

# EFEITOS DA TERAPÊUTICA EXPERIMENTAL COM *Agaricus blazei* SOBRE PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS EM CAMUNDONGOS

Brunna Emanuella França REGO<sup>1</sup>

Fernando Cezar dos SANTOS<sup>2</sup>

Cássio Fernando NUNES<sup>3</sup>

Deison Soares de LIMA<sup>4</sup>

**Recebido em: 27/05/2014 - Aprovado em: 15/09/2014 - Disponibilizado em: 15/12/2014**

<sup>1</sup>Biomédica. Especialista em Análises Clínicas e mestranda em Patologia Experimental pela Universidade Estadual de Londrina. E-mail: brusni@hotmail.com

<sup>2</sup>Biomédico. Mestrando em Patologia Experimental pela Universidade Estadual de Londrina. E-mail: fernando.bmed@gmail.com

<sup>3</sup>Biólogo. Mestrando em Patologia Experimental pela Universidade Estadual de Londrina. Email: cassionunes@live.com

<sup>4</sup>Biomédico. Docente da Universidade Paranaense. Email: deison@unipar.br

## RESUMO

O cogumelo *Agaricus blazei* (*A. blazei*), conhecido como cogumelo do sol, é utilizado na medicina alternativa para a prevenção de diversas patologias como o câncer, hepatopatias e diabetes. Ainda que amplamente utilizado pela população mundial como um composto medicinal, seus possíveis efeitos adversos não são completamente conhecidos. Neste contexto, em relato de caso, foi demonstrado que pacientes que faziam o uso prolongado do *A. blazei* desenvolveram alterações nas células hepáticas. Com base nisto, o objetivo deste trabalho foi avaliar se o tratamento crônico de camundongos com o fungo *A. blazei* pode induzir algum efeito hepatotóxico. Foram utilizados 10 camundongos swiss fêmeas. Os animais do grupo teste (Ab) (n=6) foram tratados com uma dose oral diária de 0,1 ml a uma concentração de 110mg/Kg, por um período de sessenta dias. Os animais do grupo controle (n=4) foram tratados com PBS. A análise histopatológica demonstrou que não houveram diferenças na morfologia das células hepáticas entre os grupos Ab e controle. Portanto, sugere-se que o extrato aquoso de *A. blazei*, nas doses utilizadas, não teve ação tóxica nas células hepáticas.

**Descritores:** Cogumelo do sol. Hepatotoxicidade. Plantas medicinais. Medicina Alternativa. Histopatologia.

## EFFECTS OF *Agaricus blazei* EXPERIMENTAL THERAPY ON HISTOPATHOLOGICAL PARAMETERS IN MICE

## ABSTRACT

The mushroom *Agaricus blazei* (*A. blazei*), known as cogumelo do sol, is used in alternative medicine for the prevention of various diseases such as cancer, liver disease and diabetes. Although widely used by the world population as a medicinal compound, its potential adverse effects are not completely known. In this context, case report, it was shown that patients who made extensive use of *A. blazei* developed abnormal liver cells. Based on this, the objective of this study was to evaluate whether chronic treatment of mice with the fungus *A. blazei* may induce some hepatotoxic effect. 10 female Swiss mice were used. The animals in the test group (Ab) (n = 6) were treated with a daily oral dose of 0.1 ml at a concentration of 110mg/Kg, for a period of sixty days. The control group (n = 4) were treated with PBS. Histopathological analysis showed that there were no differences in the morphology of liver cells between Ab and control groups. Therefore, it is suggested that the aqueous extract of *A. blazei* in the doses used, had no toxic effects on liver cells.

**Descriptors:** Cogumelo do Sol. Hepatotoxicity. Medicinal plants. Alternative Medicine. Histopathology.

## INTRODUÇÃO

Estima-se que no Brasil existam entre 55 e 80 mil espécies vegetais na Amazônia, sendo que uma pequena porção das plantas conhecidas como medicinais foram estudadas cientificamente (NOVAIS, 2008). Não basta comprovar apenas o efeito terapêutico da droga, é necessário também confirmar sua inocuidade avaliando os riscos de seu uso. Para a toxicologia, é preciso considerar que uma planta medicinal ou um possível medicamento fitoterápico pode apresentar não somente efeitos adversos imediatos, mas também efeitos em longo prazo após determinado período do uso da droga, como a hepatotoxicidade e a nefrotoxicidade (ARANTES, 2009).

A utilização de plantas na prevenção e no tratamento de doenças é uma prática bastante utilizada, onde muitas vezes o conhecimento popular sobre essas plantas é a única informação de comunidades e grupos étnicos (MACEDO; OSHIWA; GUARIDO, 2007). Algumas plantas produzem substâncias químicas que podem atuar benéficamente sobre os organismos, mas quando utilizadas sem o conhecimento da dose, forma de utilização e até mesmo quando não se conhece a indicação terapêutica, podem apresentar riscos à saúde (ARANTES, 2009). Isto se deve ao fato de

possuírem substâncias tóxicas capazes de lesionar órgãos ou tecidos (RITTER et al., 2002).

Os cogumelos são considerados medicamentos de origem natural com alto valor medicinal, sendo utilizados como alimentos nutracêuticos e/ou terapêuticos por exercerem diferentes atividades biológicas. Existem aproximadamente 10.000 espécies de cogumelos, onde 700 são comestíveis, 50 a 200 apresentam propriedades medicinais e 50 são considerados venenosos (FORTES, 2007).

O cogumelo *Agaricus blazei* (*A. blazei*,) denominado popularmente de cogumelo do sol, tem seu cultivo no Brasil e possui propriedades medicinais, sendo empregado tradicionalmente como alimento para a prevenção do câncer, hiperlipidemia, arteriosclerose, doenças hepáticas, cardiopatias, diabetes e artrites (TOMIZAWA et al., 2007; SINGI. et al., 2006) devido ao seu potencial terapêutico, imunomodulatório e anti-tumoral (MOURÃO, 2008).

O cogumelo é utilizado como imunomodulador por agir em receptores biológicos do sistema imunológico, induzindo a estimulação da apoptose e ativação de fagócitos. Possui potencial anti-

tumoral através de diferentes mecanismos de ação, sendo capaz de modular a carcinogênese pela indução indireta de apoptose contra tumores, bem como a inibição da neovascularização para células neoplásicas (LIMA, C. 2009).

Neste contexto, em um estudo de caso clínico, foi relatado que três pacientes que apresentavam câncer hepático severo faziam o uso de *A. blazei* e que, em um dos pacientes, a parada do uso deste composto levou a uma melhora gradual de seu fígado, a qual foi interrompida quando o paciente fez o uso do extrato novamente (MUKAI et al., 2006).

Apesar de ser amplamente utilizado pela população mundial como medicina alternativa, muito ainda há de se conhecer sobre as ações do extrato de *A. blazei* no organismo e se há interações com o metabolismo celular e seus possíveis efeitos adversos (BELLINI et al., 2008). Há ainda a preocupação de possíveis efeitos deletérios ao organismo, por acumular no seu interior metais tóxicos como o chumbo, arsênio, cádmio e mercúrio (BALDISSERA, 2007). Desta forma, faz-se necessário conhecer melhor uma eventual toxicidade deste cogumelo, e assim contribuir com a segurança na utilização terapêutica dessa

espécie (MARIZ et al., 2008). Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar através de análise histopatológica o possível efeito hepatotóxico da terapêutica experimental crônica com o fungo *A. blazei* em camundongos da linhagem swiss fêmeas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Camundongos *Swiss* fêmeas com 21 dias de idade e peso de  $25 \text{ g} \pm 5 \text{ g}$  foram obtidos do Biotério da Universidade Paranaense, os quais foram mantidos em caixas convencionais de polipropileno (máximo de seis animais por caixa) cobertas com uma grade metálica, com acesso a água e ração *ad libitum*, em uma sala com condições controladas de temperatura a  $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e regime de 12h com luz e 12h no escuro.

Nesta pesquisa, foram utilizados dois grupos experimentais sendo que o grupo teste foi composto por um número (n) de 6 animais, e o grupo controle composto por quatro animais. Os animais do grupo teste, denominado grupo Ab, receberam tratamento com *A. blazei*. Os animais do grupo controle receberam apenas solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (PBS). Os animais foram então distribuídos randomicamente, totalizando um número de dez animais avaliados. Após o protocolo

experimental, foi utilizada uma solução anestésica de Acepran (1,26 ml/Kg) + Ketamina-10% (1,26ml/Kg) + Xilazina-2% (0,42 ml/Kg) + Atropina-1% (0,22 ml/Kg), a qual a administração foi feita por via intramuscular (PACHALY et al., 2003). Após o processo de anestesia, foi procedida a coleta de todo o sangue do animal por punção intracárdica, com indução da eutanásia decorrente deste procedimento, com conseqüente retirada do órgão para análise.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal (CEPEEA) da Universidade Paranaense – UNIPAR (Protocolo de Pesquisa 18703/10).

### **Preparo e Administração de *Agaricus blazei***

Foram utilizadas amostras de *Agaricus blazei* (*Agaricus blazei* 97/11) cedidas pelo Prof. Dr. Nelson Barros Colauto do Laboratório de Biologia Molecular da UNIPAR. Após os procedimentos técnicos necessários para obtenção dos cogumelos, estes foram desidratados em um forno com circulação de ar a 65°C. Uma solução de cogumelos e água foi feita em uma proporção de 1:10, e submetidas a um aquecimento de 90°C por

12 h. Posteriormente, a solução foi filtrada com papel filtro de 80 g/m<sup>2</sup>, espessura de 205 µm e poros de 14 µm. A solução filtrada foi então estocada no refrigerador a uma temperatura de 4°C para ser usada diariamente. Para o tratamento, a solução foi administrada a temperatura ambiente (~26°C) sendo que cada camundongo recebeu por gavagem uma dose oral diária de 0,1 ml a uma concentração de 110mg/Kg, por um período de sessenta dias.

### **Histopatologia**

O fígado obtido de cada animal foi estudado microscopicamente para avaliar e determinar possíveis agressões ao órgão.

As amostras do tecido hepático dos camundongos foram fixadas em formol tamponado a 10% (pH 7) por período mínimo de 24 horas. Após a fixação as amostras foram desidratadas gradativamente em concentrações crescentes de álcool etílico (70% a 100%), diafanizadas em xilol, embebidas e incluídas em parafina, conforme métodos histológicos de rotina. Os fragmentos incluídos em parafina foram cortados utilizando-se micrótomo modelo “820” Spence, obtendo-se seções de 6µm de espessura. As lâminas histológicas foram mantidas em estufa para secagem, e os cortes posteriormente submetidos à

coloração por hematoxilina e eosina, para análise histológica (ROCHA et al., 2006).

As lâminas foram examinadas ao microscópio óptico modelo Nikon E100 pelos autores.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas avaliações microscópicas do tecido hepático, não foram observadas diferenças na morfologia das células hepáticas entre os grupos controle e Ab. O fígado dos animais do grupo Ab foi avaliado histologicamente ao final do experimento e apresentaram características semelhantes aos dos animais do grupo controle.

Foi visualizado tecido conjuntivo organizado de maneira regular, tecido epitelial formando placas com agrupamento de hepatócitos que apresentaram citoplasma eosinófilo, um núcleo central, arredondado, com um ou dois nucléolos bem evidentes e disposto de forma organizada. Não houve nenhum achado de alterações morfológicas nos lóbulos hepáticos, como por exemplo, infiltrado mononuclear linfocitário ou formação de processo granulomatoso. Além disso, as amostras analisadas tanto dos animais do grupo controle e experimental não apresentaram qualquer indício de

fibrose, necrose, processo inflamatório ou pontos hemorrágicos no lóbulo hepático.

O fígado é o segundo maior órgão do corpo humano e a maior glândula, e está situado na cavidade abdominal abaixo do diafragma. Ele é formado por lóbulos que são constituídos principalmente por células hepáticas, sendo revestido por uma cápsula delgada de tecido conjuntivo. O fígado é o órgão no qual ocorre a metabolização, acúmulo de nutrientes e degradação de substâncias tóxicas absorvidas, sendo muitas vezes o principal órgão atingido no uso de medicamentos de maneira incorreta, pois determinadas drogas podem ocasionar reações agudas ou até mesmo crônicas levando a uma falência hepática (TRIVIÑO; ABIB, 2003).

Estudos preliminares sobre a toxicidade aguda do uso do *Agaricus blazei* mostraram que esta espécie não apresentou efeitos tóxicos ao organismo dos animais estudados. Da mesma forma o estudo sobre a toxicidade subcrônica do extrato aquoso de *Agaricus blazei* em diferentes concentrações administradas, no período de 90 dias, os animais não apresentaram alterações em seu aspecto geral, não sendo detectadas alterações hematológicas ou histológicas nos

órgãos desses animais (KUROIWA, et al., 2005).

Outro estudo que fez o uso de um cogumelo do mesmo gênero, *Agaricus sylvaticus* com o objetivo de avaliar seu potencial protetor no fígado de camundongos, utilizaram grupos de animais que foram tratados apenas com o fungo *A. sylvaticus* e grupos que receberam o extrato de *A. sylvaticus* em combinação com a inoculação de pristane intraperitoneal, sendo tratados pelo período de 28 dias. Foi demonstrado na análise de cortes histológicos do fígado desses animais que não houve nenhuma alteração provocada pelo uso do cogumelo (HI, 2008).

Gonzaga *et. al* (2009) estudaram a atividade antitumoral de um complexo polissacarídico extraído de *A. blazei* em um modelo experimental de sarcoma. A administração do polissacarídeo em camundongos não elevaram significativamente os níveis plasmáticos das aminotransferases, assim como as análises histopatológicas sugeriram que o fígado não foi afetado pelo complexo polissacarídico.

Em outro estudo de 13 semanas de tratamento com *A. blazei* foi demonstrado que tal procedimento não indicou qualquer alteração macroscópica ou histopatológica

do fígado, relacionada com o tratamento (SUMIYA, et al., 2008). Para Ishii e colaboradores (2011), o uso do cogumelo *A. blazei* combinado com a droga quimioterápica doxorrubicina, além de não provocar qualquer alteração no tecido hepático, assume o papel de fornecer proteção ao hepatócito induzindo a apoptose de células pré-neoplásicas.

Em estudos realizados com o objetivo de avaliar o possível efeito protetor do cogumelo *A. blazei*, foi verificado que o fungo exerceu efeito quimioprotetor contra a indução de danos primários ao DNA quando inoculada a substância cancerígena dietilnitrosamina (DEN), promovendo assim proteção às células hepáticas contra a expansão clonal de células pré-neoplásicas. (SUGUI, 2006).

Barbisan et al. (2002) avaliaram o potencial do cogumelo *A. blazei* em modificar a toxicidade causada pela inoculação de diferentes concentrações da substância DEN em camundongos tratados previamente com o cogumelo. Foi verificado que os camundongos que receberam previamente o extrato do fungo desenvolveram um efeito hepatoprotetor contra a toxicidade das células hepáticas e processos carcinogênicos. Posteriormente,

Barbisan et al. (2003) complementaram seus estudos com camundongos submetidos ao tratamento em diferentes concentrações do extrato do cogumelo *A. blazei* no período de duas semanas, após esse período inoculou-se a substância DEN com o objetivo de induzir um processo neoplásico, e assim avaliar a influência do cogumelo sobre as células hepáticas. Com isso, foi verificado que o tratamento com as maiores concentrações do extrato reduziu de forma significativa os danos às células, indicando assim que o fitoterápico *A. blazei* promoveu um efeito protetor contra o DEN.

Lee e Hong (2011) afirmam que o tratamento com o cogumelo *A. blazei* combinado com a droga quimioterápica doxorubicina (DOX), assume o papel de inibir o crescimento de carcinomas hepatocelulares, pois o fungo potencializa o efeito da DOX, promovendo a apoptose da célula neoplásica e um melhor efeito terapêutico.

Além disso, estudos em camundongos com fibrose hepática induzida por tetracloreto de carbono (CCI) demonstraram que o tratamento com *A.*

*blazei* levou a uma diminuição na agressão às células hepáticas e uma recuperação das células lesionadas, quando comparadas com o grupo de animais submetidos à ingestão apenas de água destilada (Wu et al., 2011). Estes relatos contrastam com os efeitos hepatotóxicos de *A. blazei* apresentados por Mukai et al. (2006), contudo, nossos resultados corroboram os estudos supracitados, onde a estrutura morfológica do fígado permaneceu inalterada em animais que foram tratados com o cogumelo. Portanto, sugere-se que o extrato aquoso de *A. blazei*, nas doses utilizadas, não teve ação tóxica nas células hepáticas.

## CONCLUSÃO

Nas análises histológicas do tecido hepático de camundongos submetidos ao tratamento com *A. blazei*, não foram encontradas evidências de agressão tecidual, bem como efeitos colaterais ou de toxicidade induzidos pelo uso crônico do extrato de *A. blazei*. No entanto, são necessários mais estudos clínicos randomizados, que comprovem a efetividade e a dose segura e benéfica a ser utilizada em diferentes patologias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARANTES, V. P. **Avaliação pré-clínica de extratos vegetais de plantas do cerrado brasileiro com atividade antimicobacteriana.** 2009. 101 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2009.

BALDISSERA, B. L. **Absorção/adsorção de cádmio, cromo e chumbo por *Agaricus blazei*.** 2007. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2007.

BARBISAN, L. F. et al. Influence of aqueous extract of *Agaricus blazei* on rat liver toxicity induced by different doses of diethylnitrosamine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, n. 2, p. 25-32, 2002.

BARBISAN, L. F. et al. *Agaricus blazei* (Himematsutake) does not alter the development of rat diethylnitrosamine-initiated hepatic preneoplastic foci. **Cancer Science**, v. 9, n. 2, p. 188-192, 2003.

BELLINI, M. F. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of *Agaricus blazei* methanolic extract fractions assessed using gene and chromosomal mutation assays. **Genetics and Molecular biology**, v. 31, n. 1, p. 122-127, 2008.

FORTES, R. C. **Efeitos hematológicos, imunológicos e na glicemia de jejum de pacientes com câncer gastrointestinais, em fase pós-operatória, após suplementação dietética com fungos *Agaricus Sylvaticus*.** 2007. 200 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

GONZAGA, M. L. C. et al. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by an  $\alpha$ -(1->4)-glucan- $\beta$ -(1->6)-glucan-protein complex polysaccharide obtained from *Agaricus blazei* Murill. **Journal of Natural Medicines**, v. 63, n. 1, p. 32-40, 2009.

HI, E. M. B. et al. Efeito protetor do extrato de *Agaricus sylvaticus* em fígado de ratos do tipo Wistar inoculado com pristane. **Saúde coletiva**, v. 5, n. 21, p. 76-79, 2008.

ISHII, P. L. et al. Evaluation of *Agaricus blazei* in vivo for antigenotoxic, anticarcinogenic, phagocytic and immunomodulatory activities. **Journals and Databases**, v. 59, n. 3, p. 412-422, 2011.

KUROIWA, Y. et al. Lack of subchronic toxicity of an aqueous extract of *Agaricus blazei* Murril in F344 rats. **Food Chem Toxicol**, v. 43, n. 7, p. 1047-53, 2005.

LEE, J. S.; HONG, E. K. *Agaricus blazei* Murrill enhances doxorubicin-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells by NFκB-mediated increase of intracellular doxorubicin accumulation. **International Journal of Oncology**, v. 38, n. 2, p. 401-408, 2011.

LIMA, C. U. J. **Cogumelo *Agaricus Blazei* Murrill e sua influência em parâmetros inflamatórios em idosos**. 2009. 53 f. Dissertação (Mestrado em Gerontologia) – Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2009.

MACEDO, A.F.; OSHIWA, M.; GUARIDO, C. F. Ocorrência do uso de plantas medicinais por moradores de um bairro do município de Marília-SP. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 123-128, 2007.

MARIZ, S. R. et al. Avaliação histopatológica em ratos após tratamento agudo com o extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 2, p. 213-216, 2008.

MOURÃO, F. **Atividade biológica de *Agaricus brasiliensis* em diferentes fases de maturação do basidiocarpo**. 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia aplicada à Agricultura) – Universidade Paranaense, Umuarama, 2008.

MUKAI, H. et al. An alternative medicine, *Agaricus blazei*, may have induced severe hepatic dysfunction in cancer patients. **Japanese Journal Clinical Oncology**, v. 36, p. 808–810, 2006.

NOVAIS, R. Z. **Avaliação da resposta tecidual dos extratos vegetais aquoso e hidroalcoólico de araçá (*Psidium cattleianum*) pela análise edemogênica e morfológica em ratos**. 2008. 72 f. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2008.

PACHALY, J. R. et al. Anesthesia of wistar rats (*Rattus norvegicus*) with allometrically scaled doses of ketamine, xylazine,

acepromazine and atropine preliminary report. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. - UNIPAR**, v. 3, n. 6, p. 195-197, 2003.

RITTER, M. R. et al. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 2, p. 51-62, 2002.

ROCHA, A. M. J. et al. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, n. 2, p. 150-156, 2006.

SUGUI, M. M. **Mecanismo de antimutagenicidade do cogumelo *Agaricus brasiliensis* sobre lesões no DNA induzidas *in vivo* e *in vitro***. 2006. 111 f. Tese (Doutorado em Patologia) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

SUMIYA, T. et al. Genetic Toxicology and quarterly dietary toxicity study in rats. **Research Institute of Mycology - Japan**, v. 1, n. 2, p. 1-21, 2008.

TOMIZAWA, M. M. et al. Variabilidade genética de isolados do cogumelo *Agaricus blazei* por meio de marcadores rapd.

**Ciências e Agrotecnologia**, vol. 31, n. 4, p. 1242-1249, 2007.

TRIVIÑO, T.; ABIB, S. C. V., Anatomia cirúrgica do fígado. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n. 5, p. 407 – 414, 2003.

WU, M. F. et al. Agaricus blazei Murill extract abrogates CCl4-induced liver injury in rats. **In vivo**, v. 25, n. 1, p. 35-40, 2011.