

# Avaliação do potencial antimutagênico do Cogumelo do Sol (*Agaricus blazei*) no sistema *methG1* em *Aspergillus* (= *Emericella*) *nidulans*

Suzymeire Baroni Rodrigues, Izabel Aparecida Soares Jabor, Giuliani Grazyella Marques-Silva e Carmem Lucia de Mello Sartori Cardoso da Rocha\*

Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. \*Autor para correspondência

**RESUMO.** Muitos cogumelos comestíveis são utilizados com objetivos terapêuticos. Produtores brasileiros já têm investido em cultivo de cogumelos visando ao mercado de fitoterápicos, principalmente pelas suas propriedades anticancerígenas. A capacidade imunomoduladora relacionada aos efeitos antitumorais já tem sido relatada em vários trabalhos, colocando em evidência um grande número de espécies. Entre essas, *Agaricus blazei*, conhecido como Cogumelo do Sol, tem despertado grande interesse, sendo comercializado no Brasil, para tratamento anticâncer. Esse cogumelo já demonstrou propriedades antitumorais e, mais recentemente, uma publicação apresentou indicação de antimutagenicidade. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial antimutagênico do *A. blazei* no sistema metionina em *Aspergillus nidulans*. Para isto, conídios dormentes da linhagem *biA1methG1* deste fungo foram tratados por 12 horas com 2,5% do extrato aquoso do cogumelo, preparado à temperatura ambiente. Os resultados mostraram um aumento de sobrevivência e uma diminuição da frequência de mutação espontânea, em presença do extrato aquoso, demonstrando um claro efeito antimutagênico desse extrato.

**Palavras-chave:** antimutagenicidade, *Agaricus blazei*, *Aspergillus nidulans*, sistema metionina.

**ABSTRACT.** Detection of antimutagenic potential of Sun Mushroom (*Agaricus blazei*) in *methG1* system in *Aspergillus nidulans*. Many edible mushrooms have been used with therapeutic purpose. Brazilian agriculture is beginning mushroom cultivation mainly because of its anticancer properties. The antitumoral effects of this fitotherapies may be due to immunomodulation capacity of the mushroom tea. Many publications have reported this properties about different species. One of them, *A. blazei*, the popular Sun Mushroom, is cultivated in Brazil with the purpose of anticancer therapy. *A. blazei* has been reported because its antitumoral properties and, more recently, antimutagenic effects. The aim of this work was to test the antimutagenic potential of *A. blazei* in methionine system in *Aspergillus nidulans*. The method consists of a treatment for 12 hours of *biA1methG1* strain conidia with 2.5% aqueous extract of mushroom, prepared at room temperature. The results have shown an increase of conidia viability and a decrease of mutation frequency in treatment plates, when compared to control. The present data are indicative of antimutagenic effect of *Agaricus* extract.

**Key words:** antimutagenicity, *Agaricus blazei*, *Aspergillus nidulans*, methionine system.

## Introdução

Muitas substâncias fitoterápicas têm sido analisadas e testadas como possíveis substâncias antitumorais e anticancerígenas.

Atualmente, cogumelos comestíveis têm atraído atenção de pesquisadores devido as suas propriedades não apenas nutritivas, mas

potencialmente fitoterápicas. Os cogumelos são fungos conhecidos desde a antiguidade, quando o homem já os usava como um alimento de elevado valor nutritivo e terapêutico.

O cogumelo *Agaricus blazei*, também conhecido popularmente como Cogumelo do Sol, vem sendo relatado como um produto com propriedades

medicinais, despertando grande interesse dos pesquisadores.

O valor nutritivo dos cogumelos é similar ao de diversas hortaliças. Eles apresentam diferenças entre as espécies devido ao fato de que a idade, o ambiente, o local e a natureza do substrato de cultivo influenciam em seu conteúdo proteico. Em termos percentuais, geralmente, os cogumelos jovens são mais ricos em proteínas do que os mais maduros (Steineck, 1987; Vedder, 1991).

O Cogumelo do Sol é rico em propriedades antitumorais, como mostra o trabalho de Mizuno (1990) que, ao fracionar polissacarídeos do cogumelo, encontrou, entre outros, o 1-6  $\beta$ -D-glucano com grande atividade antitumoral.

Foi demonstrado que a injeção intraperitoneal de polissacarídeos de várias espécies de cogumelos, bem como a administração de ração contendo 10-30% (w/w) de corpo de frutificação pulverizado apresentam atividade antitumoral para certos tipos de tumores em camundongos (Ikekawa et al., 1969; Chiahara et al., 1970; Mori et al., 1987).

Outros estudos sobre polissacarídeos antitumorais foram feitos pelos japoneses e chineses, quando isolaram estas substâncias de basidiomicetos da família *Polyporaceae*. Além desses, diferentes tipos de cogumelos possuem, também, uma forte atividade antitumoral (Chang e Hayes, 1978).

A maior parte dos trabalhos publicados indicam que os cogumelos podem apresentar propriedade anticancerígena por atividade antitumoral, geralmente associada a uma função imunomoduladora. No entanto, há muitas substâncias classificadas como anticancerígenas cuja ação ocorre antes do efeito da transformação maligna da célula atingida pelo dano mutacional. Estes são os chamados agentes antimutagênicos (Kada et al., 1982).

Muitos trabalhos têm demonstrado propriedade antimutagênica de cogumelos e, mais especificamente, de *A. blazei*, em sistemas animais *in vivo* e *in vitro* (Menoli et al., 2001; Delmanto et al., 2001; Martins de Oliveira et al., 2002).

O objetivo do presente trabalho foi analisar o potencial antimutagênico do extrato aquoso do Cogumelo do Sol. Para isso, foi empregado o sistema metionina em *Aspergillus* (= *Emericella*) *nidulans*. Esse sistema é utilizado para avaliação de mutagenicidade e antimutagenicidade de agentes físicos e químicos, e detecta a reversão do caráter requerimento para independência de metionina (*methG1*), em consequência de mutação em qualquer um dos diferentes *loci* supressores. A análise é feita pela comparação entre as frequências

de reversão em presença do agente em estudo (tratamento) e em ausência do agente (controle) (Lilly, 1965; Gajewski e Litwinska, 1968; Scott e Alderson, 1971; Rocha e Azevedo, 1986).

## Material e métodos

### Linhagem

A linhagem de *Aspergillus nidulans* utilizada para o sistema metionina foi a *biA1methG1*, originada de Glasgow (Escócia). Essa linhagem é deficiente para biotina (cromossomo I) e metionina (cromossomo IV).

### Meios de cultura

Os meios de cultura foram feitos segundo Pontecorvo et al. (1953), Clutterbuck (1974) e Rocha (1997). O meio seletivo (SM) para análise dos revertentes foi feito a partir de meio mínimo (MM) suplementado com biotina. O meio para teste de sobrevivência foi feito com a mesma composição do SM adicionando metionina (SMM).

### Extrato aquoso do cogumelo

Os corpos de frutificação de várias linhagens do cogumelo foram secos e pulverizados e cedidos para este trabalho pela Dra. Lucia Regina Ribeiro da Unesp de Botucatu, Estado de São Paulo.

O cogumelo foi dissolvido em água destilada na proporção de 2,5% (w/v) e mantido em repouso à temperatura ambiente por 2 horas. O extrato aquoso assim obtido foi filtrado três vezes: em lâ de vidro, em papel filtro e em filtro Millipore.

### Tratamento

Conídios de colônias crescidas por cinco dias em meio completo (MC) a 37°C, foram coletados em solução 0,01% Tween 80 em 0,09% NaCl, agitados e filtrados em lâ de vidro. Essa suspensão de esporos foi dividida em 2 tubos (controle e tratamento).

O tratamento com o extrato do Cogumelo do Sol foi feito na proporção 1:1, com a suspensão de conídios durante 1 hora.

Após o tratamento, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos e o sedimento foi ressuspendido em solução salina. Esse procedimento foi repetido mais 2 vezes.

Procedeu-se, então, ao plaqueamento em meio seletivo. Para estimativa de sobrevivência, foram feitas diluições adequadas, inoculação e incubação em 10 placas de SMM, para cada tubo (tratamento e controle) e incubadas por 3 dias a 37°C. Para análise de revertentes, foi inoculada a suspensão sem diluição em 10 placas de SM para cada tubo (tratamento e controle) e incubadas por 5 dias a 37°C.

Todo esse experimento foi feito duas vezes, ou seja, com repetição.

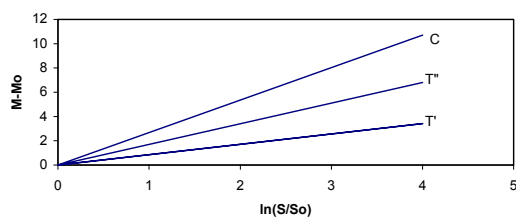
### Análise dos resultados

O número de conídios viáveis por mililitro da suspensão foi dado pela média dos números de colônias em 10 placas de SMM. A frequência de mutação foi calculada pela razão entre o número total de revertentes em 10 placas (1ml) e a média da viabilidade por ml da suspensão. O cálculo para o grupo controle representa a frequência de reversão espontânea para a marca *methG1* para essa linhagem (*biA1methG1*). O cálculo para o grupo tratamento representa a frequência de reversão induzida pela substância em análise.

Para a determinação de positividade do teste, baseou-se no método de Munson e Goodhead (1977), apresentado para o sistema metionina por Scott *et al.* (1982) e modificado por Zonetti e Rocha (2000).

### Resultados

Como é possível observar nos resultados apresentados na Tabela 1, o número de conídios viáveis no grupo tratamento é maior do que no grupo controle. Essa maior viabilidade é o primeiro indicativo de antimutagenicidade do tratamento com o cogumelo. Na mesma direção, apontam os dados de frequência de mutação, menores no tratamento do que no controle. Essas diferenças mostraram-se estatisticamente significativas, como aponta a Figura 1. Nesse teste, Munson e Goodhead (1977) comparam a inclinação da reta do grupo mais mutagênico (neste caso, o controle) em relação às duas retas de referência, calculadas com os dados do grupo de menor mutagenicidade (tratamento).



**Figura 1.** Análise estatística dos resultados da Tabela 1, segundo Munson e Goodhead (1977), mostrando que a frequência de mutação é significativamente maior no controle do que no tratamento, pois a reta C apresenta inclinação maior que a das retas T'' e T', que representam a mutação em presença do chá. Os valores de m que indicam a inclinação das retas C, T'' e T' são, respectivamente, os seguintes:  $m = 2,66$ ;  $m'' = 1,70$ ;  $m' = 0,85$ .

**Tabela 1.** Resultados obtidos no tratamento por 12 horas, de conídios dormentes da linhagem *biA1methG1*, com 2,5% do extrato aquoso do cogumelo *Agaricus blazei* preparado à temperatura ambiente

| Experimento | Grupos     | Número de conídios viáveis x 10 <sup>7</sup> /ml | Número de mutantes/ml | Número de mutantes/10 <sup>8</sup> conídios viáveis |
|-------------|------------|--------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------------------------|
| 1           | Controle   | 22,2                                             | 62                    | 2,8                                                 |
| 2           | Controle   | 17,0                                             | 66                    | 3,9                                                 |
| 1           | Tratamento | 35,2                                             | 70                    | 2,0                                                 |
| 2           | Tratamento | 39,4                                             | 53                    | 1,3                                                 |

### Discussão

Muitos trabalhos têm demonstrado que diversos cogumelos comestíveis têm um grande potencial antitumoral, como o de Ebina e Fugimiyma (1998), que trataram camundongos com um peptídio-glucano extraído do corpo de frutificação do cogumelo *A. blazei*. Esse princípio ativo apresentou efeito imunomodulador, ativando os macrófagos e neutrófilos e diminuindo o tamanho do tumor. Mizuno *et al.* (1998) obtiveram estimulação de linfócitos em camundongos tratados com polissacarídeos de *A. blazei*. Esses dados sugerem que o *Agaricus* pode ter um efetivo profilático, diminuindo a ocorrência do câncer pelo aumento de produção de linfócitos.

Os polissacarídeos obtidos a partir desses cogumelos, como é o caso do lentinano do Shiitake e o  $\beta$ -1-6-glucano do Cogumelo do Sol, agem como imunomoduladores e, por consequência, possuem grande atividade no combate às células tumorais (Chiahara *et al.*, 1970; Kawagishi *et al.*, 1989).

Quando o extrato aquoso do Cogumelo do Sol foi preparado a frio, os resultados apresentaram capacidade antimutagênica (Tabela 1; Figura 1), indicando que, no *A. blazei*, o princípio ativo protetor é extraído à temperatura ambiente.

Grüter (1990) descreveu o efeito antimutagênico presente no cogumelo *Craterellus* comparando-o com dados de *Agaricus abruptibulbus* e *A. bisporus*. A propriedade antimutagênica de *A. blazei* também já foi descrita (Delmanto *et al.*, 2001; Menoli *et al.*, 2001; Martins de Oliveira *et al.*, 2002).

Os resultados do presente trabalho mostraram que o extrato aquoso do *Agaricus blazei* apresenta efeito antimutagênico, quando preparado à temperatura ambiente.

Um outro aspecto muito relevante é que todos os trabalhos que avaliaram o potencial antimutagênico dos cogumelos fizeram os testes em presença de agentes mutagênicos. Grüter (1990), por exemplo, utilizou mutágenos como aflatoxina e benzopireno, para testar o efeito protetor do *Craterellus*, quanto à indução de mutações por esses conhecidos agentes, demonstrando a capacidade deste

cogumelo como desmutágeno. Neste trabalho, no entanto, não foi utilizado nenhum mutágeno. A análise foi feita em relação à mutação espontânea.

Isso significa que o Cogumelo do Sol, preparado à temperatura ambiente, foi capaz de diminuir a frequência de mutação espontânea, agindo não como desmutágeno, mas como bioantimutágeno, o que sugere, entre outras, a possibilidade de uma ação sobre um ou mais sistemas de reparo de danos no DNA.

Como consequência deste trabalho, o emprego do extrato de Cogumelo do Sol pode ser indicado na prevenção do câncer, diminuindo o risco de exposição aos agentes cancerígenos/mutagênicos.

Entretanto, como proposta terapêutica, esses cogumelos só terão algum efeito se houver indícios de atividade imunomoduladora (antitumoral), o que não foi objeto deste estudo. Se considerarmos, porém, que, na maioria dos casos de câncer, o tratamento convencional inclui aplicação de radio e/ou quimioterapia e que parte dos efeitos colaterais desse tipo de terapêutica é a mutação em células normais, os chás antimutagênicos poderiam ser indicados por atuarem como medida de proteção contra os efeitos indesejáveis desses tratamentos, o que torna muito relevantes as pesquisas sobre os mecanismos de antimutagenicidade do Cogumelo do Sol (*Agaricus blazei*).

## Referências

- CHIAHARA, G. et al. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity especially lentinan, from *Lentinus edodes*. *Cancer Res.*, Baltimore, v. 30, p. 2776-2781, 1970.
- CHANG, S.T.; HAYES W. A. *The biology and cultivation of edible mushrooms*. New York: Academic Press, 1978.
- CLUTTERBUCK, A. J. *Aspergillus nidulans*. In: KING, R.C. (ed.). *Handbook of Genetics*. New York: Plenum Publishing, p. 447-510, 1974.
- DELMANTO, R.C. et al. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murril mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. *Mutat. Res.*, Amsterdam v. 496, p. 15-21, 2001.
- EBINA, T.; FUGIIMIYMA, Y. Antitumor effect of a peptide-glucan preparation extracted from *Agaricus blazei* in a double-graft tumor system in mice. *Biotherapy*, Tokyo, v. 11, n. 4, p. 259-265, 1998.
- GAJEWSKI, W.; LITWINSKA, J. Methionine loci and their suppressors in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.*, Amsterdam, v. 102, p. 210-220, 1968.
- GRÜTER, A. Antimutagenic effects of mushrooms. *Mutat. Res.*, Amsterdam v. 231, p. 243-249, 1990.
- IKEKAWA, T. et al. Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms. *Cancer Res.*, Baltimore, v. 29, p. 734-735, 1969.
- KADA, T. et al. Environmental desmutagens and antimutagens. In: KLEKOWSKI, E. J. (Ed.). *Environmental mutagenesis and plant biology*. New York: Praeger, 1982 p.134-151.
- KAWAGISHI, H. et al. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydrate Res.*, Oxford, v. 186, n. 2, p. 267-273, 1989.
- LILLY, L.J. An investigation of suitability of the suppressors of meth1 in *Aspergillus nidulans* for the study of individual spontaneous mutation. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v. 2, p. 192. 1965.
- MARTINS DE OLIVEIRA, J. et al. Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murrill lineage 99/26) in mammalian cells in vitro. *Food Chem. Toxicol.*, Kidlington, v. 40, p. 1775-1780, 2002.
- MENOLI, R.C. et al. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill extracts on V79 cells. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v. 496, p. 5-13, 2001.
- MIZUNO, T. Antitumor activity and some properties of water soluble polysaccharides from *Himematsutake* the fruiting body of *Agaricus blazei*. *Biochemistry*, Washington, DC, v. 54, p. 2889-2896, 1990.
- MIZUNO, M. et al. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Tokyo, v. 62, n. 3, p. 434-437, 1998.
- MORI, K. et al. Antitumor activities of edible mushrooms by oral administration, In: WUEST, P. J. et al. (Ed.). *Proceedings of the International Symposium on Scientific Technical Aspects of Cultivating Edible Fungi*. Pennsylvania State University, University Park, PA/ Elsevier, Amsterdam, p.1-6. 1987.
- MUNSON, R.J.; GOODHEAD, D.T. The relation between induced mutation frequency and cell survival – a theoretical approach and examination of experimental data for eukaryotes. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v. 42, p. 145-160, 1977.
- PONTECORVO, G. et al. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.*, San Diego, v. 5, p. 141-238, 1953.
- ROCHA, C.L.M.S.C. *Caracterização citológica, genética e molecular de um mutante para conidiogênese em Aspergillus nidulans*. 1997. Tese (Doutorado) - Esalq/Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.
- ROCHA, C.L.M.S.C.; AZEVEDO, J.L. Use of the methG1 reversion of *Aspergillus nidulans* for the detection of mutagenicity of the pyrrolizidine alkaloid integerrimine. *Rev. Bras. Genet.*, Ribeirão Preto, v. 9, p. 393-405, 1986.
- SCOTT, B.R.; ALDERSON, T. The random (non-specific) forward mutational response of gene loci in *Aspergillus* conidia after photosensitisation to near ultraviolet light by 8-methoxypsoralen. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v. 12, p. 29-34, 1971.
- SCOTT, B.R. et al. *Aspergillus nidulans*: Systems and results of tests for induction of mitotic segregation and mutation. II. Haploid assay systems and overall response of all systems. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v. 98, p. 49-94, 1982.

STEINECK, H. *Cultivo comercial del champiñón*. Madri: Editora Acribia S.A., 1987. p.142.

VEDDER, P.J.C. *Cultivo moderno del champiñón*. Madri: Ediciones Mundi-Prensa, 1991. p.370.

ZONETTI, P.C.; ROCHA, C.L.S. Mutagenicity of Benlate in methG1 system in *Aspergillus* (= *Emericella*) *nidulans*. *Cytologia*, Tokyo, v. 65, p. 403-408, 2000.

*Received on April 22, 2003.*

*Accept on October 23, 2003.*