

## Efeitos do tratamento com *Agaricus sylvaticus* sobre a anemia e os níveis de proteína C reativa em animais com tumor sólido de Walker 256

Effects of *Agaricus sylvaticus* treatment on anemia and C reactive protein levels in animals with Walker 256 tumor

Vanessa Cunha Taveira<sup>1</sup>  
Marcelo dos Anjos Reis<sup>2</sup>  
Monique Fernandes Silva<sup>2</sup>  
Bárbara Helena Alvarenga Sala<sup>2</sup>  
Maria Rita Carvalho Garbi Novaes<sup>2</sup>

### RESUMO

**Introdução:** Os cogumelos medicinais apresentam propriedades farmacológicas e nutricionais que atuam na melhora do bem-estar e no aumento da sobrevida do paciente.

**Objetivos:** Avaliar os efeitos do extrato de *Agaricus sylvaticus* sobre a anemia e os níveis de proteína C reativa em ratos inoculados com tumor sólido de Walker 256.

**Métodos:** 30 ratos Wistar adultos machos foram distribuídos em dois grupos (n=15 cada) para suplementação dietética distinta (*Agaricus sylvaticus* e placebo) administrada de 12 em 12 horas. Os animais foram sacrificados no 13º dia e foi coletado sangue para análise laboratorial. Os testes estatísticos foram realizados através da análise estatística univariada (ANOVA), com significância para  $p \leq 0,05$ .

**Resultados:** O grupo tratado com *Agaricus sylvaticus* apresentou nível de proteína C reativa (PCR) de  $0,48 \pm 0,12$  mg/dL enquanto o grupo tratado com placebo apresentou o valor de  $0,61 \pm 0,11$  mg/dL ( $p=0,008$ ). O grupo tratado com *A. sylvaticus* apresentou em média: hemácias  $4,53 \times 10^6 \pm 1,15 \times 10^6/\text{mm}^3$ , Hemoglobina (Hb)  $8,10 \pm 2,08$  g/dL, Hematócrito (Ht)  $24,02 \pm 4,51\%$ , Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)  $22,20 \pm 2,4$  pg, Concentração de Hemoglobina Corpuscular (CHCM)  $36,21 \pm 6,38\%$  e Volume corpuscular médio (VCM)  $62,46 \pm 6,74$  fl. No grupo tratado com placebo foram encontrados: hemácias  $3,33 \times 10^6 \pm 0,86 \times 10^6/\text{mm}^3$ , Hb  $6,96 \pm 1,55$  g/dL, Ht  $19,7 \pm 5,31\%$ , HCM  $21,26 \pm 1,31$  pg, CHCM  $29,92 \pm 8,6\%$  e VCM  $63,12 \pm 10,19$  fl. Diferenças significativas foram encontradas para o número de hemácias sendo  $p = 0,004$  e hematócrito sendo  $p = 0,03$ .

**Conclusão:** A redução do nível de Proteína C Reativa e a melhora do quadro anêmico são indicativos de melhor prognóstico para os animais com câncer tratados com o cogumelo *Agaricus sylvaticus*.

**Palavras-chave:** Tumor de Walker 256, *Agaricus sylvaticus*, Série Vermelha, Proteína C Reativa.

<sup>1</sup> Universidade de Brasília, Brasília-Distrito Federal, Brasil.

<sup>2</sup> Escola Superior de Ciências da Saúde/ Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde, Brasília-DF, Brasil.

**Correspondência:**  
Av. Buarque, 198. Cabo Branco. 58045-160. João Pessoa, PB.  
djveloso@openline.com.br

Recebido em 10/julho/2006  
Aprovado em 08/março/2007

## ABSTRACT

**Introduction:** Medicinal mushrooms present pharmacological and nutritional properties that have been associated with the improvement of well-being and the increase of lifespan

**Objectives:** evaluate the effects of *A. sylvaticus* extracts on anemia and levels of C reactive protein in rats inoculated with Walker 256 tumor.

**Methods:** 30 male adult Wistar rats were divided into two groups (n=15 each) for different dietary supplementation (*Agaricus sylvaticus* and placebo) administered every 12 hours. The animals were sacrificed on the 13<sup>th</sup> day and their blood were collected for laboratorial analysis. The Statistical tests were carried out through univariate statistical analysis (ANOVA), with significance to  $p \leq 0,05$

**Results:** The group treated with *Agaricus sylvaticus* presented a level of C-reactive protein (CRP) of  $0,48 \pm 0,12$  mg/dL while the group treated with placebo group presented CRP level of  $0,61 \pm 0,11$  mg/dL ( $p=0,008$ ). The group treated with *A. sylvaticus* presented, on average, the following values: erythrocytes  $4,53 \times 10^6 \pm 1,15 \times 10^6/\text{mm}^3$ , Hemoglobin (Hb)  $8,10 \pm 2,08$ g/dL, Hematocrit:  $24,02 \pm 4,51\%$ , Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH)  $22,20 \pm 2,4$ pg, Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC)  $36,21 \pm 6,38\%$  and Mean Corpuscular Volume (MCV)  $62,46 \pm 6,74$ fl. In the group treated with Placebo were found: erythrocytes  $3,33 \times 10^6 \pm 0,86 \times 10^6/\text{mm}^3$ , Hemoglobin  $6,96 \pm 1,55$ g/dL, Hematocrit:  $19,7 \pm 5,31\%$ , MCH  $21,26 \pm 1,31$ pg, MCHC  $29,92 \pm 8,6\%$  and MCV  $63,12 \pm 10,19$ fl. Significant differences were found for the number of erythrocytes being  $p=0,004$  and hematocrit being  $p=0,03$ .

**Conclusion:** The reduction of C Reactive Protein level and the improvement of anemic state indicate a better prognosis for animals with cancer treated with *A. sylvaticus* mushroom

**Key words:** Walker 256 tumor, *Agaricus sylvaticus*, Red blood cells, C Reactive Protein.

## INTRODUÇÃO

O consumo de cogumelos em todo o mundo deve-se, desde tempos remotos, ao seu paladar e textura agradável e à crença em suas propriedades antitumorais e imunomoduladoras pela medicina tradicional oriental<sup>1</sup>. No ocidente é ingrediente na culinária sofisticada, mas seu uso como rotina na alimentação, devido principalmente a fatores sociais e econômicos, é restrito a países do leste europeu. Sobre seu efeito terapêutico faltam estudos que comprovem sua eficácia em tratamentos de diversas afecções como dislipidemias, diabetes e câncer, especialmente como adjuvante associado ao suporte nutricional<sup>2</sup>. Estudos epidemiológicos em câncer gastrointestinal evidenciaram uma relação inversamente proporcional entre a ingestão de cogumelos e o risco de desenvolvimento dessa doença<sup>3</sup>.

Melhorias nas técnicas de extração e purificação de substâncias bioativas presentes em extratos de cogumelos permitiram identificar cadeias de polissacarídeos como principais agentes antitumorais, atuando como imunomoduladores e com uma possível ação citotóxica<sup>2</sup>. Dentre os polissacarídeos destacam-se as  $\beta$ -D-glucanas, assim como os derivados de frações lipídicas de cogumelos *Agaricus blazei* como o ergosterol têm sido apontados como responsáveis por ação antitumoral<sup>4</sup>. Recentemente foram isolados dois compostos destes cogumelos, com atividade antiangiogênica, antitumoral e antimetastática constatada em estudos experimentais<sup>5,6</sup>.

O *Agaricus sylvaticus* é um cogumelo brasileiro encontrado de forma nativa no interior do estado de São Paulo, cujo nome popular é Cogumelo do

Sol<sup>7</sup>. Pertence à taxonomia: super-reino Eucariota, reino Fungi, divisão Basidiomycota, subdivisão Homobasidiomycetidae, ordem Agaricales, família Agaricaceae e gênero *Agaricus*<sup>8</sup>.

A anemia é uma condição clínica observada em pacientes com câncer e está relacionada não somente ao próprio processo neoplásico como também às deficiências nutricionais, hemorragias, inibição e destruição da medula óssea e citocinas inflamatórias que influenciam a maturação eritrocitária<sup>10</sup>. A anemia pode manifestar-se por fadiga e comprometer em muito a qualidade de vida e prognóstico do paciente com câncer<sup>11</sup>.

As citocinas inflamatórias são ativadoras da proteína C reativa (PCR), que é um marcador de fase aguda da inflamação e seu aumento está relacionado à agressividade do tumor, à caquexia por ele induzida e ao prognóstico<sup>12</sup>.

O objetivo deste trabalho é avaliar o efeito do extrato do cogumelo *Agaricus sylvaticus* sobre a série eritrocitária e sobre a concentração da Proteína C Reativa em ratos Wistar inoculados com o tumor experimental de Walker 256.

## MÉTODOS

■ **Preparação dos animais:** Ratos machos e isogênicos (n=30) foram mantidos sob idênticas condições ambientais, com ração e água *ad libitum*. Foram distribuídos em dois grupos (n=15 cada), para receberem esquemas distintos de suplementação dietética (*Agaricus sylvaticus* X placebo) administrados de 12x12 horas. Todos os animais foram sacrificados no 13º dia.

■ **Preparação da solução contendo extrato de *Agaricus sylvaticus* e solução placebo:** O extrato aquoso foi preparado a partir de uma infusão do cogumelo desidratado, em água filtrada inicialmente a 100°C por 30 minutos, liquidificado, peneirado e seco em desidratador. O extrato obtido foi adicionado ao veículo que apresenta a seguinte formulação: sorbato de potássio, extrato de cravo da índia, extrato de canela, açúcar e xarope de glicose. A solução placebo apresenta idêntica formulação porém não é adicionada do extrato de *A. sylvaticus*.

■ **Procedência, manutenção e inoculação do tumor nos animais:** A linhagem A do tumor de Walker 256 (origem: The Crist Hospital Line, National Cancer Institute Bank, Cambridge,

Mass., USA), foi obtida junto à Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e conservada em nitrogênio líquido à -160°C. A técnica de inoculação utilizada nos animais foi dilobular e subcutânea, na região dorso-lombar, totalizando 2 inoculações por animal, com aproximadamente 4 milhões de células por inoculação, seguindo o protocolo de NOVAES et al., 2000<sup>13</sup>.

Após a inoculação, iniciou-se a gavagem nos dois grupos com periodicidade de 12/12 horas durante 13 dias. Após esse período, todos os animais foram sacrificados para a análise laboratorial do sangue.

■ **Exame Hematológico dos animais:** Para o sacrifício, os animais foram anestesiados usando éter etílico e seu sangue coletado pela técnica de punção cardíaca e acondicionados em tubos contendo anticoagulante EDTA a 10% para a análise laboratorial. Os parâmetros analisados foram: hemoglobina (Hb), hematócrito (HTC), volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM) por automação, equipamento Cell-dyn 3500. A proteína C reativa (PCR) foi analisada pelo método de turbilhonamento.

■ **Análise Estatística:** Os dados foram analisados no programa Prisma, versão 3.0 e foi aplicado o teste t de Student e análise univariada (ANOVA). Nível de significância  $\leq 0,05$ .

## RESULTADOS

Em relação aos índices hematimétricos, comparando os grupos I (tumor/agaricus) e II (tumor/placebo) foram obtidos valores significativos para o número de hemácias (p=0,004) e o hematócrito (p=0,03). Os níveis de PCR foram significativamente maiores no grupo II (tumor/placebo) em relação ao grupo I (tumor/agaricus), onde foram obtidos os valores de: 0,61 ± 0,11 mg/dL versus 0,48 ± 0,12 mg/dL, respectivamente, sendo a diferença estatisticamente significativa (p=0,008), Tabela 1.

## DISCUSSÃO

A anemia em portadores de câncer é classificada como anemia de doenças crônicas cujo mecanismo patogênico dificilmente pode ser estabelecido. A produção de eritrócitos tem um moderado

aumento, porém não suficiente para compensar a destruição destas células. Estudos sugerem que a ativação do sistema imunológico e a presença de citocinas pró-inflamatórias poderiam induzir a retenção do ferro pelo sistema retículo-endotelial, pelo trato gastrointestinal e pelo fígado exercendo efeito inibitório sobre precursores eritróides<sup>14</sup>.

Vários metabólitos, especialmente os carboidratos extraídos dos fungos são capazes de induzir a hematopoiese<sup>15</sup>. Todos os animais com tumor sólido de Walker apresentaram anemia. Os animais tratados com o cogumelo *A. sylvaticus* apresentaram um aumento significativo do número de hemácias e do hematócrito em relação ao grupo tratado com placebo, indicando que o tratamento com este cogumelo tem uma ação benéfica sobre a anemia no animal com câncer, porém não foi capaz de reverter completamente esta condição. Observou-se que os valores de hemoglobina, HCM, VCM e CHCM apresentaram-se mais próximos do normal nos animais do grupo tratado com o cogumelo comparado aos animais tratados com placebo, não sendo porém estes resultados estatisticamente significativos.

Os metabólitos extraídos de cogumelos podem ter também uma ação antiinflamatória inibindo a produção de óxido nítrico, PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ <sup>6</sup>. A redução destes mediadores inflamatórios pode

atenuar o estado anêmico dos animais, considerando que a presença de IL-1 e TNF- $\alpha$  exercem efeitos maturação dos eritrócitos.

A proteína C-Reativa (PCR) é uma proteína plasmática sintetizada principalmente pelos hepatócitos tendo um aumento importante em processos inflamatórios agudos, agindo como opsoninas na cascata do complemento<sup>12,15</sup>.

Os valores de PCR obtidos no experimento, nos animais do grupo I (tumor/agaricus) se aproximaram dos valores de normalidade, ao passo que os animais do grupo II (tumor/placebo) tiveram esses níveis mais elevados, o que indica uma ação benéfica do referido cogumelo na redução dos efeitos sistêmicos da inflamação sobre o portador de neoplasias e conseqüentemente um melhor prognóstico. Permanece obscuro o mecanismo que propicia essa ação, a hipótese é que possivelmente esteja relacionado com a ação imunomoduladora, já citada, desse fungo.

Os resultados encontrados sugerem que o tratamento com o cogumelo *Agaricus sylvaticus* possui efeito benéfico nos animais com tumor de Walker 256, por ser capaz de produzir uma diminuição no quadro anêmico dos animais, com a obtenção de resultados próximos dos obtidos para animais saudios.

Tabela 1:

Hemograma (série eritrocitária) e valores de proteína C reativa (PCR) de animais inoculados com tumor sólido de Walker 256 tratados com *Agaricus sylvaticus* (grupo I) ou com placebo (grupo II), comparados aos valores obtidos para animais saudios.

	Grupo I (tumor/agaricus)	Grupo II (tumor/placebo)	Animais saudios <sup>16</sup>
Hemoglobina (g/dl)	8,10 $\pm$ 2,08	6,96 $\pm$ 1,55	12,37 $\pm$ 2,0
Hemácias* (milhões/mm <sup>3</sup> )	4,53 $\pm$ 1,15	3,33 $\pm$ 0,86	5,78 $\pm$ 1,59
Hematócrito** (%)	24,02 $\pm$ 4,51	19,7 $\pm$ 5,31	36,18 $\pm$ 4,5
HCM (pg)	22,20 $\pm$ 2,4	21,26 $\pm$ 1,31	23,45 $\pm$ 6,27
CHCM (%)	36,21 $\pm$ 6,38	29,92 $\pm$ 8,6	34,09 $\pm$ 3,15
VCM (fl)	62,46 $\pm$ 6,7	63,12 $\pm$ 10,19	68,56 $\pm$ 17,17
PCR*** (mg/dL)	0,48 $\pm$ 0,12	0,61 $\pm$ 0,11	0,43 $\pm$ 0,11

Testes aplicados: Anova e t de Student. Resultados estatisticamente significativos: \*Hemácias grupo I x grupo II ( $p = 0,004$ ); \*\* Hematócrito grupo I x grupo II ( $p = 0,03$ ); PCR grupo I x grupo II ( $p = 0,008$ ). Os valores representam a média  $\pm$  o desvio padrão.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chen SC, Lu MK, Cheng JJ, Wang DL. Antiangiogenic activities of polysaccharides isolated from medicinal fungi. *FEMS Microbiology Letters*. 2005 Aug 15;249(2):247-54.
2. Sullivan R, Smith JE, Rowan NJ. Medicinal mushrooms and cancer therapy: translating a traditional practice into Western medicine. *Perspectives in Biology and Medicine*. 2006 Spring;49(2):159-70.
3. Borchers AT, Keen CL, Gershwin ME. Mushrooms, tumors, and immunity: an update. *Experimental Biology Medicine*. 2004 May;229(5):393-406.
4. Novaes MRCG, Fortes RC. Efeitos antitumorais de cogumelos comestíveis da família *agaricacea*. *Nutrição Brasil*, 2005; 4(4):207-217.
5. Kimura Y, Kido T, Takaku T, Sumiyoshi M, Baba K. Isolation of an anti-angiogenic substance from *Agaricus blazei* Murill: Its antitumor and antimetastatic actions. *Cancer Science*. 2004 Sep;95(9):758-64.
6. Lull C, Wichers HJ, Savelkoul HF. Antiinflammatory and Immunomodulating Properties of Fungal Metabolites. *Mediators of Inflammation*. 2005 Jun 9;2005(2):63-80.
7. ES Dias, C Abe, RF Schwan. Truths and myths about the mushroom *Agaricus blazei*. *Scientia Agricola*. 2004 Sept/Oct 61(5):545-549.
8. Gameiro PH. Efeito antimutagênico do extrato aquoso de *Agaricus brasiliensis* em cultura de linfócitos humanos [Monografia de Conclusão de Curso]. Universidade Federal de Pelotas; 2005
9. RC Fortes, MRCG Novaes. Effects of administration of *Agaricus sylvaticus* fungi on hematological and immunological systems of rats with walker-256 carcinoma. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2004. 18:125-129.
10. Varlotto J, Stevenson MA. Anemia, tumor hypoxemia, and the cancer patient. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 2005 Sep 1;63(1):25-36.
11. Balducci L. Anemia, cancer, and aging. *Cancer Control*. 2003 Nov-Dec;10(6):478-86.
12. Nikiteas NI, Tzanakis N, Gazouli M, Rallis G, Daniilidis K, Theodoropoulos G, *et. al*. Serum IL-6, TNF and CRP levels in Greek colorectal cancer patients: Prognostic implication. *World Journal of Gastroenterology*. 2005 Mar 21;11(11):1639-43.
13. Novaes MR, Lima LA, Ribeiro JE, Magalhães AV, Sousa MV, Morhy L. Pharmacological effects of arginine supplementation in rats with Walker 256 solid tumor. *Arch Latinoamer Nutr.* 2000 Sep;50(3):230-6.
14. Cavalcanti TC, Gregorini CC, Guimarães F, Rettori O, Vieira-Matos AN. Changes in red blood cell osmotic fragility induced by total plasma and plasma fractions obtained from rats bearing progressive and regressive variants of Walker 256 tumor. 2003 Jul;36(7):887-95.
15. Lehrer S, Diamond EJ, Mamkine B, Droller MJ, Stone NN, Stock RG. C-reactive protein is significantly associated with prostate-specific antigen and metastatic disease in prostate cancer. *BJU International*. 2005 May;95(7):961-2.
16. Pritchett KR, Corning BF. *Biology and Medicine of Rats*. International Veterinary Information Service. Sep 2004

---

Este trabalho é parte da pesquisa desenvolvida pelo programa de Iniciação Científica-PIBIC/FEPECS