



Efeitos antineoplásicos e necrosantes de novos extratos de cogumelo no sarcoma do camundongo (S. 37). Observações clínicas e experimentais com seu emprêgo nas neoplasias humanas

(Memória apresentada ao V.º Congresso Internacional do Câncer - Paris, 1950)

Por

ANTÔNIO CANTERO (Instituto de Câncer de Montreal), SÉRGIO DE BARROS AZEVEDO (Serviço Nacional de Câncer, Brasil-Rio de Janeiro) e A. A. DE ARÊA LEÃO (Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro).

Nestes últimos anos, considerável literatura tem aparecido sobre a ação necrozante de certos produtos bacterianos sobre os tecidos neoplásicos.

Na clínica, muita vez, observam-se modificações na evolução de alguns tipos de tumor, decorrentes de infecções ocasionais. As primeiras observações a respeito foram feitas por *Coley*, que posteriormente criou um método de tratamento pelo emprêgo de vacinas à base de "toxinas mistas". Apesar de possuir ação lisante sobre as células malignas, os produtos bacterianos apresentam o inconveniente de serem tóxicos para o organismo, o que determinou em seguida o seu desuso.

Recentemente, por fracionamento químico, foi possível separar o agente ativo dos componentes tóxicos inativos presentes nas preparações bacterianas e reduzir a sua toxidês de modo a permitir o respectivo emprêgo na quimioterapia do câncer.

Shear e seus colaboradores, mostraram que as injeções intraperitoniais ou intravenosas de polissacaride do "bacillus prodigiosus", provocam hemorragias dentro de poucas horas, não

só nos sarcomas primitivos do rato como nos enxertados.

Quando as injeções são feitas no tecido normal, não se observam hemorragias.

Aumentando-se a dose para 0,01 mgr., que é a mínima dose letal, verifica-se maior dano no tumor, sob a ação do polissacaride. A necrose segue-se paralela e rapidamente à hemorragia.

No *Instituto de Câncer de Montreal*, investigações têm sido levadas a efeito no sentido de reduzir o choque que se segue à injeção de polissacarides e determinar se o choque acha-se ligado à própria substância ou é secundário à reabsorção de toxinas liberadas pela destruição das células malignas.

MATERIAL E MÉTODOS

Camundongos brancos suíços (8 a 10 semanas de idade), recebem no flanco direito, implantes de S.37, obtidos do *Instituto Nacional de Câncer* em Washington. Os implantes são levados a efeito sob condições asséticas. O tecido é triturado com solução salina nor-

mal, aspirado em seringa, à qual se adapta um trocar n.º 14, sendo a injeção feita no flanco direito. Os enxertos dão 100% de péga, quando realizados sob condições "ótima" de assepsia. Em 10 dias, o tamanho médio dos implantes regula com o de uma ervilha. Após 20 dias, o camundongo mostra sinais de caquexia. O tumor apresenta-se em estado de degeneração e de necrose, morrendo o animal em seguida.

O estudo dos polissacarídeos e substâncias citotóxicas foi procedido somente até o 10.º dia de implante dos sarcomas.

A via intraperitoneal foi usada em todos os experimentos.

Sarcomas do camundongo de 10 dias de enxerto, foram divididos em três grupos, de 100 animais cada.

O primeiro grupo, recebeu 1 cc. de polissacarídeo fornecido pelo Dr. Shear do Instituto Nacional de Câncer, em Washington, do estoque n.º P.10. A dose foi estandardizada para 50 microgramas por 1 cc.

O segundo grupo, recebeu 1 cc. por dia, durante 15 dias de extrato bruto combinado de *Penicillium Notatum* e *Aspergillus flavus* e outra de *Pestalozzi*, preparados pelo Dr. Arêa Leão, do Instituto Oswaldo Cruz. O cogumelo gênero *Pestalozzi* foi fornecido pelo Dr. J. Meyer do Instituto Biológico de São Paulo, o qual havia verificado "in vitro", ação antineoplásica do referido cogumelo.

O terceiro grupo, recebeu várias doses de drogas citotóxicas, tais como *uretana*, *colchichina* e os efeitos sobre os tumores foram comparados com os resultantes da ação dos polissacarídeos e extratos de cogumelos. Os animais

eram sacrificados em intervalos de 8, 12, 24, 48 e 72 horas e 15 dias seguintes à última injeção (isto é, experimentos com a duração de 25 dias para cada rato) para exames citopatológicos, assim como investigação bioquímica do tumor, do fígado e das glândulas suprarrenais.

RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Quando 500 y/g de polissacarídeo (P. 10) eram administrados a um total de 100 camundongos, resultava daí uma mortalidade de 84%, dentro de 96 horas; com injeções de 500 y/gm. de extrato de cogumelo a percentagem de mortes era de 31%, nas mesmas 96 horas.

O extrato de cogumelo, proveniente do Instituto Oswaldo Cruz, ocasionava reação anafilática, tanto no camundongo normal como no portador de sarcoma.

Substâncias anti-histamínicas não conseguiam controlar a reação anafilática, nem antagonizar a ação necrotizante do extrato. Assim, de acordo com os nossos resultados, não parece que a causa de necrose das células tumorosas, seja decorrente de uma reação anafilática.

Não obstante, de acordo com os trabalhos de Irene Diller e colaboradores, que mostraram nítidas lesões histológicas na glândula suprarrenal de ratos portadores de sarcoma, injetados com polissacarídeo de *Serratia Marcescens*, pensamos ser de importância o estudo dessas alterações após as injeções de extrato de cogumelo.

Um grupo de camundongos recebeu com a 1.ª dose de 1 cc. intraperitoneal



de extrato de cogumelos, 0,1 cc. de acetato de decorticosterona (Percorten Ciba) e 0,1 cc. em cada dose subsequente, com 1 hora de intervalo, num total de 0,5 cc.

O aspecto da glândula suprarrenal, sob estas condições experimentais, apresenta-se quase normal. A destruição das células malignas processa-se, entretanto, mais lentamente, em 24 horas, ao passo que somente com as injeções isoladas de extrato de cogumelo ou polissacarídeo, o efeito citotóxico ocorre dentro de 6 a 8 horas.

CITOPATOLOGIA E ESTUDOS BIOQUÍMICOS

Estudos citopatológicos mostram que 24 horas após a injeção de extrato de cogumelos, os núcleos das células são corados mais fracamente. Nos últimos períodos de lesão, as massas de cromatina apresentam-se relativamente grandes, conservando-se, todavia, dentro dos limites da membrana nuclear. É este um aspecto bem diferente da necrose espontânea, pois nesta observam-se núcleos em todos os estágios de degeneração, incluindo fragmentação. Mais tarde (48 horas) nota-se um maior grau de picnose com alterações na coloração dos núcleos. Essas modificações se fazem sentir tanto na periferia como no centro do tumor. O citoplasma é granuloso, muita vez, vacuolado, estroma intracelular aumentado, notando-se algumas vezes, aparecimento de células gigantes irregulares e núcleos gigantes. Quando o extrato é injetado por via sub-cutânea, a hemorragia do tumor é bem menor. A necrose caminha paralelamente ou surge logo em seguida à hemorragia provocada. O

extrato cortical, se bem que reduza o efeito tóxico, não parece influenciar a ação necrosante do extrato de cogumelo.

A hemorragia e a destruição endotelial são similares às observadas com a colchicina.

De modo semelhante à "Serratia Marcescens", o extrato de cogumelo tem um efeito nocivo sobre as zonas germinativas do núcleo. Nos tecidos normais, como nos tumores, as células em divisão são as mais afetadas e torna-se claro que estas substâncias orgânicas inibem a divisão celular, ao mesmo tempo que ocasionam hemorragia no tumor.

ATIVIDADE DA CATALASE

O estudo comparativo da atividade da catalase no sarcoma 37 do camundongo, em animais recebendo polissacarídeo ou extrato de cogumelo, revela que se aproximam dos obtidos pela remoção total do tumor, isto é, a baixa da atividade da catalase no fígado ou no Sarcoma do camundongo tende a aumentar até o nível normal, no fígado do camundongo, quando se completa a autólise ou necrose do tumor.

ATIVIDADE DA CATALASE K 104

Média normal de catalase do fígado do camundongo normal.	Kat.F. 5937
Sarcoma em crescimento.	Kat.F. 1956
Sob tratamento com extrato de cogumelo	Kat.F. 5001
Sob tratamento com uretana.	Kat.F. 3677
Sob tratamento com colchicina.	Kat.F. 3957

Êstes resultados mostram claramente que tanto os polissacarídeos, como os extratos de cogumelo ou qualquer outra substância citotóxica, quando se mostram eficazes na destruição completa do tumor, fazem com que a catalase do fígado retorne às cifras normais.

O teor de ácido ascórbico das suprarrenais e bem assim do tecido tumoral também mostra resultados interessantes.

Uma vez que a ação necrosante podia ser relacionada a um efeito colchicina, como mostra *Boylard*, aconselhável era proceder-se ao estudo do teor de ácido ascórbico do tumor, sob a ação do extrato de cogumelo, assim como verificar a possibilidade de variações do ácido ascórbico na suprarrenal. Necessário se tornava ainda verificar se tais modificações quantitativas corriam à conta de choque anafilático ou eram consequência da destruição suprarrenal sob o efeito da substância citotóxica.

Ácido ascórbico da suprarrenal (em y/g por tecido fresco) em camundongos brancos suíços normais:
 5.500 — 550 y/g.
 40 — Sarcoma 37 camundongo
 4.450 — 500 y/g.
 40 — Sarcoma 37 (com extrato de cogumelo) — 2.750.
 40 — Sarcoma 37 (com uretana) 2.155.

Efeito sobre o consumo de oxigênio

VALORES QO^2

É importante assinalar que não parece haver inibição da glicólise em seguida à injeção de extratos de cogu-

melo do tipo *Aspergillus* e *Pestalozzi*. O sarcoma 37 retém um alto teor de ácido ascórbico e glicólise anaeróbia. O ácido láctico medido manométricamente no S. 31 foi de 95 a 107 em microlitros de QO^2 libertado em 1 h., comparado a 93 — 104 microlitros de QO^2 , após 0,004 M de uma injeção de uretana, o que indica não haver inibição de glicólise.

APLICAÇÃO CLÍNICA

O emprêgo de extratos brutos de cogumelo, no tratamento do câncer do homem, é baseado na demonstração de uma substância secretada por cogumelos do gênero *Penicilium*, *Aspergillus* e talvez outros, possuindo uma definida ação anti-neoplásica. *Cormann* e *Lewis*, em 1944 e mais tarde, *J. Ricardo Meyer*, mostraram que a penicilina impura, tinha "in vitro" uma propriedade anti-neoplásica, absolutamente distinta do efeito antibiótico da penicilina.

Dobroeskaia - Zavodskaia, notaram em animais, regressão de carcinomas mamários e sarcoma resultante do 1, 2, 5, 6 dibenzantraceno, após injeção de penicilina bruta a qual ocasiona citólise e liquefação dos tumores.

J. Brown e *Alice Boyle* verificaram ação similar da penicilina bruta no "crown gall" (câncer vegetal) ocasionado pelo "bacillus tumefaciens".

Apoiado nessas experiências "in vitro", pela primeira vez, lançamos mão de preparados de extratos brutos de cogumelo no tratamento do câncer humano, obtendo um extrato bem tolerado e livre de toxidez, através da cooperação do Dr. Arêa Leão, do Instituto Oswaldo Cruz.



Nós usamos extratos de *Penicilium Notatum*, *Aspergillus Flavus* e recentemente um extrato preparado com amostras de um cogumelo do gênero *Pestalozzi*, gentilmente cedido por *J. Ricardo Meyer*, o qual já tinha verificado "in vitro", seu efeito nocivo sobre as células malignas.

Esses extratos foram administrados por via parenteral e per-os. A parte clínica, idealizada e posta em prática por um de nós, (*Sérgio Azevedo*) foi realizada no Asilo de cancerosos incuráveis anexo ao *Serviço Nacional de Câncer* do Brasil, sob a direção do *Prof. Mário Kroeff*.

De junho de 1947 a dezembro de 1949 foram tratados 212 doentes. 38, logo após as primeiras injeções apresentaram *notáveis melhoras gerais, alívio das dores e sensações de bem-estar*.

Em 100 casos, o tratamento foi considerado insuficiente, pois os doentes haviam sido admitidos quase "in extremis", tendo falecido 8-12 dias após sua admissão.

Os 112 casos que constituem a base desta comunicação, foram assim distribuídos :

<i>Pele</i>	18 casos — 6
c/sobrevida de 1 ano, após a 1. ^a injeção	
<i>Cavidade bucal</i>	23 casos — 4
c/sobrevida de 1 ano, após a 1. ^a injeção	
<i>Mama</i>	22 casos — 4
c/sobrevida de 1 ano, após a 1. ^a injeção	
<i>Colo útero</i>	25 casos — 5
c/sobrevida de 1 ano, após a 1. ^a injeção	
<i>Estômago</i>	15 casos — 4
c/sobrevida de 1 ano, após a 1. ^a injeção	
<i>Hodgkin</i>	5 casos — 3

c/sobrevida de 1 ano, após a 1.^a injeção
Reticulosarcoma 4 casos — 3
 c/sobrevida de 1 ano, após a 1.^a injeção

RESUMO E CONCLUSÕES

Foi possível pela primeira vez preparar extratos de certos cogumelos que quando injetados em tumores de camondongo, confirmam a ação antineoplásica dos extratos tanto "in vitro" como "in vivo".

Quando usados em casos inoperáveis, os extratos revelam resultados promissores.

Os extratos podem ser administrados por via parenteral, ou por via oral, não sendo destruídos pelo suco gástrico. São bem tolerados e não ocasionam reações locais, gerais ou alérgicas. Do ponto de vista terapêutico, os extratos possuem nítido efeito paliativo sobre as dores, sobre as infecções de tumores ulcerados e finalmente sobre o estado geral que melhora extraordinariamente em alguns casos.

EM RESUMO

a) Notável ação analgésica em 80% dos casos sobre as dores resultantes de metástases ósseas que muita vez não são aliviadas, nem pela radioterapia, nem pelas injeções de álcool;

b) efeito antibiótico notado em 60% dos casos com infecção secundária associada;

c) sensação de bem-estar e melhora geral no estado de saúde em cerca de 65% dos casos.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — CORMAN, J. — Survival of normal cells in penicillin solution lethal to malignant cells. *Science* — 99-247, 1944.
- 2 — LEWIS, M. B. — The failure of purified penicillin to retard the growth of grafts of sarcoma in mice. *Science* — 100-314-15, 1944.
- 3 — MEYER, J. R. — Indícios de uma substancia antineoplasica formada nos liquidos de cultura do penicillium notatum. *Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo* — 16.307-314, 1945.
- 4 — DOBROVOESKAIA E. ZAVODSKAIA — *Bulletin de l'Association Française pour l'etude du Cancer*. Ano 37, Tomo 33, N. 3, 1946, p. 192.
- 5 — BROWN J. E. e BOYLE, ALICE — *Phytopathology* — Vol. 35 — Ano 1945, p. 52.
- 6 — AZEVEDO SÉRGIO — Em tôrno da ação terapêutica dos extratos de certos cogumelos no câncer humano. *Revista Brasileira de Cancerologia* — Vol 2 — Março-Dezembro 48, N. 3 — Brasil.
- 7 — BURK D. e DUBUY, et AL — Metabolic inhibitions of tumors and other cells by various anti-biotics and Cobalt, *Acta cont. Cancr.* Vol. VI, p. 378, 1949.