

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI – MUTAGÊNICA DO EXTRATO DE AGARICUS BLAZEI MURILL

Adriana de Melo¹; Anelise Carletti Pereira ²; Leonardo Gomes da Rosa³; Nathália Anhesini⁴

Resumo

O interesse nas propriedades medicinais de produtos naturais tem aumentado devido ao seu uso popular na medicina tradicional. A medicina alternativa é frequentemente usada para prevenir ou tratar várias doenças, incluindo o câncer. Entre as terapias alternativas, o uso do chá de cogumelos é uma das práticas mais populares. Dentre as propriedades farmacológicas atribuídas a esses agentes pode-se citar seus efeitos citotóxicos, anti-carcinogênicos, antimutagênicos e antígenotóxicos. Estes compostos podem gerar uma grande quantidade de agentes terapêuticos comerciais contra o câncer em um futuro próximo. Os objetivos do presente estudo foi avaliar os efeitos antimutagênicos de diferentes concentrações (500 mg/Kg, 1000 mg/Kg e 1500 mg/Kg) do extrato de *A. blazei*. Pudemos observar uma aumento dose-dependente dos micronúcleos frente ao extrato testado. Neste sentido, podemos concluir que estes compostos podem gerar uma variedade de agentes terapêuticos comerciais contra o câncer em um futuro próximo.

Palavras-Chave: Cogumelo do sol; micronúcleos; linfócitos; antimutagênicos.

Abstract

Interest in the medicinal properties of natural products has increased because of its popular use in traditional medicine. Alternative medicine is often used to campaign for diseases, including cancer. Among the alternative therapies, the use of mushroom tea is one of the most popular practices. Among the pharmaceutical entities attributed these agents can be cited with their cytotoxic, anti-carcinogenic, antimutagenic and antigenotoxic antibodies. These compounds can generate a large amount of therapeutic agents to fight cancer in the near future. The objectives of the present study were to evaluate the antimicrobial effects of different species (500 mg / kg, 1,000 mg / kg and 1,500 mg / kg) of *A. blazei* extract. Increased micronucleus-dependent dose against the test extract. This idea, we can conclude that these components are generating a special delivery of an aircraft in the future.

Keywords: Mushroom of the sun; micronuclei; lymphocytes; antimutagenic.

Introdução

O interesse nas propriedades medicinais de produtos naturais tem aumentado devido ao seu uso popular na medicina tradicional.

A medicina alternativa é frequentemente usada para prevenir ou tratar várias doenças, incluindo o câncer. De acordo com Ernest e Cassileth (1999) as terapias alternativas são

¹ Doutora em Farmacologia pela Universidade Estadual de Campinas–UNICAMP, professora do Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal (UNIPINHA) e Etec Dr. Carolino da Motta e Silveira, Espírito Santo do Pinhal/SP. E-mail: koy Melo@yahoo.com.br.

² Graduada em Biologia pelo Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal (UNIPINHAL). E-mail: anelise_pinhal@hotmail.com.

³ Graduado em Biologia pelo Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal (UNIPINHAL). E-mail: Leo_kfz@hotmail.com.

⁴ Graduada em Biologia pelo Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal (UNIPINHAL). E-mail: nathalia.anhesini@facebook.com.

imensamente populares e sua prevalência na população em geral é de 40% nos Estados Unidos, 50% na Austrália e 65 % na Alemanha. Entre as terapias alternativas, o uso do chá de cogumelos é uma das práticas mais populares.

A descoberta de compostos bioativos em cogumelos, incluindo substâncias antitumorais, tem sido alvo de crescente interesse nestes cogumelos pela indústria, pela mídia e pela comunidade científica (MIZUNO, 2002).

Os produtos naturais têm sido tradicionalmente aceitos como medicamentos devido à crença popular de que eles apresentam menos efeitos adversos. Assim, o entendimento do potencial benéfico dos produtos naturais e de seus efeitos adversos é importante para a implementação de medidas de segurança em saúde pública. Devido ao grande consumo de cogumelos pela medicina popular, em especial o cogumelo do sol, é fundamental que se conheçam as substâncias que os compõe e os mecanismos de ação destas substâncias.

O fungo basidiomiceto *Agaricus blazei* também conhecido como cogumelo do sol, é originário das regiões subtropicais do Brasil, sendo frequentemente consumido como alimento ou na forma de chá em diferentes partes do mundo devido as suas propriedades medicinais, como por exemplo, a) afrodisíaco, b) agente antiestresse, c) no combate ao diabetes, d) no tratamento de distúrbios gástricos, e) no tratamento da osteoporose e f) na profilaxia e tratamento de câncer, este último devido a possíveis efeitos anticarcinogênicos e antimutagênicos (WASSER e WEIS, 1999).

O fungo *A. blazei* é constituído por 85-97% de água. Quando desidratado, ele é rico em proteínas (40-45%) e carboidratos (3-4%). Também contém fibras dietéticas (6-8%), lipídios (3-4%) e vitaminas, principalmente B1, B2 e niacina (OSAKI et al., 1994; MIZUNO, 1995).

Devido às propriedades curativas popularmente conhecidas do cogumelo do sol e de seu elevado uso como medicamento, este cogumelo medicinal está sendo agora produzido em escala industrial em alguns países como China, Japão e Brasil. Assim, surge a necessidade de reunir os conhecimentos produzidos de forma científica sobre suas propriedades curativas e tóxicas (BOBEK et al. 1991 a, b; GUNDE-CIMERMAN et al., 1993, 1995; SHE et al., 1998).

Os estudos acerca das propriedades antitumorais do cogumelo do sol existentes até o momento permitem inferir que este possui em sua composição agentes potencialmente capazes de impedir o desenvolvimento de câncer, e em alguns casos podem agir diretamente sobre os tumores, impedindo seu crescimento, enquanto estudos toxicológicos mostram baixa toxicidade deste fungo. Dentre as propriedades farmacológicas atribuídas a esses agentes pode-se citar seus efeitos citotóxicos, anti-carcinogênicos, antimutagênicos e antígenotóxicos. Estes

compostos podem gerar uma grande quantidade de agentes terapêuticos comerciais contra o câncer em um futuro próximo.

1 Objetivo

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos antimutagênicos de diferentes concentrações (500 mg/Kg, 1000 mg/Kg e 1500 mg/Kg) do extrato de *A. blazei*.

2 Material e Métodos

2.1 Animais

Para realização dos experimentos foram utilizados camundongos BALB/c, com idade aproximada de 8 semanas, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP. Os animais foram divididos em grupos (n=6 animais/grupo), e cada grupo foi submetido ao tratamento de acordo com o protocolo de experimentos a saber:

- a) o grupo tratado (i.p.) com 200 mg/Kg de ciclofosfamida (controle positivo);
- b) o grupo tratado com diferentes doses (500, 1000 e 1500 mg/Kg mg/Kg) *Agaricus blazei* por 10 dias consecutivos e 200 mg/Kg de ciclofosfamida;
- c) o grupo tratado com 0,9% de NaCl (controle negativo).

A administração do *A. blazei* será realizada por via oral em doses padronizadas, utilizando-se solução salina 0,9% como veículo de administração. Aos animais controle não será administrado *A. blazei*. Os animais serão tratados intraperitonealmente com ciclofosfamida 2 horas antes do início do tratamento. As doses utilizadas de *A. blazei* serão 500, 1000 e 1500 mg/Kg.

2.2 Tratamento

O extrato seco de *Agaricus blazei* (ABM) será gentilmente cedido pela Galena Química e Farmacêutica Ltda (São Paulo-Brasil).

Para o tratamento dos animais, o extrato será ressuspenso em água estéril nas concentrações desejadas à temperatura ambiente e 0,2 mL será administrado aos camundongos, correspondendo às doses de 500, 1000 e 1500 mg/Kg, por via oral, durante 7 dias consecutivos.

2.3 Presença e Micronúcleos de Eritrócitos da Medula Óssea de Camundongos BALB/C

O ensaio do micronúcleo das células da medula óssea de camundongos Balb/c foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Mac Gregor et al. (1987). O número de células

micronucleadas foram contadas em 1000 eritrócitos policromáticos por animal. As lâminas foram analisadas usando microscópio óptico de imersão 100 vezes. A porcentagem de redução na frequência de micronúcleo (Mni), foi calculada de acordo com Manoharan e Banerjee (1985) e Waters et al. (1990), conforme equação 1:

$$\text{Redução (\%)} = \frac{\text{frequência de Mni em A} - \text{frequência de Mni em B} \times 100}{\text{frequência de Mni em A} - \text{frequência de Mni em C}} \quad (1)$$

onde A é o grupo tratado (i.p.) com 200 mg/Kg de ciclofosfamida (controle positivo); B é o grupo tratado com diferentes doses (500, 1000 e 1500 mg/Kg mg/Kg) *Agaricus blazei* por 10 dias consecutivos e 200 mg/Kg de ciclofosfamida; e C é o grupo tratado com 0,9% de NaCl (controle negativo)

3 Resultados e Discussão

A tabela 1 mostra a frequência de micronúcleos em eritrócitos (MNPCEs) policromáticos de camundongos tratados com diferentes doses de *A. blazei* (500, 1000 e 1500 mg/Kg) por 10 dias, e/ou com 200 mg/kg de ciclofosfamida (CP) durante 2 dias consecutivos.

CP sozinha induziu um aumento estatisticamente significativo na frequência de micronúcleos ($P < 0,001$ – ANOVA, teste de Chi-quadrado), comparado ao grupo controle negativo (0,9% NaCl). Quando os animais inoculados com CP foram tratados com 500, 1000 e 1500 mg/kg de extrato de *A. blazei*, observou-se reduções significativas de 13,82; 82,44% e 92,02%, respectivamente na frequência de micronúcleos de eritrócitos ($P < 0,001$). Por outro lado, não houve diferença significativa entre a frequência de micronúcleos de eritrócitos da medula óssea de animais apenas tratados com as diferentes doses do extrato e de animais controles (0,9% de NaCl).

Tabela 1- Efeitos do extrato de *Agaricus Blazei* sobre a frequência de micronúcleos de eritrócitos (MNPCEs) da medula óssea de camundongos BALB/c e induzidos por ciclofosfamida (CP).

Tratamento	N° de céls. analisadas	MNPCEs		Redução (%)
		N°	%	
Controle negativo (0,9% NaCl)	10.000	20	0,20	
Controle positivo (200 mg/Kg CP)	10.000	208	2,08	
<i>Agaricus blazei</i>				
500 mg/kg + CP	10.000	182	1,82*	13,82
1000 mg/kg + CP	10.000	53	0,53*	82,44
1500 mg/kg + CP	10.000	35	0,35*	92,02

Agaricus blazei

(Continua)

500 mg/kg	10.000	26	0,26
1000 mg/kg	10.000	29	0,29
1500 mg/kg	10.000	22	0,22

Fonte: Elaborada pelos autores.

*P<0,001 teste Chi-quadrado.

Kanemo et al (2004) verificaram a atividade antitumoral do cogumelo do sol sobre o tumor de Ehrlich em camundongos (por gavagem) utilizando extratos metabólicos, clorofórmicos e hexânicos. Neste estudo os autores verificaram que apenas os extratos, clorofórmico e hexânicos, exibiram atividade farmacológica, mesmo assim, somente quando o tratamento foi realizado por períodos maiores que 10 dias, sendo que nos animais tratados com o extrato hexânico houve aumento da proliferação de linfócitos no baço. Estes dois extratos também foram capazes de estimular a produção de anticorpos ao tumor após 30 dias de tratamento. A análise dos extratos usando GC-MS e ressonância magnética nuclear revelou que o extrato hexânico está constituído principalmente por ácidos graxos e açúcares, enquanto o extrato metanólico (de menor atividade) esteve constituído por açúcares e aminoácidos. Já quando o modelo experimental foi o efeito mutagênico do benzopireno utilizando o teste de AMES (teste de mutagenicidade), os extratos hexânico, clorofórmicos e metanólico de *A. blazei* demonstraram efeito antimutagênicos (OSAKI et al., 1994; KIM et al., 1996).

Barbisan et al. (2002) ao verificar os efeitos hepatoprotetores dos extratos aquosos de várias linhagens de cogumelo do sol na toxicidade hepática e na iniciação de hepatocarcinogênese induzidas por dose moderadamente tóxica de dietilnitrosamina (DEN) verificaram que os extratos aquosos de *A. blazei* da linhagem AB 99/26 exerceram os efeitos hepatoprotetor na toxicidade hepática e na iniciação de hepatocarcinogênese induzidas por DEN mais pronunciados. Neste trabalho também foram verificadas respostas variáveis para estes mesmos parâmetros relativos às diversas espécies utilizadas neste estudo, as quais foram atribuídas à variação da composição bioquímica entre as linhagens. Estes autores ainda relataram que outros motivos prováveis para ausência de atividade antimutagênica em alguns estudos pode ser a ausência de compostos ativos com capacidade antimutagênica em alguns extratos, ou uso de concentrações insuficientes nos mesmos (WANG et al., 1996; LEUNG et al., 1997).

Também utilizando extratos aquosos de uma mistura de linhagens de cogumelos *A. Blazei* foi demonstrado que os mesmos possuem efeito protetor in vivo contra clastogenia induzida por ciclofosfamida em camundongos. Os animais pré-tratados com três diferentes extratos preparados a 4°C, 2°C e 60°C tiveram diminuição significativa na frequência de

micronúcleos em eritrócitos policromáticos e reticulócitos (DELMANTO et al., 2001; MENOLI et al., 2001).

Delmanto et al. (2001) relataram propriedades antimutagênicas do cogumelo do sol em relação a ação indireta da ciclofosfamida in vivo. A ciclofosfamida é um agente alquilante como o metilmetanosulfonato (MMS). Este fato pode sugerir que os extratos de cogumelo do sol são eficientes protetores contra agentes alquilantes, mas não permite generalização sobre os mecanismos de ação do mesmo, pois outros agentes causadores de danos ao DNA precisam ser testados. Estes resultados permitem sugerir que o agaricus pode ser antimutagênico in vivo e in vitro.

Nosso trabalho corrobora com os dados da literatura sobre o potencial terapêutico que o cogumelo do sol apresenta em relação à antimutagenidade.

4 Conclusões

Os estudos acerca das propriedades antitumorais do cogumelo do sol existentes até o momento permitem inferir que possui em sua composição agentes potencialmente capazes de impedir o desenvolvimento de câncer, e em alguns casos podem agir diretamente sobre os tumores, impedindo seu crescimento, enquanto estudos toxicológicos mostram baixa toxicidade deste fungo.

Dentre as propriedades farmacológicas atribuídas a esses agentes pode-se citar seus efeitos citotóxicos, anti-carcinogênicos, antimutagênicos e antígenotóxicos. Estes compostos podem gerar uma variedade de agentes terapêuticos comerciais contra o câncer em um futuro próximo, entretanto persiste a necessidade de realização de novos estudos que elucidem a exata composição do cogumelo do sol e o exato mecanismo de ação farmacológica antitumoral de seus componentes.

Referências

BARBISAN, F. L.; MIYAMOTO, M.; SCOLASTICI, C.; SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; EIRA, A.F; CAMARGO, J.L.V. Influence of aqueous extract of *Agaricus blazei* on rat liver toxicity induced by different doses of diethylnitrosamine, **Journal of Ethnopharmacology**, 83, 25 – 32, 2002.

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

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

DELMANTO, R.D.; DE LIMA, P.L.A.; SUGUIA, M.M.; SALVADORI, D.M.F.; DA EIRA, A.F.; SPEIT, G.; RIBEIRO, L.R. Antimutagenic effect of *Agarius blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide, **Mutation Research**, 496, 15 – 21. (2001)

ERNEST, E.; CASSILETH, B.R. How useful are unconventional cancer treatments? **European Journal of Cancer**, 35, 1608 – 1613 (1999).

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

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

KANENO, R.; FONTANARI, L. M.; SANTOS, DI, STASI, L. C.; RODRIGUES FILHO, E.; EIRA, A. F. Effects of extracts from Brazilian sun – mushroom (*Agaricus blazei*) on the NK activity and Iymphoproliferative responsiveness of Ehrlich tumor – bearing mice. **Food Chem Toxicol**. 2004; 42(6): 909 – 16.

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

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

MACGREGOR, J. T.; HEDDLE, J. A.; HITE, M.; MARGOLIN, B. H.; RAMEL, C.; SALAMONE, M. F.; TIA, R. R.; WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalin bone marrow erythrocytes. **Mut. Res.**, 189: 103 – 112, 1987.

MANOHARAN, K.; BANERJEE, M. R. Carotene reduces sister chromatid exchange induce chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. **Cell. Biol. Int. Res.**, 9: 783 – 789, 1985.

MENOLI, R. C. N.; MONTOVANI, M. S.; RIBEIRO, L.R.; SPEIT, G.; JORDÃO, B.Q. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murril extracts on V79 cells, **Mutation Research**, 496, 5 – 13 (2001).

MIZUNO, T. K. *Agaricus blazei* Murill: Medicinal and Dietary Effects, **Food Reviews International**, 11, 167 – 172 (1995).

MIZUNO, T. Medicinal properties and clinical effects of culinarymedicinal mushroom *Agaricus blazei* Murrill stimulate (*Agaricomycetidae*), **International Journal of Medicinal Mushrooms**, 4,312 – 399 (2002).

OSAKI, Y.; KATO, T.; YAMAMOTO, K.; OKUBO, J.; MIYAZAKI, T. Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of a basidiomycete *Agaricus blazei*, **Yakugaku Zasshi**, 114, 342 – 350 (1994).

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

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

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

WATERS, M.; BRADY, A. L.; STACK, H. F.; BROCKMAN, H. E. Antimutagenicity profiles for some model compounds. **Mut. Res.**, 238: 57 – 85, 1990.