

Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do *Agaricus blazei* Murill em ratos submetidos ao teste da formalina modificado*

Antinociceptive and anti-inflammatory effect of Agaricus blazei Murill in rats submitted to the modified formalin test

Claudemir de Carvalho¹, Nathália Cardoso Alves², Aline Couto Monteiro², Naira Correia Cusma Pelógia³

*Recebido do Curso de Farmácia da Faculdade de Pindamonhangaba (FAP). Pindamonhangaba, SP, Brasil.

RESUMO

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS: O consumo de cogumelos em medicina popular e tradicional está associado à atividade imunomoduladora. Sabe-se que a redução do processo inflamatório reduz a nocicepção. O objetivo deste trabalho foi o de verificar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do *Agaricus blazei* Murill, cogumelo do sol, em ratos Wistar, pelo teste da formalina modificado.

MÉTODO: Os animais (n = 18) foram divididos nos seguintes grupos: Grupo Controle (GC): animais não tratados que receberam apenas solvente *Tween* a 2% (n = 6); Grupo Tratado (GT): animais tratados diariamente, por via oral, com 2,65 mg de pó de *A. blazei* em solvente *Tween* a 2%, durante 15 dias (n = 12). Após o tratamento, foram submetidos ao teste da formalina modificado.

RESULTADOS: Após a injeção da formalina, observaram-se as três fases do teste da formalina nos animais do GC e do GT. O tratamento com *A. blazei* não interferiu com a fase I ou II do teste da formalina, mas reduziu o número das elevações de pata na fase III.

CONCLUSÃO: O tratamento com *A. blazei* durante 15 dias teve ação na resposta nociceptiva e na inflamação aguda, pois os ratos tratados com *Agaricus* realizaram

um número menor de movimentações da pata durante a fase III que está relacionada à dor provocada pelos mediadores da fase aguda do processo inflamatório.

Descritores: Analgésicos, Dor, Medição da dor, Rato, Teste da formalina.

SUMMARY

BACKGROUND AND OBJECTIVES: The consumption of mushrooms in popular and traditional medicine is associated to immune modulating activity. It is known that decreasing the inflammatory process will decrease nociception. This study aimed at checking the antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Agaricus blazei* Murill, mushroom of the sun, in Wistar rats using the modified formalin test.

METHOD: Animals (n = 18) were distributed in the following groups: Control Group (CG): non-treated animals receiving just 2% *Tween* solvent (n = 6); Treated Group (TG): animals daily treated orally with 2.65 mg of *A. blazei* powder in 2% *Tween* solvent for 15 days (n = 12). After the treatment, they were submitted to the modified formalin test.

RESULTS: After formalin injection, the three phases of the formalin test were observed in CG and TG animals. The treatment with *A. blazei* has not interfered with formalin test phases I or II, but has decreased the number of paw elevations in phase III.

CONCLUSION: The treatment with *Agaricus blazei* during 15 days had action in nociceptive response and acute inflammation because rats treated with *Agaricus* had a lower number of paw movements during phase III, which is related to pain caused by mediators of the acute inflammatory process phase.

Keywords: Analgesics, Formalin test, Pain, Pain measurement, Rat.

1. Professor de Biologia, Genética e Embriologia da Faculdade de Pindamonhangaba (FAP). Médico Veterinário. Pindamonhangaba, SP, Brasil.

2. Graduada em Farmácia da Faculdade de Pindamonhangaba (FAP). Pindamonhangaba, SP, Brasil.

3. Professora Assistente Doutora de Fisiologia da Universidade de Taubaté (UNITAU). Farmacêutica. Taubaté, SP, Brasil.

Endereço para correspondência:
Dra. Naira Correia Cusma Pelógia
Rua Ipanema, 100. Sapé I
12294-015 Caçapava, SP.
E-mail: cusmapelogia@gmail.com

INTRODUÇÃO

Os cogumelos vêm sendo utilizados há milênios para a produção de alimentos e bebidas fermentadas. Há séculos os asiáticos atribuem atividades curativas aos cogumelos em geral, destacando sua ação anticancerígena¹. É um suplemento alimentar nutritivo e natural, importante à manutenção diária da saúde². De maneira geral, o uso medicinal popular dos cogumelos tem como objetivo melhorar a qualidade de vida ao reduzir a suscetibilidade a infecções e outros efeitos negativos decorrentes de um sistema imunológico debilitado¹.

O cogumelo do sol (*Agaricus blazei* Murrill), nativo do Sudeste do Brasil, surgiu na década de 1960, como resultado da fusão de vários fungos nativos das montanhas da Mata Atlântica do Estado de São Paulo³. Diferencia-se dos demais cogumelos por se desenvolver sob a incidência de intensos raios solares, absorvendo os nutrientes do solo e também do sol, ao contrário dos outros que preferem ambientes úmidos e sombrios para crescer. Rico em proteínas, vitaminas, sais minerais e inúmeros princípios ativos¹. Apresentam vários polisacarídeos, um deles o Beta-Glucan, capaz de inibir o crescimento de tumores⁴.

Dentre seus efeitos descritos na literatura está o fortalecimento do sistema imunológico. O cogumelo apresenta propriedades medicinais preventivas (protetoras), pode funcionar como poderoso coadjuvante no tratamento da hepatite C, melhorando o apetite dos pacientes, que costumam emagrecer muito durante o tratamento da doença. Verificou-se que ele diminui os efeitos colaterais dos medicamentos antivirais, como fadiga e dores musculares. Foi comprovado também que é fonte de proteínas e vitaminas, pois mais ou menos 100 g de cogumelo desidratado contêm 35 g de proteínas, como também ferro, fósforo, cálcio e vitaminas do complexo B¹.

Ainda são poucos os estudos sobre suas propriedades farmacológicas. Por esta razão, este estudo teve como objetivo observar a ação anti-inflamatória e antinociceptiva do cogumelo do sol em ratos Wistar.

MÉTODO

Após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Pindamonhangaba (FAP), protocolo nº 015/2010, realizou-se este estudo no Biotério da FAP, utilizando-se ratos Wistar, machos, com mesma data de nascimento e peso aproximado de 450 g.

O produto utilizado no estudo foi adquirido comercialmen-

te em drogaria, na forma de cápsulas contendo 300 mg de *A. blazei* em pó, com as seguintes características: nome científico: *Agaricus blazei* Murril; família: *Agaricaceae*; ocorrência natural: Mata Atlântica do Sudoeste Brasileiro; aplicação: suplemento alimentar terapêutico. O composto desidratado das cápsulas apresentava: 7,5% de umidade; 36,7% de proteína; 3,4% de gordura; 6,8% de fibras e 7,3% de cinzas; 38,3% de açúcares; 30 a 60 mg/g de beta glucana; 939 mg/100 g de fósforo; 18,2 mg/100 g de ferro; 41,6 mg/100 g de cálcio; 0,48 mg/100 g de vitamina B1; 2,84 mg/10 g de vitamina B2, 354 mg/100 g de vitamina D e 40,9 mg/100g de niacina.

Todos os animais permaneceram por sete dias no local de experimentação antes do início do estudo. Os animais (n = 18) foram divididos nos seguintes grupos: Grupo Controle (GC): animais não tratados que receberam apenas solvente *Tween* a 2% (n = 6); Grupo Tratado (GT): animais tratados diariamente, por via oral, com 2,65 mg de pó de *A. blazei* em solvente *Tween* a 2%, durante 15 dias (n = 12). Esta dose foi calculada a partir da equivalência com a dose diária de *A. blazei* de 300 mg para um homem com peso de 70 kg, conforme informação do fabricante. Os animais foram mantidos em número de seis por gaiola, visando evitar o estresse por superpopulação. Durante este período foi mantida temperatura ambiente $24 \pm 2^\circ \text{C}$, regime claro/escuro com alternância a cada 12 horas e permitida a ingestão de água e ração *ad libitum*.

Após o período de tratamento os animais foram submetidos ao teste da formalina. A dor foi induzida pela administração de 50 μL de solução de formalina a 2,5% na região dorsal da pata posterior direita. Antes da administração, os animais foram colocados em uma câmara de observação transparente por 5 minutos para reconhecimento e adaptação ao local. Posteriormente, foram removidos para a administração do fármaco e recolocados na câmara de observação. Um espelho foi colocado atrás da câmara para facilitar as observações das elevações da pata quando o animal estava com a pata fora do campo do observador.

Todas as elevações da pata, não relacionadas à marcha foram consideradas, independente do tempo em que a mesma permaneceu elevada. A contagem foi realizada continuamente durante 60 minutos e a cada 5 minutos foi anotado o número parcial de elevações. O teste foi dividido em três fases: fase I, durante os cinco primeiros minutos do teste; fase II, entre o sexto e o 20º minuto; fase III, do 21º ao 60º minuto. Na fase I, foi avaliada a resposta ao estímulo nociceptivo; na fase II, a via descendente inibitória da dor e na fase III, a influência da resposta inflamatória na resposta dolorosa. O teste foi realizado na pata direita de todos os animais dos diferentes grupos experimentais.

Os resultados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) para amostras independentes, seguida do teste de Bonferroni para detecção das diferenças entre os grupos. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Após a injeção da formalina, observaram-se as três fases do teste da formalina nos animais do GC e do GT (Gráfico 1). O tratamento com *A. blazei* não interferiu com a fase I ou II do teste da formalina, mas reduziu o número das elevações de pata na fase III (Gráfico 2).

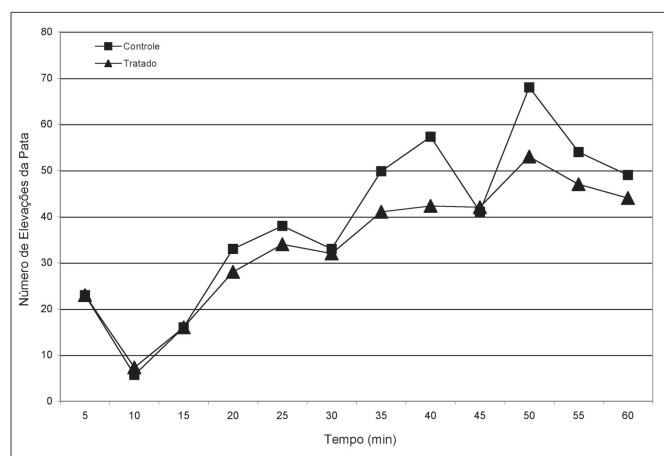


Gráfico 1 - Elevações da pata direita de ratos Wistar, machos, submetidos ao teste da formalina modificado. GC = animais sem tratamento (n = 6); GT = animais tratados com *Agaricus blazei* (n = 12).

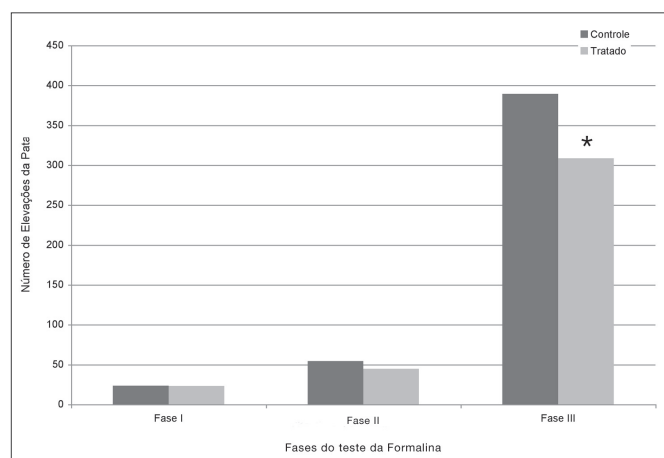


Gráfico 2 – Elevações da pata direita de ratos Wistar, machos, submetidos ao teste da formalina modificado, durante os primeiros cinco minutos (Fase I), do sexto ao 21º minutos (FASE II) e do 21º ao 60º minuto (Fase III) GC = animais sem tratamento (n = 6); GT = animais tratados com *Agaricus blazei* (n = 12) * $p < 0,05$ em comparação com o GC.

DISCUSSÃO

O teste da formalina, considerado como um modelo confiável de dor crônica do tipo inflamatória é amplamente utilizado para se avaliar a ação de fármacos analgésicos. A administração subcutânea de formalina na pata de rato gera comportamentos estereotipados. Entre esses comportamentos, a elevação da pata é um parâmetro confiável de comportamento doloroso. A resposta nociceptiva à formalina ocorre de maneira bifásica: há um curto período inicial (fase I, com duração de 5 a 10 minutos); posteriormente, após um curto período de remissão de comportamentos, inicia-se a fase II, que consiste em um período mais longo (20 ± 40 minutos) de atividade sustentada. Em geral, a resposta inicial é atribuída à ativação direta de nociceptores, enquanto a fase II está associada à liberação de mediadores endógenos locais, que geram resposta inflamatória local, responsável pela sensibilização de aferentes primários e de neurônios medulares subsequentes à ativação de nociceptores⁵.

O tratamento com *Agaricus blazei* Murril, por via oral, durante 15 dias, não alterou a fase I ou a fase II do teste da formalina em comparação com os controles. Estes resultados indicam que o tratamento com o cogumelo do sol não interferiu com a ativação de nociceptores ou com a via descendente inibitória da dor.

Houve redução das elevações da pata na fase III do teste da formalina nos animais tratados. Esta fase corresponde à dor induzida pela resposta inflamatória aguda e pode ter sido obtido pela ação do *A. blazei* na resposta inflamatória.

O processo inflamatório envolve a ativação de monócitos e de macrófagos, que secretam mediadores da resposta inflamatória incluindo óxido nítrico (NO). A óxido nítrico sintase induzível (iNOS) é uma três enzimas que produzem NO. A secreção aumentada de NO está envolvida em processos inflamatórios e desordens neuronais⁶. As prostaglandinas são agentes pró-inflamatórios potentes, derivadas do metabolismo do ácido aracônico pelas ciclo-oxigenases (COX). As duas formas de ciclo-oxigenases, 1 e 2, têm sido bem estudadas. A COX₁ é considerada constitutiva e desempenha importante papel na modulação das funções celulares. A COX₂ é induzida por vários estímulos, incluindo citocinas, durante o processo inflamatório⁷. Portanto, a redução na produção de NO ou na atividade da COX, inclusive pela redução da produção de citocinas, pode contribuir para a atividade anti-inflamatória do *Agaricus blazei*, observada neste estudo.

A administração oral de extratos de *A. blazei* inibe o edema induzido por nistatina, produção de óxido nítrico, PGE2, IL-1 β e TNF- α 6. Além disso, a administração de extratos inibiu a migração de neutrófilos^{8,9}. A ação anti-inflamatória do *A. blazei* foi atribuída aos polissacarídeos presentes no extrato aquoso e alcalino, dentre eles as betaglucanas⁹. Ações antinociceptivas e anti-inflamatórias de polissacarídeos obtidos de outras espécies de *Agaricus* têm sido relatadas na literatura, dentre elas a inibição da ciclo-oxigenase e óxido nítrico sintase¹⁰.

Além da ação anti-inflamatória, o composto 2-amino-3H-fenoxazina-3-ona, obtido de *Agaricus bisporus* Imbach, apresentou inibição da produção de óxido nítrico e prostaglandina E2 em macrófagos após ativação por LPS e interferon gama, além de inibir a atividade das ciclo-oxigenases 1 e 2. Houve aumento da secreção de interleucina 4 e redução da secreção de interleucina 2, mostrando ação imunomoduladora¹¹.

A atividade antialérgica de *A. blazei* está relacionada à conversão dos linfócitos para a linhagem Th1¹².

O tratamento com *A. blazei* durante 15 dias provocou redução na fase III do teste da formalina. Esta redução parece estar relacionada com as propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras descritas para o cogumelo do sol. O consumo regular do cogumelo pode ser útil como terapêutica complementar em doenças autoimunes, inflamatórias crônicas, síndromes alérgicas e em dores musculoesqueléticas.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos com a experimentação, concluiu-se que o *Agaricus blazei* teve ação na resposta nociceptiva e na inflamação aguda, pois os ratos tratados com *Agaricus* realizaram menor número de movimentações da pata durante a fase III que está relacionada à dor provocada pelos mediadores da fase aguda do processo inflamatório.

REFERÊNCIAS

1. Firenzuoli F, Gori L, Lombardo G. The Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murrill: review of literatu-

re and pharmaco-toxicological problems. Evid Based Complement Alternat Med 2008;5(1):3-15.

2. Mattila P, Salo-Vaananen P, Konko K, et al. Basic composition and amino acid contents of mushrooms cultivated in Finlands. J Agric Food Chem 2002;50(22):6419-22.

3. Mizuno TK. *Agaricus blazei* Murrill medicinal and dietary effects. Food Rev Int 1995;11(1):167-72

4. Takeda K, Okumura K. CAM and NK cells. Evid Based Complement Alternat Med 2004;(1):17-27

5. Sousa AM, Franco PA, Ashmawi HA, et al. Local effect of tramadol on formalin evoked flinching behavior in rats. Rev Bras Anestesiologia 2008;58(4):371-9.

6. Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. J Bras Patol Med Lab 2003;39(4):435-50.

7. Carvalho WA, Carvalho RD, Rios-Santos F. Specific cyclooxygenase-2 inhibitor analgesis: therapeutic advances. Rev Bras Anestesiologia 2004;54(3):448-64.

8. Taveira VC, Reis MA, Silva MF, et al. Efeitos do tratamento com *Agaricus sylvaticus* sobre a anemia e os níveis de proteína C reativa em animais com tumor sólido de Walker 256. Com Ciênc Saúde 2007;18(3):221-6.

9. Padilha MM, Avila AA, Sousa PJ, et al. Anti-inflammatory activity of aqueous and alkaline extracts from mushrooms (*Agaricus blazei* Murrill). J Med Food 2009;12(2):359-64.

10. Guerra Dore CM, Azevedo TC, de Souza MC, et al. Antiinflammatory, antioxidant and cytotoxic actions of beta-glucan-rich extract from *Geastrum saccatum* mushroom. Int Immunopharmacol 2007;7(9):1160-9.

11. Kohno K, Miyake M, Sano O, et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of 2-amino-3H-phenoxazin-3-one. Biol Pharm Bull 2008;31(10):1938-45.

12. Bouike G, Nishitani Y, Shiomi H, et al. Oral treatment with extract of *Agaricus blazei* Murrill enhanced Th1 response through intestinal epithelial cells and suppressed OVA-sensitized allergy in mice. Evid Based Complement Alternat Med 2011;1-11.

Apresentado em 09 de novembro de 2010.

Aceito para publicação em 02 de março de 2011.