

Efeitos do cogumelo *Agaricus silvaticus* no sistema hematopoético e imunológico de ratos com tumor ascítico de Walker 256

Effects of Agaricus silvaticus mushrooms on hematological and immunological systems in rats with ascitic Walker 256 tumor

Efectos del hongo Agaricus silvaticus em el sistema hematopoetico e inmunológico de ratones con tumor ascitico de Walker 256

Maria Rita Garbi Novaes¹

Luiz Carlos Garcez Novaes²

Andresa Lima Melo³

Viviane Lacorte Recôva³

Unitermos

Fungos; neoplasias; anemia

Key words

Fungi; neoplasms; anemia

Unitérminos

Hongos; neoplasias; anemia

Endereço para correspondência:

Maria Rita C. Garbi Novaes

Faculdade de Medicina da ESCS/FEPECS

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

Edifício FEPECS – SMHN – Quadra O3

Conjunto A – Bloco I

CEP 70710-907 – Brasília/DF

E-mail: ritanovaes@ig.com.br

Submissão

18 de dezembro de 2006

Aceito para publicação

13 de março de 2007

¹ Professora do Curso de Medicina da Escola Superior em Ciências da Saúde (ESCS/FEPECS/GDF) Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Secretaria de Saúde do Distrito Federal, Professora associada do Departamento de Nutrição da Universidade de Brasília.

² Pesquisador da Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, Professor do Curso de Medicina-ESCS/FEPECS/GDF.

³ Acadêmicas da Faculdade de Medicina ESCS/FEPECS/SES, Bolsistas do programa PIBIC/CNPq.

Resumo

Suplemento dietético com extrato de *Agaricus silvaticus* vem sendo utilizado como tratamento adjuvante em pacientes com câncer, contribuindo para um melhor prognóstico. O objetivo foi avaliar os efeitos do *A. silvaticus* sobre o sistema hematopoético e imunológico em ratos Wistar com tumor ascítico de Walker 256. O estudo foi do tipo duplo-cego e placebo-controlado, com amostragem aleatória. Ratos machos e jovens ($n = 46$) foram divididos em dois grupos: tratado ($n = 23$) e placebo ($n = 23$). O grupo tratado recebeu 5 mg/kg/dia do extrato aquoso de *A. silvaticus* (Tapirai, SP, Brasil) por gavagem, em duas administrações diárias até o sacrifício (8^o dia). Foram avaliados número de eritrócitos, taxa de hemoglobina e o hematócrito, observando-se um quadro de anemia. Os grupos tratado e placebo apresentaram, respectivamente, valores de eritrócitos de $4,11 \pm 1,2$ e $3,59 \pm 1,9 \times 10^6/\text{mm}^3$, ($p = 0,03$); e hemoglobina de $10,06 \pm 1,6$ g/100 ml e $9,65 \pm 1,6$ g/100 ml, ($p = 0,05$), hematócrito de $22,82 \pm 1,6\%$ e $20,15 \pm 1,5\%$, ($p = 0,02$). A série branca foi comparada entre os grupos tratado e placebo. Verificou-se que o primeiro apresentou níveis mais altos de leucócitos ($10,96 \pm 1,8$ e $7,39 \pm 1,4 \times 10^3/\text{mm}^3$, $p = 0,03$); linfócitos ($2,46 \pm 0,7$ e $1,54 \pm 0,9 \times 10^3/\text{mm}^3$, $p = 0,03$), e neutrófilos ($1,73 \pm 1,2$ e $1,3 \pm 0,5 \times 10^3/\text{mm}^3$, $p = 0,03$). Os resultados sugerem que a administração do extrato de *A. silvaticus* ocasionou efeitos benéficos nos sistemas hematopoético e imunológico em ratos com tumor ascítico de Walker 256.

Abstract

Dietary supplementation with *Agaricus silvaticus* extract has been used for the adjuvant treatment of cancer patients with improvements in prognosis. We evaluated the effects of the administration of *A. silvaticus* extract on hematological and immunological systems of ascitic Walker 256 tumors inoculated in Wistar rats. The experiment is a double-blind, placebo-controlled with random sampling. Male young rats ($n = 26$) were divided in two groups experimental ($n = 23$) and placebo ($n = 23$). The experimental group received 50 mg/kg/day of *A. silvaticus* (Tapirai, SP, Brazil) water extract by gavages, in two daily administrations, until their death (8th day). The red blood cells, hemoglobin and hematocrit were analyzed, the results on both groups presented anemia. The experimental group presented erythrocyte 4.11 ± 1.2 against $3.59 \pm 1.9 \times 10^6/\text{mm}^3$ ($p = 0.03$); hematocrit of $22.82 \pm 1.6\%$ against $20.15 \pm 1.5\%$, ($p = 0.02$) and hemoglobin of 10.06 ± 1.6 g/100 ml against 9.65 ± 1.6 g/100 ml, ($p = 0.05$). When compared to the placebo group, the white blood cells in the experimental group showed higher levels of leukocytes (10.96 ± 1.8 against $7.39 \pm 1.4 \times 10^3/\text{mm}^3$, $p = 0.03$); lymphocytes (2.46 ± 0.7 against $1.54 \pm 0.9 \times 10^3/\text{mm}^3$, $p = 0.03$) and neutrophils (1.73 ± 1.2 against $1.3 \pm 0.5 \times 10^3/\text{mm}^3$, $p = 0.03$). The findings suggest that the administration of *A. silvaticus* extract improved effect benefit on blood cells and immunological system in rats with ascitic Walker 256 tumor.

Resumen

El suplemento dietético con extracto de *Agaricus silvaticus* es usado como tratamiento adyuvante en enfermos con cáncer, contribuyendo para un mejor pronóstico. El objetivo fue evaluar los efectos del *A. silvaticus* sobre el sistema hematopoetico e inmunológico en ratones Wistar con tumor ascitico de Walter 256. El estudio fue concebido doble-cego y placebo-controlado,

con amostragem aleatória. Ratos machos y jóvenes (n = 46) fueron divididos en dos grupos: tratado (n = 23) y placebo (n = 23). El grupo tratado recibió 5 mg/kg/día del extracto acuoso de *A. silvaticus* (Tapiraí, São Paulo) por gavage, en dos administraciones diarias hasta el sacrificio (8º día). Resultados. Fueron evaluados número de eritrocitos, tasa de hemoglobina y el hematocrito, observándose un cuadro de anemia. Los grupos: tratado y placebo presentaron, respectivamente, valores de eritrocitos de $4,11 \pm 1,2$ e $3,59 \pm 1,9 \times 10^6/\text{mm}^3$ ($p = 0,03$); y hemoglobina de $10,06 \pm 1,6$ g/100 ml y $9,65 \pm 1,6$ g/100 ml, ($p = 0,05$), hematocrito de $22,82 \pm 1,6\%$ e $20,15 \pm 1,5\%$, ($p = 0,02$). La serie blanca fue comparada entre los grupos tratados y placebo. Se verificó que el primero grupo presentó niveles más altos de leucocitos, linfocitos y neutrófilos. Los resultados sugieren que la administración del extracto de *A. silvaticus* ocasionó efectos benéficos en los sistemas hematopoético e inmunológico en ratones con tumor ascítico de Walter 256.

Introdução

O *Agaricus silvaticus*, um fungo da ordem *Agaricaceae* usado na composição de suplemento dietético em pacientes com câncer, apresenta possíveis efeitos inibidores no crescimento tumoral, regressão do tumor e estimulação dos sistemas imunitário e hematológico, além de efeitos benéficos na melhoria da qualidade de vida e no prognóstico de pacientes¹.

Estudos acerca dos mecanismos de ação de substâncias, cuja presença já foi estabelecida em cogumelos *Agaricaceae*, demonstraram importância na resposta imunitária e hematológica no câncer²⁻⁴. Entre essas substâncias estão: 1-3-beta-D-glucana⁵, ergosterol⁶, lecitina⁶, terpenóides⁷, proteíno-glucana⁸ e os aminoácidos imunomoduladores, como a arginina⁹⁻¹³.

Foi demonstrado que a 1-3-beta-D-glucana possui efeitos sobre o sistema imunitário, tais como: aumento da imunidade celular e humoral, aumento do número, tamanho, atividade fagocitária, aumento na aderência e quimiotaxia dos macrófagos; aumento do número de monócitos circulantes, aumento da produção de antígenos e atividade citolítica sobre células tumorais humanas *in vitro*^{5,6,8}.

No mecanismo de ação da ativação do sistema imunitário, esta glucana atua como pseudo-antígeno opsonizante, facilitando a fagocitose do complexo antigênico por macrófagos que estão associados ao setor T (Timo-dependente) do sistema imunológico, mediado por células, constituído por linfócitos supressores e auxiliares; e ao setor B (Bursa-dependente), constituído por plasmócitos, que se encarregam de formar anticorpos⁵. As células Th-1, que desencadeiam o setor mediado por células T, e estimulam os linfócitos T a elaborarem isoleucinas, são ativadas pela Beta-glucana. Estas isoleucinas estimulam células NK (*Natural Killer*), responsáveis pela destruição das células neoplásicas. Paralelamente, os linfócitos CD-8 adquirem alta citotoxicidade específica (CTL), por ação da beta-glucana opsonizada com antígeno, contribuindo ao processo de destruição celular do tumor⁵.

Outras substâncias presentes em *Agaricaceae*, com efeitos anti-neoplásicos, entre elas, o ergosterol, o ácido oléico contido na lecitina, os ácidos ganodéricos (triterpenos), que inibem a neovascularização induzida pelo tumor; as proteíno-glucanas, que atuam melhor que as glucanas isoladas, como epitopos em ação opsonizante na fagocitose e os aminoácidos

imunomoduladores, como arginina, que estimula a produção de óxido nítrico, hidroxiprolina, citocinas e poliaminas, com importância nos processos de caquexia⁷.

O tumor de Walker 256 (W256 A tumor) vem sendo bastante utilizado como modelo experimental de câncer, especialmente por provocar alterações fisiológicas características em ratos de laboratório, entre elas anemia, leucopenia e plaquetopenia, atribuídas a fatores hemolíticos e a caquexia¹⁴.

Neste estudo foram avaliados os efeitos do extrato de *A. silvaticus* no sistema hematopoético de ratos Wistar com W256 A tumor, na forma ascítica.

Material e métodos

Desenho experimental

O estudo foi do tipo duplo-cego e placebo-controlado, com amostragem aleatória. Ratos machos e jovens (n = 46) foram divididos em dois grupos: tratado (n = 23) e placebo (n = 23). O grupo tratado recebeu 5 mg/kg/dia do extrato aquoso de *A. silvaticus* (Tapiraí, SP, Brasil) por gavagem esofágica, em duas administrações diárias (12 em 12 horas) até o sacrifício (8º dia). O grupo placebo recebeu água pura por procedimento de gavagem. Todos os animais foram mantidos sob idênticas condições ambientais e de temperatura, a luz artificial durante ciclos alternados de 12 horas por dia, com água filtrada e ração Labina (Purina, Brasil) *ad libitum*.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Estudos Animais da Universidade de Brasília e foi seguido o protocolo do *General United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research*¹⁵.

Extrato com *Agaricus silvaticus*

A solução utilizada no grupo tratado foi acrescida de extrato de cogumelos comestíveis *A. silvaticus* originário da cidade de Piedade, São Paulo, Brasil. Realizou-se extração a quente, com cogumelos frescos, por procedimento farmacotécnico. A análise da composição da solução final de *A. silvaticus* foi realizada no *Japan Food Research Laboratories Center* e revelou a presença de carboidratos: 18,51 g/100 g; lipídeos: 0,04 g/100 g; ergosterol: 624 mg/100 g; proteínas: 4,99 g/100 g; aminoácidos:

(arginina: 1,14%; lisina: 1,23%; histidina: 0,51%; fenilalanina: 0,92%; tirosina: 0,67%; leucina: 1,43%; metionina: 0,32%; valina: 1,03%; alanina: 1,28%; glicina: 0,94%; prolina: 0,95%; ácido glutâmico: 3,93%; serina: 0,96%; treonina: 0,96%; ácido aspártico: 1,81%; triptofano: 0,32%; cisteína: 0,25%), beta-glucana e micronutrientes em baixas quantidades.

Inoculação do tumor

Foram utilizadas células cancerosas da linhagem A do Tumor de Walker 256 (W256 A tumor), para indução de crescimento tumoral ascítico, por inoculação peritoneal única, em dose contendo aproximadamente 4×10^6 células. A origem da linhagem A das células do Tumor de Walker 256 é o *National Cancer Institute Bank*, Cambridge (Massachusetts, EUA), que foi obtida no Departamento de Biofísica na Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

Análise Hematológica

No 8º dia do estudo foram colhidas amostras de sangue dos ratos, por punção cardíaca, na quantidade de 0,3 ml, conservadas com 0,001 ml de EDTA a 10%. Após este procedimento, os animais foram sacrificados. O hemograma foi

Tabela 1 - Resultados série vermelha.

Ratos com Tumor de Walker 256 (W256 A tumor)			
Exames	Dieta placebo (n = 23)	Dieta <i>A. silvaticus</i> (n = 23)	Significância estatística
Hematócrito (%)	20,05 ± 1,5	22,82 ± 1,6	p = 0,03
Hemoglobina (g/100 ml)	9,35 ± 1,6	10,06 ± 1,6	p = 0,05
Eritrócito ($10^6/\text{mm}^3$)	3,29 ± 0,9	4,11 ± 0,2	p = 0,02
VCM ^(a) (μm^3)	55,21	55,44	p = 0,48
HCM ^(b) (g)	19,6	24,4	p = 0,14
CHCM ^(c) (%)	10,78	10,9	p = 0,47

Testes aplicados: ANOVA e t de Student. Os valores representam a média ± desvio padrão (n = 23 cada grupo). ^(a) VCM - volume corpuscular médio do eritrócito; ^(b) HCM - hemoglobina corpuscular média; ^(c) CHCM - concentração da hemoglobina corpuscular média.

Tabela 2 - Resultados série branca.

Ratos com Tumor de Walker 256			
Exames	Dieta placebo (n = 23)	Dieta <i>A. silvaticus</i> (n = 23)	Significância estatística
Leucócito ($10^3/\text{mm}^3$)	7,39 ± 1,4	10,96 ± 1,8	p = 0,03
Neutrófilo ($10^3/\text{mm}^3$)	1,3 ± 0,5	1,73 ± 1,2	p = 0,03
Linfócito ($10^3/\text{mm}^3$)	1,54 ± 0,9	2,46 ± 0,7	p = 0,03
Monócito ($10^3/\text{mm}^3$)	0,90 ± 0,66	1,46 ± 0,85	–
Eosinófilo ($10^3/\text{mm}^3$)	0,10 ± 0,06	0,20 ± 0,20	–
Basófilo ($10^3/\text{mm}^3$)	4,35 ± 2,15	3,13 ± 2,15	–

Testes aplicados: ANOVA e t de Student. Os valores representam a média ± desvio padrão (n = 23 cada grupo).

realizado, com amostras em duplicata, imediatamente após a coleta, utilizando o método de impedância em aparelho automatizado (CELL-DYN 3200). Os valores utilizados como referência foram: eritrócitos $8,4 \pm 6 \times 10^6/\text{mm}^3$, hemoglobina $14,00 \pm 2,0 \text{ g}/100 \text{ ml}$, hematócrito $44 \pm 4\%$, volume corpuscular médio do eritrócito (VCM) $80\text{-}105 \mu\text{m}^3$, a concentração da hemoglobina corpuscular média (HCM) 27,31 g, concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) 32-36%, plaquetas $340 \times 10^3/\text{mm}^3$, leucócitos $14 \times 10^3/\text{mm}^3$, linfócitos $10,0 \pm 2,0 \times 10^3/\text{mm}^3$ e neutrófilos $3,1 \times 10^3/\text{mm}^3$ ¹⁶.

Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando-se procedimentos de análise de variância (ANOVA) e teste t de Student para a comparação entre os grupos tratado e placebo. O nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$.

Resultados

Série vermelha

Os ratos, de ambos os grupos, apresentaram desenvolvimento do câncer e anemia acentuada. O grupo tratado apresentou eritrócitos de $4,11 \pm 1,2$ contra $3,29 \pm 1,90 \times 10^6/\text{mm}^3$ do grupo placebo, ($p = 0,03$), hemoglobina de $10,06 \pm 2,6 \text{ g}/100 \text{ ml}$ contra $9,35 \pm 2,6 \text{ g}/100 \text{ ml}$ do placebo, ($p = 0,05$) e hematócrito $22,82 \pm 3,6\%$ contra $20,05 \pm 3,5\%$ do placebo, ($p = 0,02$), cujos valores encontram-se descritos na Tabela 1.

Os índices hematimétricos foram os seguintes nos grupos tratado e placebo, respectivamente: volume corpuscular médio do eritrócito (VCM) foi $55,44 \mu\text{m}^3$ e $55,21 \mu\text{m}^3$; concentração da hemoglobina corpuscular média (HCM) foi 24,40 g e 19,60 g; e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foi 10,90% e 19,78% (Tabela 1).

A anemia observada foi hipocrômica e microcítica nos dois grupos, placebo e tratado com *A. silvaticus*. Os índices apresentados pelo grupo tratado foram mais próximos dos valores normais de ratos saudáveis, sugerindo que o metabolismo de ferro sérico e a função medular eritropoética foram beneficiados nos ratos com tumor de 256 Walker tumor tratados com *A. silvaticus*.

Série branca

A leucocitose, com a presença de células mais jovens da linhagem neutrofílica, mielócitos, metamielócitos e neutrófilos bastonetes, foi observada nos dois grupos. O grupo tratado apresentou, entre outros valores, leucócitos de $10,96 \pm 2,8$ contra $7,39 \pm 2,4 \times 10^3/\text{mm}^3$, ($p = 0,03$); linfócitos $2,46 \pm 0,7 \times 10^3/\text{mm}^3$ contra $1,54 \pm 0,9 \times 10^3/\text{mm}^3$, ($p = 0,03$) e neutrófilos $1,73 \pm 1,2$ contra $1,3 \pm 0,5 \times 10^3/\text{mm}^3$, ($p = 0,03$). Os valores de monócitos, eosinófilos e basófilos estão descritos na Tabela 2.

Plaquetas

Houve plaquetopenia em ambos os grupos, sendo mais acentuada no grupo placebo. A diferença entre o grupo tratado com *A. silvaticus* e o grupo placebo foi significativa ($127,25 \pm 1,8$ contra $88,32 \pm 1,9 \times 10^3/\text{mm}^3$; $p = 0,04$). Não foi observado sangramento externo em nenhum dos grupos estudados.

Discussão

A anemia, presente nos dois grupos estudados, é uma complicação comumente observada em portadores de câncer, sendo às vezes o primeiro sintoma detectado¹⁵. Em animais com câncer, pode ser observada uma ineficiência da utilização de nutrientes pelo organismo, além de alterações na ingestão, digestão e absorção dos alimentos, com modificações metabólicas importantes, o que pode contribuir para o estado anêmico. Pode ocorrer alteração primária na membrana plasmática dos eritrócitos, por meio de modificações nos mecanismos de transporte e permeabilidade e/ou secundária à modificações metabólicas, com aumento da fragilidade osmótica, além da presença de fatores de necrose circulantes, acarretando hemólise^{9,14-17}. Em pacientes com câncer em estágio terminal, a anemia está associada a um componente hemolítico ainda não esclarecido, evidenciada pela rápida e intensa destruição dos eritrócitos¹⁰⁻¹¹. Pode haver retenção de ferro pelo sistema retículo endotelial (SRE), trato gastrointestinal e fígado, acarretando um efeito inibitório na maturação dos precursores eritrocitários. A produção de eritropoetina e a resposta da medula óssea estão diminuídas na anemia por câncer^{9,14}.

Observou-se que os valores de eritrócitos do grupo de ratos tratados com extrato de *A. silvaticus* foi superior ao grupo placebo, o que demonstra uma tendência para a diminuição da anemia nestes animais. Possivelmente houve interferência de componentes do *A. silvaticus*, nos mecanismos moleculares que provocam sérias alterações fisiológicas na fase final do câncer.

Foi sugerido que a ativação do sistema imunitário e a ocorrência de inflamação ocorrem mediante o aumento dos

níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como Interleucina 1 e 6 (IL-1 e IL-6), Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) e Interferon (INF- δ). Trabalhos como de Sorimachi et al.², demonstraram que extratos aquosos de *Agaricus sp* é capaz de induzir secreção de TNF- α pelos macrófagos derivados de medula óssea de camundongos e indução da produção de citocinas².

A leucopenia observada no estudo, especialmente a linfopenia e a neutropenia, decorrem tanto da caquexia quanto das alterações metabólicas provocadas pelo tumor. Ela está associada ao aumento do risco de infecções graves. As citocinas originárias no tumor e/ou no hospedeiro, Interleucina 1 (IL-1), Interleucina 2 (IL-2), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), Interferon (INF- α e INF- δ), foram menos efetivas na função de estimular e liberar para a circulação sistêmica, as células sanguíneas da série branca, nos ratos do grupo placebo que no grupo tratado com *A. silvaticus*. Os resultados demonstram que o tratamento com extrato de *A. silvaticus* provocou potencial melhora nos níveis de células leucocitárias dos ratos com W256 Tumor.

A trombocitopenia faz parte do quadro geral de caquexia, alterações metabólicas e citolíticas do W256 Tumor. A trombocitopenia observada não foi suficiente para provocar sangramentos externos. As evidências atuais sugerem que as incidências de hemorragias graves em pacientes com câncer só ocorrem, em quantidades significativas, com valores de plaquetas abaixo de $10 \times 10^3/\text{mm}^3$ ¹⁴.

Conclusão

Os índices hematimétricos demonstraram que a reação fisiológica ao tumor de Walker 256 foi melhor no grupo tratado com *A. silvaticus* demonstrando possível efeito farmacológico.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPQ, pelo apoio financeiro aos bolsistas do PIBIC/CNPQ-2005 e ao projeto.

Referências bibliográficas

1. Novaes MRCG, Novaes LCG, Melo A, Recova V. Effects of the administration of *Agaricus sylvaticus* on the hematological and immunological functions of rats with Walker. *Fundam Clin Pharmacol* 2004;18(1):125.
2. Sorimachi K, Akimoto K, Ikehara Y, Inafuku K, Okubo A, Yamazaki S. Secretion of TNF alfa, IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei* Murill fraction in vitro. *Cell Struct Funct* 2001;26(2):103-8.
3. Hayes WA, Wright SH. Edible mushrooms. *Economic microbiology: microbial biomass*. Academic Press 1979;4(6):141-76.
4. Jong SC, Birmingham JM, Pai SH. Immuno-modulatory substances of fungal origin. *J Immunopharmacol* 1991;XI:3-9.
5. Takaku T, Kimura Y, Okuda H. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. *J Nutr* 2001;131(5):1409-13.
6. Jenneman R, Bauer BL, Bertalanffy H, Selmer T, Wiegandt H.. Basidiolipids from *Agaricus* are novel immune adjuvant. *Immunobiology* 1999;200(2):277-89.
7. Kimura Y, Taniguchi M, Baba K. Antitumor and antimetastatic effects on liver of triterpenoid fractions of *Ganoderma lucidum*: mechanism of action and isolation of an active substance. *Anticancer Res* 2002;22(6A):3309-18.
8. Takeshi T, Yoshiyuki K, Hiromichi O. Isolation of an Antitumor Compound from *Agaricus blazei* Murill and its Mechanism of Action. *J Nutr* 2001;131:1409-13.

9. Novaes MRCG, Lima LAM, Novaes LCG, Souza MV. Metabolic and hematological effects of dietary supplementation with arginine on rats bearing ascitic Walker 256 Tumor. *Ann Nutr Metab* 2004;48(6):404-8.
10. Novaes MRCG, Lima LAM, Souza MV. Maillard's reaction in parenteral solutions supplemented with arginine. *Archi Latinoam Nutr* 2001;51(3):265-8.
11. Novaes MRCG, Lima LAM, Ribeiro JEG, Magalhães AV, Sousa MV, Morhy L. Efeitos farmacológicos da suplementação dietética com arginina em ratos com tumor sólido de Walker 256. *Arch Latinoam Nutr* 2000;50(3):230-6.
12. Novaes MRCG, Lima LAM, Souza MV. Effects of the supplement using arginine 6% into experimental tumor. *J Metab Nutr* 2003;7(2):52-6.
13. Novaes MRCG, Pantaleão C. Pharmacological effects of nutritional supplementation with arginine in gastrointestinal cancer patients. *Braz J Clin Nutr* 2004;19(1):26-314.
14. Vido AA, Cavalcanti TC, Guimarães F, Vieira-Matos AN, Rettori O. The hemolytic component of cancer anemias: effects of osmotic and metabolic stress on the erythrocytes of rats bearing multifocal inoculations of the Walker 256 tumor. *Braz J Med Biol Res* 2003;33:815-22.
15. United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research (UKCCR). Guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia. *Lab Anim* 1988;22:195-201.
16. Novaes MRCG, Novaes LCG, Chaer G, Recova, VL, Melo A. Evaluation of acute toxicity of edible mushroom *Agaricus silvaticus* on rats. *Clin Nutr* 2005;24(4):672-73.
17. Shiao MS. Natural products of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: occurrence, biological activities, and pharmacological functions. *Chem Rec* 2003;3(3):172-80.
18. Mizuno M, Morimoto M, Minato K, Tsuchida H. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998;62(3):434-7.
19. Takaku T, Kimura Y, Okuda H. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* *Murill* and its mechanism of action. *J Nutr* 2001;131(5):1409-13.
20. Mizuno T, Hagiwara T, Nakamura T, Ito H, Shimura K, Sumiya T, Asakura A. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "Himematsutake", fruiting body of *Agaricus blazei* *Murill*. *Japan Biological Abstracts*, 1994;98(7):14.21.