlich tumor. Different extracts were produced using a solution with pH 4 and 7, water bath or ultrasonic bath, with polysaccharide solution or supernatant. 192 mice were randomly separated into 4 groups for assessment of the 4 extraction methods. Each extraction group consisted of 2 groups with or without a tumor, further separated into 4 treatment groups. Evaluations included organ weight and histology of the spleen, kidney, lymph nodes, liver, and tumor. Ehrlich's tumor leads to an increase in the relative weight of the spleen, but the use of ABM supernatant at 60°C at pH 7 decreases the weight of the spleen. Liver weight was reduced with extract ABM at 60°C in pH 4. Histology findings

Recebido: 15 de dezembro, 2023. Aceito: 23 de fevereiro, 2024. Publicado: 08 de julho, 2024.

for the spleen showed an increase in the number of macrophages and, in some cases, mild white pulp hypoplasia. In animals treated with ABM supernatant solution (60°C and ultrasonic bath), when compared to animals treated with ABM polysaccharide solution (60°C and ultrasonic bath), less tumor cellularity, smaller distance between the epidermis and the musculature, can be observed. Free areas of tumor cells in the epidermis of the foot pads and smaller areas of necrosis and cellular infiltration were observed, demonstrating less tumor growth in these animals. The findings indicate that ABM extract at 60°C at pH 7 produced through an ultrasonic bath has the most therapeutic potential that should be further explored.

Keywords: mouse; polysaccharides; cancer; mushroom.

1. Introdução

Agaricus blazei Murill também conhecido como cogumelo do sol é uma espécie brasileira da família Basidiomycetes comercializada mundialmente como alimento medicinal ⁽¹⁾. Relatos anteriores indicam potencial terapêutico quanto à atividade anticancerígena em cultivo de células ⁽²⁾ e modelos *in vivo* ⁽³⁾, com propriedades antivirais ⁽⁴⁾, atividade antioxidante, imunorregulatória e antidiabética ⁽⁵⁾. Tem também efeito anti-inflamatório evidenciado pela redução dos níveis de citocinas no sangue em pacientes com doenças inflamatórias crônicas ⁽⁶⁾.

Os principais compostos químicos consistem em polissacáridos, lipídeos, incluindo ergosterol, esteróis, proteínas, vitaminas B, C e D, e compostos fenólicos ⁽⁷⁾. A composição complexa resulta em diferentes mecanismos de ação. Um dos mais relevantes é o potencial anticancerígeno, que inclui a indução de apoptose em células e modelos de roedores de diferentes tipos de câncer, como o fibrossarcoma, sarcoma, câncer de ovário, pulmão, leucemia, entre outros ⁽⁶⁾. As ações terapêuticas sobre as células cancerosas estão associadas à modulação do sistema imunológico, bem como à ativação de células *natural killer* (NK) e à indução de apoptose ⁽³⁾.

Embora a quimioterapia continue a ser o padrão de ouro para a maioria dos tratamentos de câncer, são frequentes as reações adversas graves e a resistência tumoral ⁽⁸⁾. Por esta razão, as estratégias anticancerígenas adjuvantes, tais como a utilização de subprodutos e extratos naturais de baixa toxicidade, como suplementos, são modalidades promissoras ⁽⁹⁾. A este respeito, o tumor sólido de Ehrlich é um modelo conhecido de câncer da mama de crescimento rápido, de baixo custo e fácil monitorização ⁽¹⁰⁾. Assim, este estudo teve como objetivo descrever os efeitos de diferentes extratos de *A. blazei* em modelo animal de tumor de Ehrlich, incluindo a avaliação do peso dos órgãos e análise histológica do tumor, fígado, rim, baço e gânglios linfáticos.

2. Materiais e métodos

2.1 Preparação dos extratos de *A. blazei* Muril (ABM).

Substâncias com provável atividade antineoplásica, como o composto ativo de hemicelulose (AHCC) e o complexo polissacarídeo-proteína (designado como ATOM), foram obtidas dos micélios cultivados de *A. blazei*. Como as extrações aquosas não são capazes de

promover o rompimento completo dessa barreira e, conseqüentemente, não disponibilizam essas substâncias para atividade direta (*in vitro*) ou para absorção pelo sistema digestivo (*in vivo*), o uso de temperaturas superiores a 100°C, ou a inserção de ácidos durante o processo de extração, proporciona maiores concentrações de ingredientes ativos. Esse fato pode estar relacionado ao rompimento da barreira de hemicelulose do cogumelo ⁽¹¹⁾. Portanto, diferentes formas de extração do *Agaricus blazei* Murrill podem determinar uma maior ou menor concentração dos componentes farmacológicos ativos com ação antineoplásica presentes no cogumelo.

Os extratos foram obtidos de 3 kg de ABM desidratado adquirido de um produtor comercial na cidade de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. Uma amostra foi depositada no herbário do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (BHCB 97946).

Os extratos foram preparados com base em quatro métodos de extração ⁽¹¹⁾. Dois extratos principais foram produzidos com pH neutro (7,0) e ácido (4,0). Alíquotas de 150 g de ABM seco foram misturadas em 1.000 mL de água destilada ou ácido acético glacial a 2%, produzindo suspensões neutras (pH 7) ou ácidas (pH 4), respectivamente. O processo foi repetido, e cada suspensão foi mantida em um banho ultrassônico a +37°C por 30 minutos. Após a extração, cada solução foi filtrada (Tabela 1).

Tabela 1 Soluções finais do extrato de *Agaricus blazei*

Solução	Tipo de extrato	pH	Parte da solução
1 - A	Banho de água a 60°C / 3 h	Neutro (pH 7)	Solução Total
1 - B	Banho de água a 60°C / 3 h	Neutro (pH 7)	Polissacarídeos (precipitado)
1 - C	Banho de água a 60°C / 3 h	Neutro (pH 7)	Sobrenadante
2 - A	Banho de água a 60°C / 3 h	Ácido (pH 4)	Solução Total
2 - B	Banho de água a 60°C / 3 h	Ácido (pH 4)	Polissacarídeos (precipitado)
2 - C	Banho de água a 60°C / 3 h	Ácido (pH 4)	Sobrenadante
3 - A	Banho ultrassônico / 30 min	Neutro (pH 7)	Solução Total
3 - B	Banho ultrassônico / 30 min	Neutro (pH7)	Polissacarídeos (precipitado)
3 - C	Banho ultrassônico / 30 min	Neutro (pH 7)	Sobrenadante
4 - A	Banho ultrassônico / 30 min	Ácido (pH 4)	Solução Total
4 - B	Banho ultrassônico / 30 min	Ácido (pH 4)	Polissacarídeos (precipitado)
4 - C	Banho ultrassônico / 30 min	Ácido (pH 4)	Sobrenadante

Em cada amostra, 500 mL de extrato foram adicionados a 2000 mL de etanol para precipitar os polissacarídeos. Após a precipitação, 50 mL de cada amostra foram homogeneizados e centrifugados por 10 min a +20°C a 300 g. O sedimento foi separado e dessecado à temperatura ambiente, pesado e a porcentagem de polissacarídeos determinada.

Os sedimentos foram dissolvidos em solução de ácido acético a 2% ou água destilada até um volume de 500 mL para criar soluções de polissacarídeos de *A. blazei*. As soluções foram concentradas sob pressão reduzida a 80°C, para remoção da fração etanólica. Água destilada

ou ácido acético a 2% foram adicionados para completar o volume de 500 mL e produzir os extratos de *A. blazei* para uso nos experimentos. As soluções de extrato total, sobrenadante e polissacarídeos foram criadas para cada pH (4,0 ou 7,0) de extração, para obter seis soluções. Os monossacarídeos presentes nas soluções de polissacarídeos foram determinados por cromatografia gasosa de acetatos de alditol produzidos por hidrólise com ácido trifluoroacético, redução com borohidreto de sódio e acetilação. Assim, o soluto ABM e o conteúdo relativo de glicose e manose foram determinados.

O tamanho das moléculas de polissacarídeos foi medido por cromatografia líquida com exclusão de tamanho ou cromatografia de permeação em gel, usando a coluna de poliestireno padrão GPC-803D 300 x 8 mm, dimetilformamida como fase móvel, taxa de fluxo de 1,0 mL/min, detector ultravioleta a 270 nm e volume de disparo de 20 µL.

2.2 Composição do extrato

Uma amostra com 150 g de cogumelo seco, *in natura*, foi triturada a uma granulometria de 40 mesh, para avaliação dos níveis de proteína bruta (PB), matéria seca total (MST), fibra detergente neutra (FDN) e fibra detergente ácida (FDA).

Para a determinação da granulometria de 40 mesh, 600 g de cogumelo seco, *in natura*, moído foram destinados a quatro processos diferentes de extração aquosa e posterior fracionamento em três soluções cada: solução total, sobrenadante e extratos precipitados. Uma amostra de cada uma das soluções B (de polissacarídeos) foi investigada quanto à sua constituição em monossacarídeos. Após hidrólise com ácido trifluoroacético, redução com borohidreto de sódio e acetilação, os acetatos de alditóis formados foram analisados por Cromatografia Gasosa (GC), determinando os níveis de glicose (GL) e manose (MA) presentes, bem como o valor relativo entre esses componentes. Essas amostras também foram avaliadas em Cromatografia Líquida de Exclusão de Tamanho (STC) (Cromatografia de Permeação em Gel). Ela foi usada para avaliar o tamanho das moléculas de polissacarídeos presentes nas amostras de ABM. Essas avaliações foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC), com uma coluna GPC-803D 300 x 8 mm e com a fase móvel de dimetilformamida, taxa de fluxo de 1,0 ml por minuto, detector ultravioleta a 270 nm e volume de injeção de 20 µL. Para as avaliações de cromatografia de exclusão de tamanho, o padrão usado para a comparação e avaliação do peso molecular dos polissacarídeos foi o poliestireno.

2.3 Desenho experimental

Animais

Todos os procedimentos com animais foram realizados com a aprovação do Comitê de Cuidados e Uso de Animais da Universidade Federal do Estado de Minas Gerais.

Camundongos suíços (*Mus musculus*) fêmeas não isogênicas (n=192) foram usados nos experimentos, pesando entre 25 e 30 g, com 60 dias de idade. Todos os animais foram

mantidos em condições padrão (ciclos de 12 horas de luz e escuridão) a $+22 \pm 2$ °C, alimentadas com dieta de roedores de laboratório e água *ad libitum*. Os camundongos foram separados aleatoriamente em 4 grupos (n=48) para avaliação dos 4 métodos de extração. Cada grupo de extração consistiu em 2 grupos (n=24), com ou sem tumor, designados GI e GII, respectivamente, separados em 4 grupos de tratamento (n=6) (Tabela 2).

Tumor sólido de Ehrlich

Para preparar a indução de um tumor sólido, as células do tumor de Ehrlich foram mantidas na forma ascítica em camundongos albinos suíços e transferidas semanalmente para animais saudáveis para preservar o tumor de Ehrlich *in vivo*. No dia 7 pós-inoculação, 3 mL de líquido ascítico foram coletados do camundongo doador em uma seringa descartável. O líquido ascítico foi colocado em um microtubo e centrifugado a 300 g por 3 minutos para separar o sobrenadante. O volume foi aumentado para 3 mL com solução salina a 0,9% em temperatura ambiente e agitado lentamente, e o procedimento foi repetido três vezes até que o sobrenadante se tornasse translúcido ^(11,12).

Para análise da viabilidade do tumor, 1,98 mL de solução salina a 0,9% foi adicionado a 0,02 mL de suspensão de células do líquido ascítico e homogeneizado. Alíquotas de 0,1 mL dessa mistura foram adicionadas a um volume igual de azul de tripano a 0,1%. Foi realizada uma contagem de células em quatro quadrantes externos de um hemocítmetro de Neubauer. As contagens mostraram que 95,04% das células eram viáveis (translúcidas) e 4,69% não viáveis (coradas com azul), resultando em 5×10^8 células tumorais viáveis por 1,0 mL de suspensão.

Os animais foram inoculados no coxim plantar do membro posterior esquerdo com uma injeção (50 µL) contendo $2,5 \times 10^6$ de células tumorais de Ehrlich retiradas da ascite de camundongos suíços.

Tratamentos

Durante 21 dias, água destilada, extrato total, sobrenadante ou solução de polissacarídeos foram administrados a camundongos diariamente por gavagem, após 3 horas de jejum alimentar e hídrico, a 2,5 g/kg de peso corporal (PC).

Tabela 2 Distribuição de 192 camundongos em grupos sem (GI) ou com (GII) tumor sólido de Ehrlich (n = 24) e em grupos de tratamento (n = 6), tratados por 21 dias com extratos de *Agaricus blazei* produzidos em banho-maria ou banho ultrassônico em pH 4 ou pH 7, para solução total, solução de polissacarídeo ou sobrenadante ou água destilada.

Tratamentos para 4 experimentos: com e sem tumor de Erlich, com 4 tratamentos
Experimento 1: GI – sem tumor
(A) Água destilada
(B) Solução total com pH 7 extraída por banho de água a 60°C
(C) Solução de polissacarídeos com pH 7 extraída por banho de água a 60°C
(D) Solução sobrenadante com pH 7 extraída por banho de água a 60°C
Experimento 1: GII – com tumor de Ehrlich
(A) Água destilada
(B) Solução total com pH 7 extraída por banho de água a 60°C
(C) Solução de polissacarídeos com pH 7 extraída por banho de água a 60°C
(D) Solução sobrenadante com pH 7 extraída por banho de água a 60°C
Experimento 2: GI – sem tumor

(E) Água destilada
(F) Solução total com pH 4 extraída por banho de água a 60°C
(C) Solução de polissacarídeos com pH 4 extraída por banho de água a 60°C
(H) Solução sobrenadante com pH 4 extraída por banho de água a 60°C
Experimento 2: GII - com tumor de Ehrlich
(E) Água destilada
(F) Solução total com pH 4 extraída por banho de água a 60°C
(G) Solução de polissacarídeos com pH 4 extraída por banho de água a 60°C
(H) Solução sobrenadante com pH 4 extraída por banho de água a 60°C
Experimento 3: GI - sem tumor
(I) Água destilada
(J) Solução total extraída com pH 7 por banho ultrassônico
(K) Solução de polissacarídeos com pH 7 extraída com banho ultrassônico
(L) Solução sobrenadante com pH 7 extraída com banho ultrassônico
Experimento 3: GII - com tumor de Ehrlich
(I) Água destilada
(J) Solução total extraída com pH 7 por banho ultrassônico
(K) Solução de polissacarídeos com pH 7 extraída com banho ultrassônico
(L) Solução sobrenadante com pH 7 extraída com banho ultrassônico
Experimento 4: GI - sem tumor
(M) Água destilada
(N) Solução total extraída com pH 4 por banho ultrassônico
(O) Solução de polissacarídeos com pH 4 extraída com banho ultrassônico
(P) Solução sobrenadante com pH 4 extraída com banho ultrassônico
Experimento 4: GII - com tumor de Ehrlich
(M) Água destilada
(N) Solução total extraída com pH 4 por banho ultrassônico
(O) Solução de polissacarídeos com pH 4 extraída com banho ultrassônico
(P) Solução sobrenadante com pH 4 extraída com banho ultrassônico

2.4 Pesagem das amostras e histopatologia

Os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical. O exame de necropsia foi realizado, e amostras do baço, fígado, rins, tumor e linfonodos poplíteos dos animais foram coletadas. O material foi pesado em balança eletrônica com cinco casas decimais de precisão, fixado em formol a 10%. Os cálculos dos valores relativos dos órgãos coletados (peso do órgão/peso do animal) foram realizados para minimizar os efeitos das diferenças de peso entre os animais. Do peso total do membro com tumor (posterior esquerdo) foi subtraído o peso do membro sem tumor (posterior direito) de cada animal. Os valores obtidos foram divididos pelo peso do animal, obtendo-se os valores considerados como o peso relativo do tumor de cada um dos animais do grupo GII.

Após a coleta e a pesagem, o baço, o fígado e os linfonodos foram seccionados. As massas tumorais foram separadas dos membros e seccionadas transversalmente. Todas foram acomodadas separadamente em cassetes plásticos para inclusão histopatológica e fixadas em formal neutro tamponado a 10%. Posteriormente, foram desidratadas em soluções alcoólicas crescentes, limpas em xilol e incluídas em parafina histológica. Os blocos de parafina foram seccionados em micrômetro, obtendo-se cortes de 4 µm, para posterior desparafinização em xilol, hidratação em concentrações decrescentes de álcool etílico, coloração pela técnica de Hematoxilina e Eosina, nova desidratação em concentrações crescentes de álcoois e montagem das lâminas, sendo avaliados por microscopia óptica ^(13,14).

2.5 Análises estatísticas

Foram realizadas análises estatísticas, avaliando a normalidade das variáveis usando o método Kolmogorov-Smirnov. As variáveis paramétricas foram submetidas à análise de variância pelo método ANOVA e pelo teste de Duncan, com nível de significância de $p < 0,05$, o

que confere robustez às conclusões do estudo. As não paramétricas foram analisadas com análise de variância pelo método ANOVA e teste de Kruskal-Wallis ⁽¹⁵⁾, com exceção dos resultados obtidos nas avaliações descritivas, observados nas leituras das lâminas histológicas.

3. Resultados

3.1 Identificação do cogumelo

O cogumelo foi identificado como *Agaricus blazei* Murill. Sua alíquota foi depositada no Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o número BHCB: 97946.

3.2 Composição dos extratos

Após as extrações, houve uma redução para 21,4% e 27,9% dos valores originais de PC, nas extrações em banho-maria com pH neutro e ácido, respectivamente. Nas extrações em banho ultrassônico, a redução foi de 16,91% e 20,92%, em pH neutro e ácido, respectivamente. Os resultados indicam que os extratos podem ter até 78,6 g; 72,1 g; 83,1 g e 79,08 g de CP do ABM para cada 100 mL de extratos em banho-maria neutro e ácido e em banho ultrassônico neutro e ácido, respectivamente. Dessa forma, observou-se que a extração em banho ultrassônico a pH 7 foi mais eficiente na extração do PB, bem como na diminuição dos valores de FDN e FDA. Os níveis mais baixos de FDN e ADF indicam a melhor quebra das barreiras de celulose e hemicelulose do cogumelo. Esse fator é de grande relevância, pois os autores indicam que partes dos princípios ativos do cogumelo podem ficar presas nessas barreiras. Dessa forma, o banho ultrassônico é mais eficiente na quebra dessa barreira, e o pH 7 é mais eficiente do que o pH 4.

A Figura 1 mostra as porcentagens de precipitados obtidos nas diferentes extrações de ABM. Observa-se que a extração em um banho ultrassônico com pH neutro forneceu a maior quantidade de precipitado (16,42%). Da mesma forma, observa-se que a extração em banho ultrassônico com pH 4 (10,61%) foi semelhante à de 60°C com pH 7 (10,83%) e melhor do que a extração a 60°C com pH 4 (8,46%).

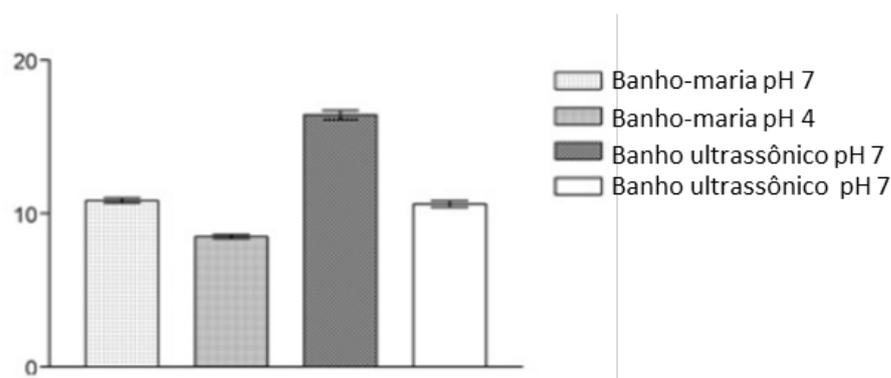


Figura 1 Valores percentuais do precipitado obtido do cogumelo *Agaricus blazei*, após extrações a 60°C por 3 horas em pH 7,0 e pH 4,0, e banho ultrassônico por 30 minutos em pH 7,0 e pH 4,0.

3.3 Perfil cromatográfico de monossacarídeos dos extratos ABM

A Figura 2 mostra os cromatogramas obtidos pela avaliação de uma amostra de cada uma das soluções B (de polissacarídeos), quanto à sua constituição em monossacarídeos, analisada por cromatografia gasosa (CG). As avaliações por CG revelaram que os polissacarídeos extraídos não são constituídos apenas de glucopiranosídeos (β -glucano), como esperado, mas também apresentam manopiranosídeos (manano) e/ou glucomanopiranosídeos (glucomananos).

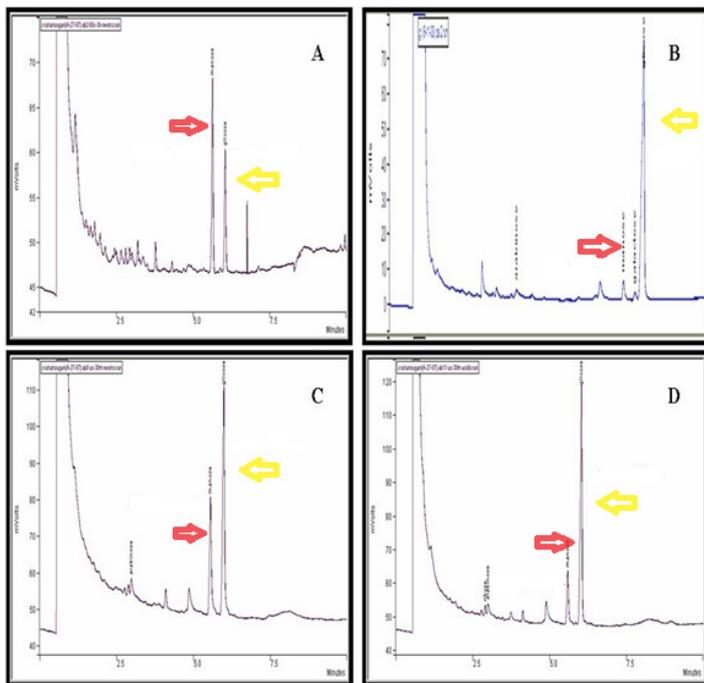


Figura 2 Perfil cromatográfico de monossacarídeos analisados por cromatografia gasosa (GC), demonstrando os níveis de glicose (GL - setas amarelas) e manose (MA - setas vermelhas) presentes nos extratos polissacarídicos (B) da extração aquosa do cogumelo *Agaricus blazei*, após extrações a 60°C por 3h em pH 7,0 e pH 4,0 e extrações em banho ultrassônico por 30 min em pH 7,0 (C) e pH 4,0 (D).

3.4 Avaliações de peso dos órgãos internos

As Figuras 3-5 mostram os valores médios e o desvio padrão do peso relativo do baço, fígado e rins dos animais nos quatro blocos experimentais avaliados. Em relação ao baço, no primeiro grupo experimental, houve diferença estatística no peso do baço entre os animais do GI-A (inoculado com solução salina e tratado com água) e do GII-A (com tumor e tratado com água), demonstrando que o tumor de Ehrlich leva a um aumento do peso relativo do baço. O uso do sobrenadante do ABM a 60°C em pH 7 influencia o peso do baço, o que pode estar relacionado à menor produção de citocinas no organismo.

No segundo momento experimental, os animais foram tratados com soluções e ABM a 60°C em pH 4, e não foi observada diferença significativa. Ao utilizar os extratos de ABM em banho ultrassônico a pH 4, foi encontrada diferença estatística entre os valores do peso relativo do baço dos camundongos do grupo GI (sadios), exceto os do subgrupo GI-P (sadios e tratados com sobrenadante de ABM em banho ultrassônico a pH 4), em relação aos animais do grupo GII (com tumor).

A avaliação hepática mostrou que, nos animais tratados com soluções de ABM a 60°C em pH 7, o subgrupo GI-C (sadios e tratados com polissacarídeos) apresentou o maior valor, diferente do subgrupo GII-A (com tumor e tratados com água). Os tratamentos com diferentes extratos de ABM a 60°C em pH 4 causaram reduções significativas ($p < 0,05$) de peso nos animais do subgrupo GI-F (sadios) e GII-F (portadores de tumor).

Na terceira fase experimental, em que os animais foram tratados com soluções de ABM em banho ultrassônico a pH 7, não foi observada diferença estatística entre os subgrupos avaliados. No entanto, no tratamento com extração em banho ultrassônico a pH 4, foi possível verificar uma redução ($p < 0,05$) nos valores dos subgrupos GII-O (com tumor e tratados com polissacarídeos ABM em banho ultrassônico a pH 4) e animais dos subgrupos GII-P (inoculados com tumor e tratados com solução sobrenadante ABM em banho ultrassônico a pH 4).

Quando foram avaliados os valores médios do peso relativo do fígado dos animais tratados com extratos de ABM a 60°C em pH 4, observou-se que os animais com tumores e tratados com solução total apresentaram valores médios de peso relativo menores.

Não foram observadas alterações nos valores do peso relativo dos rins nos diferentes subgrupos dos quatro blocos experimentais avaliados. A presença do tumor ou o uso de diferentes tratamentos com ABM não alteraram esses valores.

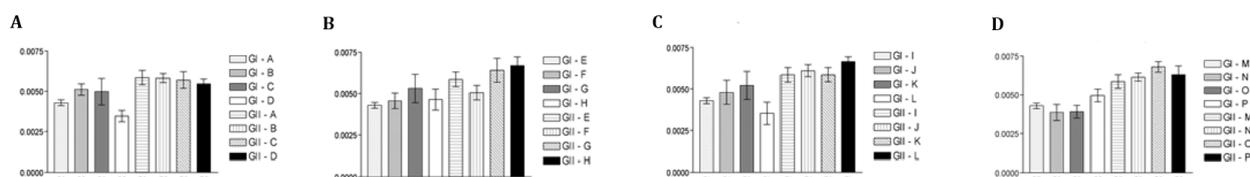


Figura 3 - Valores médios do peso relativo (peso do órgão/peso do animal) do baço (A-D), no 21º dia do experimento, em camundongos saudáveis (GI) e com Tumor de Ehrlich sólido (GII), tratados com diferentes extratos de *Agaricus blazei*.

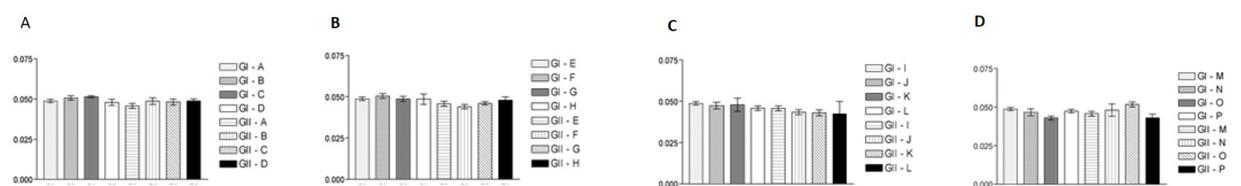


Figura 4 - Valores médios do peso relativo (peso do órgão/peso do animal) do fígado (A-D), no 21º dia do experimento, em camundongos saudáveis (GI) e com Tumor de Ehrlich sólido (GII), tratados com diferentes extratos de *Agaricus blazei*.

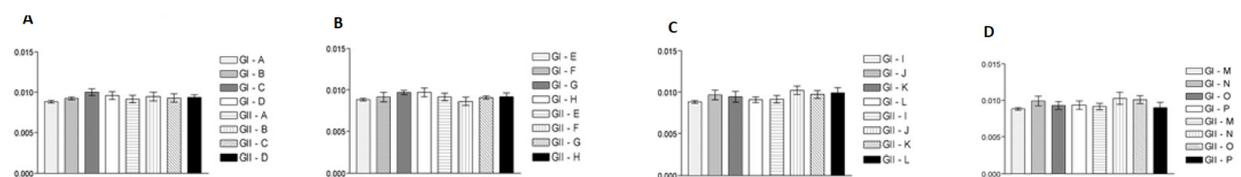


Figura 5 - Valores médios do peso relativo (peso do órgão/peso do animal) dos rins (A-D), no 21º dia do experimento, em camundongos saudáveis (GI) e com Tumor de Ehrlich sólido (GII), tratados com diferentes extratos de *Agaricus blazei*.

3.5 Histologia dos órgãos internos

Durante a necropsia dos animais, não foram observadas alterações macroscópicas dignas de nota em nenhum grupo avaliado (Figuras 6, 7, 8 e 9). No exame microscópico, não foram observadas alterações dignas de nota nos animais dos grupos GI (saudáveis).

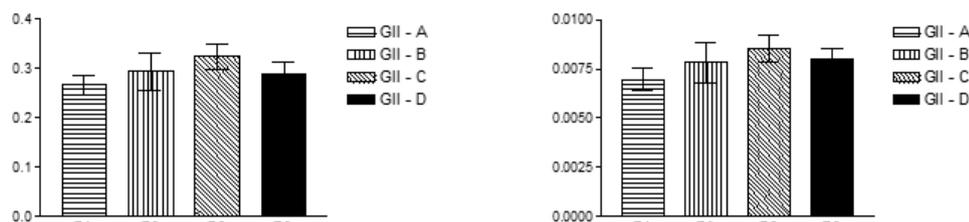


Figura 6 - Valores médios do tumor de Ehrlich (peso do membro posterior esquerdo - peso do membro posterior direito) no 21º dia do experimento, de camundongos com tumor de Ehrlich sólido (GII), tratados com água (A) e extratos de *Agaricus blazei* a 60°C em pH 7: solução total (B), polissacarídeos (C) e sobrenadante (D).

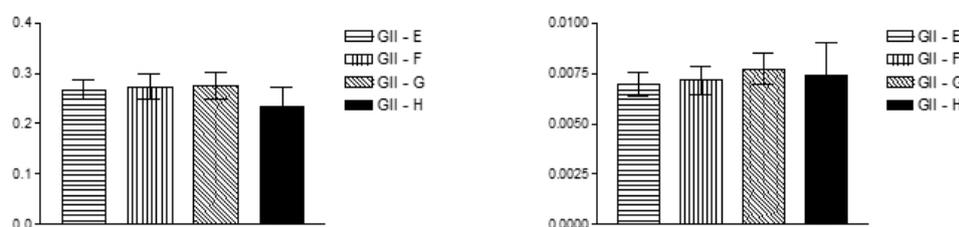


Figura 7 - Valores médios do tumor de Ehrlich (peso do membro posterior esquerdo - peso do membro posterior direito) no 21º dia do experimento, de camundongos com tumor de Ehrlich sólido (GII), tratados com água (E) e extratos de *Agaricus blazei* a 60°C em pH 4: solução total (F), polissacarídeos (G) e sobrenadante (H).

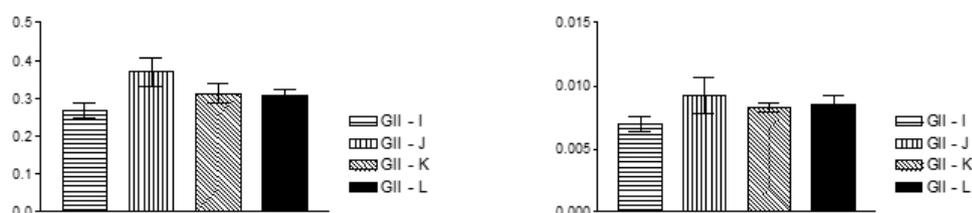


Figura 8 - Valores médios do tumor de Ehrlich (peso do membro posterior esquerdo - peso do membro posterior direito) no 21º dia do experimento, de camundongos com tumor de Ehrlich sólido (GII), tratados com água (I) e extratos de *Agaricus blazei* em banho ultrassônico e pH 7: solução total (J), polissacarídeos (K) e sobrenadante (L).

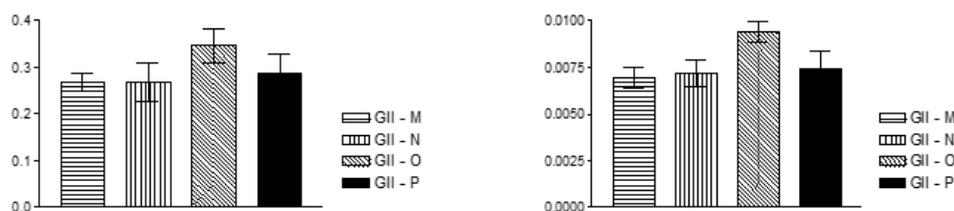


Figura 9 - Valores médios do tumor de Ehrlich (peso do membro posterior esquerdo - peso do membro posterior direito) no 21º dia do experimento, de camundongos com tumor de Ehrlich sólido (GII), tratados com água (M) e extratos de *Agaricus blazei* em banho ultrassônico e pH 4: solução total (N), polissacarídeos (O) e sobrenadante (P).

No baço dos animais do subgrupo GII (portadores do tumor) foi observado aumento do número de macrófagos com deslocamento do núcleo para a periferia e presença de rarefação moderada dos folículos linfoides da polpa branca (Figura 10-A).

A avaliação hepática revelou que, em todos os quatro grupos experimentais, nos animais do subgrupo GII (portadores do tumor de Ehrlich independentemente do tratamento utilizado) (Figura 10-C), foram observadas células com citoplasma granular, característico de degeneração turva dos hepatócitos, localizada principalmente próxima à cápsula dos órgãos, e áreas com vacúolos e núcleos deslocados para a periferia, indicativas do início de um processo de esteatose hepática. Nenhum animal do grupo GI (saudável), apresentou qualquer alteração, independentemente do tratamento utilizado.

Não foram observadas alterações macroscópicas ou microscópicas nos rins dos animais dos quatro blocos experimentais, inoculados ou não com o tumor de Ehrlich e tratados com placebo ou diferentes soluções de ABM.

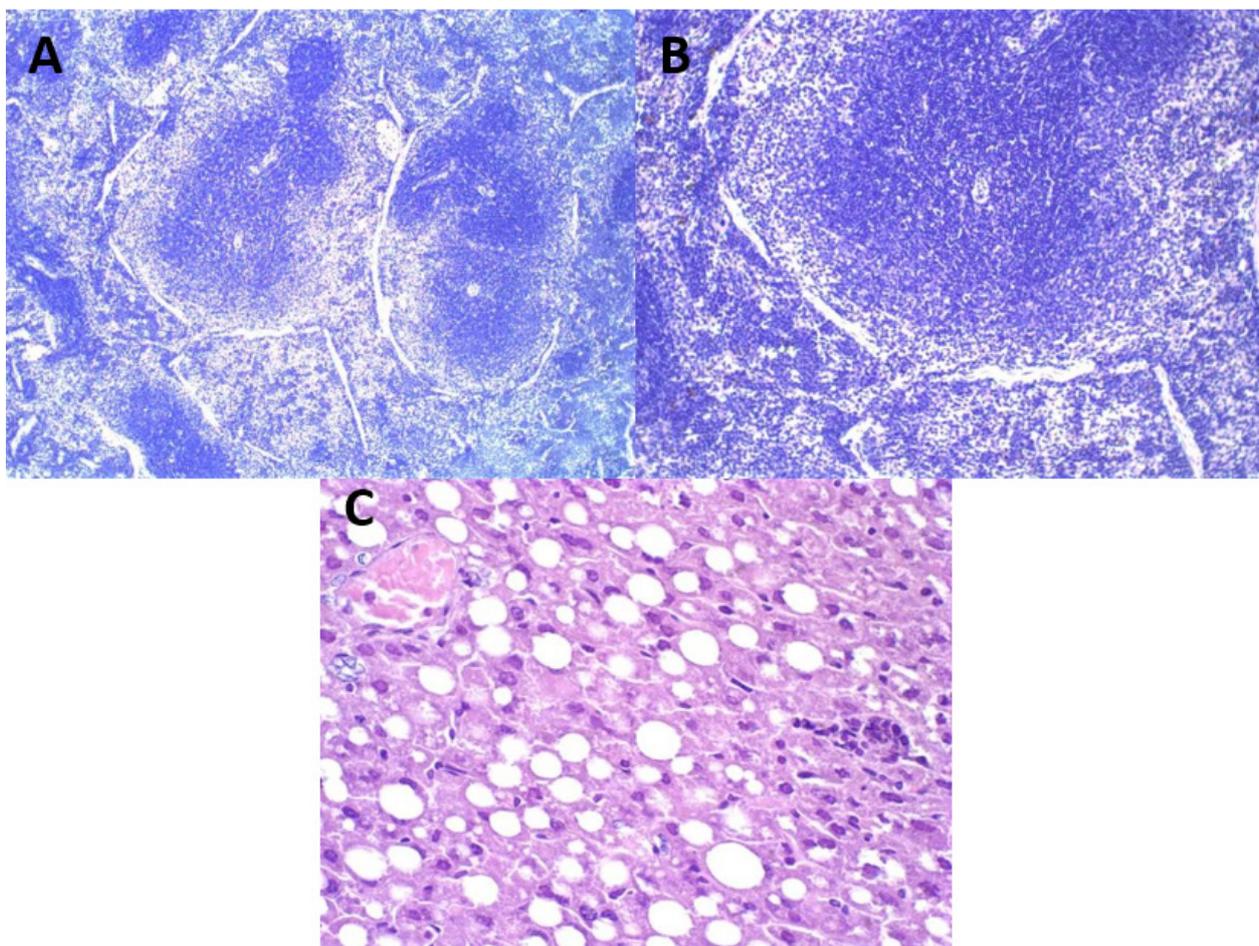


Figura 10. A e B: Seção do baço de camundongos do grupo inoculado com Tumor de Ehrlich sólido e tratado com água (GI-A) (HE, 10 e 20x, respectivamente), demonstrando a presença de rarefação moderada dos folículos linfoides de polpa branca; c - Lâminas histológicas do fígado de camundongos do grupo inoculado com tumor e tratado com água (GI-A) (HE, 60x), demonstrando a presença de degeneração turva, linfocitose moderada e vacúolos com deslocamento do núcleo para a periferia das células.

3.6 Avaliação do peso e da histologia do tumor

Os pesos foram calculados a partir da subtração do valor obtido com o peso do membro posterior esquerdo (inoculado com o tumor de Ehrlich) do valor do peso do membro posterior direito (sem tumor). Não foram observadas diferenças ($p < 0,05$) nos valores do peso do tumor ou do peso relativo do tumor nos subgrupos avaliados nos quatro blocos experimentais.

Na avaliação macroscópica, os tumores dos animais de todos os subgrupos dos quatro blocos experimentais avaliados eram semelhantes, com coloração esbranquiçada e estavam infiltrados nos ossos da região. Embora não tenham sido realizadas avaliações morfométricas, foram observadas diferenças na morfologia das neoplasias dos animais avaliados (Figuras 11 e 12).

Podem ser observadas áreas de ulceração na epiderme da pata dos animais (100% dos animais) dos grupos inoculados com tumor e tratados com placebo (água), fato que não ocorreu em nenhum dos animais tratados com as diferentes soluções de ABM. Nos animais tratados com a solução de sobrenadante do ABM (60°C e banho ultrassônico), quando comparados aos animais tratados com a solução de polissacarídeos do ABM (60°C e banho ultrassônico), observa-se menor celularidade tumoral, menor distância entre a epiderme e a musculatura, áreas livres de células tumorais na epiderme dos coxins, menores áreas de necrose e infiltração celular, demonstrando menor crescimento tumoral nesses animais. Tais fatores podem indicar a atividade antineoplásica das soluções sobrenadantes do ABM.

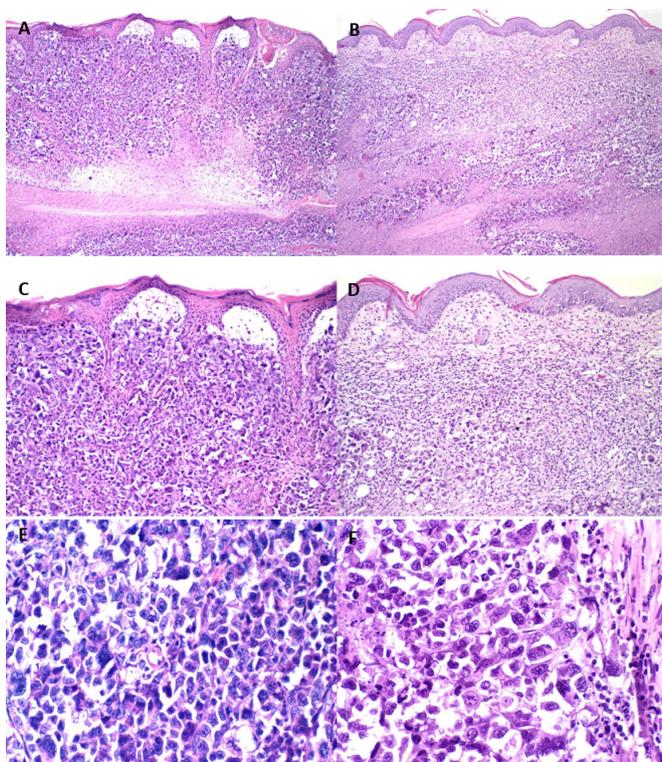


Figura 11. Pele: Camundongos inoculados com tumor de Ehrlich. Observa-se as células neoplásicas pleomórficas infiltrativas em animais tratados com água (1) e com a solução total de ABM a 60°C em pH 7; coloração HE e ampliação de A e B-10x; C e D-20x e E e F-60x.

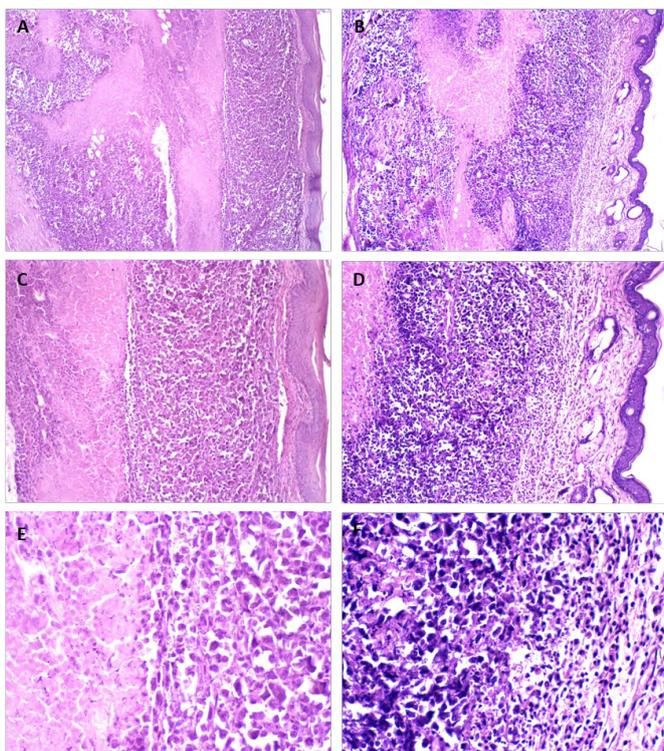


Figura 12. Pele: Camundongos inoculados com tumor de Ehrlich e tratados com: (1)- solução de polissacarídeos ABM a 60°C em pH 4; (2)- solução de sobrenadante ABM a 60°C em pH4; coloração HE e A e B - ampliação de 10x; C e D - 20x e E e F - 60x demonstrando maior comprimento entre a epiderme e a musculatura em A devido à maior quantidade de células tumorais, infiltrado inflamatório e áreas de necrose, em relação a B; áreas maiores de necrose em C e E em comparação com D e F.

3.7 Avaliação dos linfonodos poplíteos.

Foi observada metástase nos linfonodos poplíteos esquerdos em todos os animais com neoplasia, independentemente do uso de diferentes extratos de ABM. As células neoplásicas foram visualizadas em intensidade semelhante em todos os subgrupos, sendo encontradas principalmente em regiões subcapsulares, agrupadas ou na forma de cordões.

4. Discussão

No presente estudo, o potencial anticancerígeno do cogumelo do sol, *A. blazei*, foi investigado em um modelo de tumor de Ehrlich em camundongos. O *A. blazei* é conhecido por sua atividade anticâncer⁽³⁾ e hepatoprotetora⁽¹⁶⁾. O tumor de Ehrlich é um modelo animal bem estabelecido para o rápido desenvolvimento do câncer e, tradicionalmente, usado como um modelo de oncologia experimental murino para investigar agentes quimioterápicos. A metástase é comum nos linfonodos regionais e as repercussões sistêmicas também são bem conhecidas. Vários extratos naturais foram usados na pesquisa de terapias adjuvantes contra o câncer que poderiam melhorar o resultado clínico^(17,18), inclusive extratos de cogumelos⁽¹¹⁾.

O cogumelo *A. brasiliensis* Murill ou *A. blazei* Murill, também conhecido como cogumelo do sol, é uma espécie brasileira que tem sido comercializada em todo o mundo. Diferentes metodologias têm sido usadas para extrair seus componentes ativos⁽¹⁹⁾. Em nosso estudo,

após a confirmação botânica e a triagem de resíduos, foram feitas quatro abordagens considerando a extração com banho-maria, banho ultrassônico, pH 7 e pH 4, atingindo a temperatura de 60°C. O extrato de ABM em banho ultrassônico e pH 7 proporcionou maiores valores de PB na solução final, bem como menores valores de NDF e ADF em relação aos valores iniciais, indicando maior quebra das barreiras de celulose, em relação às outras extrações do cogumelo ABM. Isso proporciona uma quantidade maior de polissacarídeos na solução final e revela altos valores de proteína. Foram registrados valores entre 27,8 e 43,19 g de PC por 100 g de cogumelo. Na amostra *in natura*, foi observado um teor de 31,31 g% de PB, confirmando que a amostra avaliada tem altos níveis dessa substância ⁽²⁰⁾.

A avaliação complementar por cromatografia gasosa identificou a presença de glucopiranosídeos (β -glucano), como esperado, mas também a presença de manopiranosídeos (manano) e/ou glucomanopiranosídeos (glucomananos), mostrando também que diferentes formas de extração levam a alterações na proporção manose:glicose. Esses resultados são de grande importância, pois a maioria dos autores menciona apenas a existência de glicose em extratos aquosos de ABM. Foram relatados diferentes valores de β -glucana em diferentes alíquotas de cogumelo e advertiu-se que diferenças nos métodos de cultivo podem alterar as quantidades dessa substância no ABM ⁽²¹⁾. Tais observações indicam que as variadas formas de extração, além de interferirem na quantidade de polissacarídeos, também levam à extração de diferentes quantidades de cada tipo de elemento. A comprovação da existência de glicose e manose, e o fato de que os níveis desses polissacarídeos mudam com diferentes extrações, é importante para estudos sobre tratamentos com solução de ABM, uma vez que o β -glucano encontrado nesse cogumelo é um polissacarídeo com atividade comprovada na modulação do sistema imunológico ⁽²¹⁾. Assim, diferentes extratos de ABM podem levar a diferentes resultados com relação à ativação do sistema imunológico e sua influência sobre os tratamentos avaliados. Também é importante o fato de que a maioria dos autores atribui a atividade do ABM aos polissacarídeos, mas a contribuição de outros componentes, como proteínas, triterpenos, esteroides, nucleosídeos e fenóis, não pode ser descartada ⁽²²⁾.

Todos os animais que receberam células tumorais desenvolveram lesões, porém o uso do *A. blazei* não foi capaz de interromper o processo de metástase da neoplasia nos linfonodos poplíteos, independentemente dos diferentes tratamentos, conforme descrito por Verçosa Junior et al. ⁽²³⁾, que utilizaram extrato total de ABM por 17 e 57 dias em camundongos com tumor de Ehrlich por 17 dias. As células neoplásicas foram visualizadas em intensidade semelhante em todos os subgrupos, sendo encontradas principalmente em regiões subcapsulares, agrupadas ou em forma de cordões. Esse achado revela que os extratos não tiveram ação anticancerígena significativa, contradizendo pesquisas anteriores ⁽³⁾. Os autores sugerem que a extração em altas temperaturas, como 60°C, poderia possivelmente induzir a degradação do(s) princípio(s) ativo(s) do cogumelo ⁽²⁴⁾. Foi relatado um aumento no peso relativo do baço e alterações no eritrograma e no leucograma de camundongos inoculados com tumor de Ehrlich tratados com filtrado e suspensão total de ABM (10 mg/mL) ⁽²⁵⁾. Esses resultados diferem dos observados no extrato de ABM a 60°C em pH 7, no qual o tratamento com a solução total de ABM foi semelhante ao tratamento com placebo. Com relação ao

dano ao baço, os valores médios mais baixos do peso relativo do baço foram observados nos dois subgrupos que receberam o sobrenadante do ABM a 60°C com pH 7 e a 60°C com pH 4.

O aumento do peso relativo do baço observado nos diferentes grupos estudados pode estar correlacionado com a maior ação de hemocaterese ou de maturação de células sanguíneas desse órgão em camundongos e se assemelham aos resultados descritos por Korekane et al. ⁽²⁶⁾, que relataram maior peso relativo do baço em animais inoculados com tumor. Segundo os autores, a liberação de citocinas pode levar a um aumento do volume e do peso esplênico. A avaliação dos rins não revelou achados importantes, sugerindo que o fígado e o baço são melhores amostras para análise histológica.

Foram observados danos no fígado, indicando degeneração e possível esteatose, em todos os grupos com câncer. Não foi possível verificar atividades hepatoprotetoras em animais tratados com extratos de ABM nesse experimento, uma vez que foram observadas lesões nas células do fígado em animais inoculados com o tumor, independentemente do uso ou não de tratamentos com o cogumelo. Da mesma forma, não se pode estabelecer atividades hepatotóxicas para os extratos utilizados neste experimento, como sugerido por Mukai et al. ⁽²⁷⁾, que relataram disfunção hepática e aumento de lesões morfológicas em pacientes com câncer que passaram a utilizar extratos comerciais de ABM. Tais fatos podem ser correlacionados com as características agudas e agressivas do tumor de Ehrlich, tanto em termos de crescimento local quanto de atividade hepatotóxica. Alguns autores ⁽²⁶⁾ também descreveram alterações nas células hepáticas com comprometimento das funções em camundongos com tumor de Ehrlich ascítico, causadas por citocinas (IL-1 e TNF α) e outros pesquisadores ⁽²⁸⁾ relataram degeneração turva dos hepatócitos em camundongos com tumores na forma sólida e ascítica. Contudo, foi relatada atividade hepatoprotetora em pacientes com hepatite crônica e inibição da formação de fibras de colágeno em hepatocarcinoma humano com o uso de extratos de ABM ^(29,30).

Barbisan et al. analisaram a influência modificadora da administração prévia de um extrato aquoso do cogumelo *A. blazei* sobre a necrose, a proliferação e o desenvolvimento de hepatócitos positivos para glutathione S-transferase, forma placentária (GST-P), induzidos por diferentes doses de dietilnitrosamina em ratos Wistar, sugerindo que o tratamento com extrato aquoso de *A. blazei* Murrill exerce um efeito hepatoprotetor sobre a toxicidade hepática e o início da hepatocarcinogênese em um ambiente de toxicidade moderada ⁽³¹⁾. O cogumelo *A. blazei* Murrill exerce um efeito hepatoprotetor sobre a toxicidade hepática e sobre o início da hepatocarcinogênese em um ambiente de toxicidade moderada ⁽³¹⁾. Pinheiro et al. demonstraram uma influência benéfica de uma dieta de cogumelos *A. blazei* Murrill em pó a 10% sobre a carcinogênese hepática, iniciada quimicamente em ratos. A influência benéfica dessa dieta foi dependente da cepa e do período de colheita dos fungos (basidiocarpo aberto ou fechado) e também foi caracterizada pela redução da proliferação celular e pelo desenvolvimento de focos pré-neoplásicos putativos de hepatócitos alterados ⁽³²⁾. Na maioria dos casos, o envolvimento hepático é secundário. O edema turvo é uma forma que os hepatócitos podem assumir antes da necrose. O citoplasma torna-se irregularmente compacto com grandes espaços claros (aparência granulosa) e basofílico ⁽³³⁾.

Os autores dividem as degenerações pela natureza química das soluções que se acumulam nas células lesadas (acúmulo de água, proteínas, lipídios e glicídios). O edema turvo (devido ao acúmulo de água) pode ser causado por hipóxia, infecções virais ou bacterianas agudas, hipertermia e intoxicação exógena, além de alterações circulatórias. Várias agressões ocorrem, agindo direta ou indiretamente sobre a membrana citoplasmática, alterando a troca de íons e a água que se acumula no interior das células. Essas degenerações podem causar aumento do volume e do peso do órgão, mas, na maioria das vezes, não comprometem as funções básicas de suas células⁽³⁴⁾. Essas observações podem estar relacionadas ao metabolismo das citocinas presentes na circulação na presença do tumor de Ehrlich.

5. Conclusão

Em conclusão, nossos resultados sugerem que o extrato de ABM a 60°C em pH 7 produzido por meio de banho ultrassônico tem o maior potencial terapêutico que deve ser mais explorado. Entretanto, não foi observada nenhuma atividade significativa de hepatoproteção ou anticâncer. Estudos adicionais devem avaliar a relevância da temperatura de extração na estabilização dos componentes ativos do extrato de *A. blazei*.

6. Considerações finais

Substâncias com provável atividade antineoplásica são encontradas nas barreiras de hemicelulose do cogumelo. As extrações aquosas ainda não são capazes de promover o rompimento completo dessa barreira e, conseqüentemente, não disponibilizam tais substâncias para atividade direta (*in vitro*) ou para absorção pelo sistema digestivo (*in vivo*). O uso de temperaturas superiores a 100°C, ou a inserção de ácidos durante o processo de extração, proporciona maiores concentrações de ingredientes ativos. Esse fato pode estar relacionado ao rompimento da barreira de hemicelulose do cogumelo.

A determinação da fibra detergente ácida (FDA) avalia os valores de celulose e lignina da amostra, sendo utilizada em avaliações de ração animal, e a avaliação da fibra detergente neutra (FDN) determina os níveis de celulose, hemicelulose e lignina no material analisado. Os teores mais baixos de NDF e FDA indicam uma melhor quebra das barreiras de celulose e hemicelulose. Dessa forma, essas avaliações centesimais realizadas antes das extrações e no material restante pós-extração podem ser de grande valia para avaliar a quebra das barreiras presentes nesse cogumelo.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

CRediT declaração de contribuição autoral

D. Verçosa Junior: Metodologia, Análise formal, Organização dos dados. **A.F.M. Botelho:** Escrita – revisão & edição, Escrita – artigo original, Visualização, Análise formal. **G.D. Cassali:** Investigação, Metodologia. **M.M. Melo:** Conceptualização, Recursos, Projeto administração, Gestão de recursos, Metodologia, Análise forma, Escrita – revisão e edição.

Financiamento

Essa pesquisa não recebeu financiamento externo.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) do Brasil. Também gostaríamos de agradecer a Dr. Vany P. Ferraz pelas análises químicas.

Referências

1. Firenzuoli F, Gori L, Lombardo G. The medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill: Review of literature and pharmaco-toxicological problems. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 2008; 5(1): 3-15. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nem007>
2. Sun Y, Cheng M, Dong L, Yang K, Ma Z, Yu S., Yan P, Bai K, Zhu Z, Zhang Q. *Agaricus blazei* extract (FA-2-b-β) induces apoptosis in chronic myeloid leukemia cells. Oncology Letters.2020; 20(5): 270.Disponível em:<http://dx.doi.org/10.3892/ol.2020.12133>
3. Bertollo AG, Mingoti MED, Plissari ME, Betti G, Júnior WAR, Luzardo AR, Ignácio ZM.*Agaricus blazei* Murill mushroom: A review on the prevention and treatment of cancer. Pharm. Res.- Modern Chinese Medicine. 2022; 2: 100032. Disponível em:<https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2021.100032>
4. Sorimachi K, Ikehara Y, Maezato G, Okubo A, Yamazaki S, Akimoto K, Niwa A. Inhibition by *Agaricus blazei* Murill fractions of cytopathic effect induced by western equine encephalitis (WEE) virus on VERO cells *in vitro*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 2001; 65(7): 1645-7. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.65.1645>
5. Wei Q, Zhan Y, Chen B, Xie B, Fang T, Ravishankar S, Jiang Y. Assessment of antioxidant and antidiabetic properties of *Agaricus blazei* Murill extracts. Food Science & Nutrition. 2019; 8(1): 332-39. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/fsn3.1310>
6. Hetland G, Johnson E, Lyberg T, Bernardshaw S, Tryggestad AM, Grinde B. Effects of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill on immunity, infection, and cancer. Scandinavian Journal of Immunology.2008; 68(4): 363-70. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2011/157015>
7. Huang K, El-Seedi HR, Xu B. Critical review on chemical compositions and health-promoting effects of mushroom *Agaricus blazei* Murill. Current Research in Food Science. 2022; 5(5): 2190-2203. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.crf.2022.10.029>
8. Bukowski K, Kciuk M, Kontek R. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. International Journal of Molecular Sciences. 2020; 21(9): 3233.Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21093233>
9. Ahn WS, Kim DJ, Chae GT, Lee JM, Bae SM, Sin JI, Kim YW, Namkoong SE, Lee IP. Natural killer cell activity and quality of life were improved by consumption of a mushroom extract, *Agaricus blazei* Murill Kyowa, in gynecological cancer patients undergoing chemotherapy International Journal of Gynecological Cancer. 2004; 14(4): 589-94. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1048-891X.2004.14403.x>
10. Kabel AM, Omar MS, Balaha MF, Borg HM. Effect of metformin and adriamycin on transplantable tumor model. Tissue Cell. 2015; 47(5): 498-505.Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tice.2015.07.003>
11. Verçosa Júnior D, Ferraz VP, Duarte ER, Oliveira NJF, Cassali GD, Soto-Blanco B et al. Effects of different extracts of the mushroom *Agaricus blazei* Murill on the hematologic profile of mice with Ehrlich tumor. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2015; 67(3): 679-88. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-7595>
12. Verçosa Junior D, Oliveira NJF, Duarte ER, Bastos GA, Soares ACM, Cassali GD, Melo MM.Serum hepatic biochemistry and electrophoretic protein profile of healthy and Ehrlich tumor-bearing mice treated with extracts of *Agaricus blazei* Murill. Semina: Ciências Agrárias. 2016; 37: 763-72. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n2p763>
13. Luna LG. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd ed. New York: Mac Graw Hill, 1996, 258 p.
14. Alves VA, Bacchi CE, Vassalo J. Manual de Imuno-histoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia,

1999, 270 p.

15. Sampaio IBM. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998, 221 p.

16. Al-Dbass AM, Al- Daihan SK, Bhat RS. *Agaricus blazei* Murill as an efficient hepatoprotective and antioxidant agent against CCl₄-induced liver injury in rats. Saudi Journal of Biological Sciences. 2012;19(3): 303-309. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.03.004>

17. Ribeiro AFC, Telles TC, Ferraz VP, Souza-Fagundes EM, Cassali GD, Carvalho AT, Melo MM. Effect of *Arrabidaea chica* extracts on the Ehrlich solid tumor development. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 2012; 22(2): 364-373. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000225>

18. Ali H, Hasi RY, Islam M, Haque MS, Alkhanani MF, Almalki AH, Haque S, Sayyed RZ, Yeasmin T. Antioxidant, cytotoxic and apoptotic activities of the rhizome of Zingiber zerumbet Linn. in Ehrlich ascites carcinoma bearing Swiss albino mice. Scientific Reports. 2022; 15;12(1): 12150. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-022-15498-8>

19. da Silva Campelo M, Neto JFC, Lima ABN, das Chagas Neto FC, da Costa Gonzaga ML, de Aguiar Soares S, Leal A M, Ribeiro MENP, Ricardo NMS. Polysaccharides and extracts from *Agaricus brasiliensis* Murill - A comprehensive review. International Journal of Biological Macromolecules. 2021; 31(183):1697-1714. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.112>

20. Stefanello FS, Cavalheiro CP, Ludtke FL, Silva MS da, Milani LIG, Kubota LH. Efeito da extração de compostos fenólicos sobre a atividade antioxidante e antibacteriana *in vitro* de cogumelo-do-sol. Arquivos do Instituto Biológico. 2016; 83:1-7, e0522014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657000522014>

21. Park YK, Ikegaki M, Alencar M, Aguiar CL. Determinação da concentração de b-glucano em cogumelo *Agaricus blazei* Murill por método enzimático. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2003; 23(3): 312-16. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612003000300003>

22. Motta F, Gershwin ME, Selmi C. Mushrooms and immunity. Journal of Autoimmunity. 2021; 117:102576. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102576>

23. Verçosa Júnior D, Melo MM, Cassali GD, Dantas-Barros AM, Silva Junior PGP. Influência de *Agaricus blazei* Murill sobre o tumor sólido de Ehrlich e linfonodos poplíteos de camundongos. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2007; 59(1):150-54. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352007000100025>

24. Martins de Oliveira J, Jordão BQ, Ribeiro LR, Ferreira da Eira A, Mantovani MS. Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murill lineage 99/26) in mammalian cells *in vitro*. Food and Chemical Toxicology. 2002; 40(12): 1775-80. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0278-6915\(02\)00156-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0278-6915(02)00156-4)

25. Verçosa Júnior D, Melo MM, Dantas-Barros AM, Matos AG, Lago, EP. Quadro hematológico e peso do baço de camundongos com Tumor de Ehrlich na forma sólida tratados com *Agaricus blazei*. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2004; 4:32-4. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2004000300013>

26. Korekane H, Nishikawa A, Imamura K. Mechanisms mediating metabolic abnormalities in the livers of Ehrlich ascites tumor-bearing mice. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2003; 412(2): 216-22. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0003-9861\(03\)00041-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0003-9861(03)00041-9)

27. Mukai H, Watanabe T, Masashi A, Katsumata N. An alternative medicine, *Agaricus blazei*, may have induced severe hepatic dysfunction in cancer patients. Japanese Journal of Clinical Oncology. 2006; 36(12): 808-10. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/jjco/hyl108>

28. Verçosa Junior D, Souza-Fagundes EM, Cassali GD, Ribeiro EL, Zani CL, Melo MM. Efeito do miriadenolídeo isolado de *Alomia myriadenia* (Asteraceae) sobre o tumor de Erlich ascítico no camundongo. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2006; 58: 788-98. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352006000500014>

29. Hsu C, Hwang K, Chiang Y, Chou P. The mushroom *Agaricus blazei* Murill extract normalizes liver function in patients with chronic hepatitis B. Journal of Complementary and Integrative Medicine. 2008; 14(3): 299-301. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1089/acm.2006.6344>

30. Sorimachi K, Akimoto K, Koge T. Inhibitory effect of *Agaricus blazei* Murill components on abnormal collagen

fiber formation in human hepatocarcinoma cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2008; 72(2): 621-3. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.70700>

31. Barbisan LF, Miyamoto M, Scolastici C, Salvadori DM, Ribeiro LR, Eira AF, de Camargo JL. Influence of aqueous extract of *Agaricus blazei* on rat liver toxicity induced by different doses of diethylnitrosamine. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002;83(1-2):25-32 Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-8741\(02\)00171-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-8741(02)00171-x)

32. Pinheiro F, Faria RR, de Camargo JL, Spinardi-Barbisan AL, da Eira AF, Barbisan LF. Chemoprevention of preneoplastic liver foci development by dietary mushroom *Agaricus blazei* Murrill in the rat. *Food and Chemical Toxicology*. 2003;41(11):1543-50. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0278-6915\(03\)00171-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0278-6915(03)00171-6)

33. Crawford JJ. Fígado e Vias Biliares. In: Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, Schoen FJ Robins – *Patologia Estrutural e Funcional*. 5th ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA;1996. p.743-805.

34. Faria A, Lopes ER, Pereira FEL, HIAL V. Degenerações II: Alterações regressivas das células, visíveis à microscopia de luz. In: Bogliolo L. *Patologia Geral Básica*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1978. p. 404-412. Portuguese.