

Universidade Federal do Paraná

**Efeito da Ação Antitumoral, Parâmetros Bioquímicos e Imunitários da
Biomassa de *Ganoderma lucidum* Utilizada como Suplemento Alimentar
em Ratos Portadores de Tumor Walker 256**

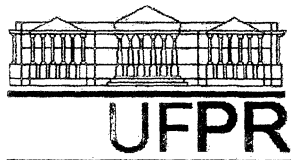
**MESTRADO EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS:
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO Saúde Humana e Animal
Mestrando: Marcos Renato Scholz**

Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol (orientador)

Dra. Rosália Rubel (co-orientador)

Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes (co-orientador)

Curitiba, dez 2006



RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos dezoito dias do mês de dezembro de 2006, na Sala de Vídeo-Conferência do CESEC do Setor de Tecnologia do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pelo Prof Dr Carlos Ricardo Soccol, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, a banca examinadora para a Sexta Defesa de Dissertação de Mestrado, área de concentração: Saúde Animal e Humana. Estiveram presentes no Ato, além do Coordenador do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do colegiado do Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, ficou constituída pelos Professores Doutores Jorge Alberto Vieira Costa (FURG), Telma Elita Bertolin (UPF), Luis Cláudio Fernandes (UFPR), Rosália Rubel (UFPR), Fan Leifa (China) e Carlos Ricardo Soccol (UFPR – orientador da monografia).

Às 9h00, a banca iniciou os trabalhos, convidando o candidato **Marcos Renato Scholz** a fazer a apresentação da Monografia intitulada: **“Efeito da Ação Antitumoral, Parâmetros Bioquímicos e Imunitários da Biomassa de *Ganoderma lucidum* Utilizada como Suplemento Alimentar em Ratos Portadores de Tumor Walker 256”**. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

Tendo em vista a monografia e a arguição, a banca composta pelos professores Dr Jorge Alberto Vieira Costa, Dr^a Telma Elita Bertolin, Dr Luis Cláudio Fernandes, Dr^a Rosália Rubel, Dr Fan Leifa e Dr Carlos Ricardo Soccol, declarou o candidato APROVADO (de acordo com a determinação dos Artigos 32/33/34/35 da Resolução 13/96 de 23.07.96).

Curitiba, 18 de dezembro de 2006.

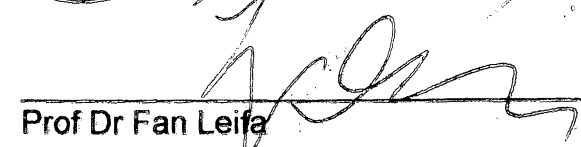

Prof Dr Jorge Alberto Vieira Costa


Profª Drª Telma Elita Bertolin


Prof Dr Carlos Ricardo Soccol


Prof Dr Luis Cláudio Fernandes


Profª Drª Rosália Rubel


Prof Dr Fan Leifa

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO:	13
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 IMPORTÂNCIA DE <i>G. lucidum</i>	19
3.2 HISTÓRICO DE <i>G. lucidum</i>	21
3.3 TAXONOMIA E CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS	22
3.4 CARACTERES MORFOLÓGICOS	22
3.4.1 Macromorfologia	22
3.4.2 Micromorfologia.....	23
3.5 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS FUNGOS	25
3.6 β -D-GLUCANAS EM FUNGOS	26
3.7 DESENVOLVIMENTO FÚNGICO	28
3.8 MECANISMO DE AÇÃO DAS β -D-glucanas.....	29
3.9 CARCINOGENESE	30
3.10 TUMOR WALKER 256.....	31
3.11 Obtenção e transplante das células do tumor de Walker 256	31
3.12 SISTEMA IMUNOLÓGICO.....	32
3.14 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE <i>G. lucidum</i>	35
3.14.1 ATIVIDADE ANTITUMORAL E IMUNOMODULADORA	35
3.14.3 EFEITO HIPOGLICÊMICO	41
3.14.4 EFEITO HIPOTENSIVO E HIPOLIPIDÊMICO	41
3.14.5 ATIVIDADE ANTIVIRAL.....	41
3.14.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	42
3.14.7 ATIVIDADE HEPATOPROTETORA	42
3.15 MECANISMOS DE AÇÃO ANTITUMORAL E IMUNOMODULADORA DE <i>G. lucidum</i>	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 MICRORGANISMO	44
4.2 PREPARAÇÃO DO INÓCULO	45
4.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	45
4.4 ANÁLISE DO FERMENTADO	45
4.5 PREPARAÇÃO DA DIETA SUPLEMENTADA	46
4.6 ANIMAIS E INOCULAÇÃO DO TUMOR WALKER	46
4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA.....	48
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL.....	50
4.9 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	50
4.10 ANTICORPOS MONOCLONAIS.....	51
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
5- RESULTADOS	51
5.1 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	53

5.2 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	60
5.3 ÁREA DE NECROSE CELULAR.....	60
5.4 INIBIÇÃO TUMORAL.....	61
5.5 LINFONODOS	62
6. DISCUSSÃO	64
7. CONCLUSÕES	70
8.REFERÊNCIAS.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Utilização de cogumelos na medicina popular

Tabela 2 : Espécies de basidiomicetos com atividades medicinais e suas aplicações

Tabela 3: Dosagem de proteínas séricas – albumina e globulina - em miligrama por decilitro nos grupos experimentais

Tabela 4: Medida sérica de creatinina nos diversos grupos experimentais

Tabela 5: Avaliação de função hepatocelular através da medida de transaminases séricas

Tabela 6: Linfócitos auxiliares CD4+ e citotóxicos CD8+ avaliados em linfonodos dos diversos grupos experimentais

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: *Ganoderma lucidum*

Figura 2: Fotomicrografia de células de Tumor Walker 256

Figura 3: Acondicionamento dos animais

Figura 4: Dieta suplementada

Figura 5: Inoculação das células do tumor Walker 256 em ratos Wistar

Figura 6: Retirada de linfonodo axilar para dosagem de linfócitos CD4+ e CD8+

Figura 7: Visão transoperatória do tumor

Figura 8: Avaliação macrométrica tumoral

Figura 9: Diâmetro máximo do tumor nos respectivos grupos experimentais

Figura 10: Valores médios de HDL colesterol sérico nos diferentes grupos experimentais

Figura 11 : Concentrações séricas de VLDL nos diferentes grupos experimentais

Figura 12 : Concentrações séricas de triglicerídeos nos diferentes grupos experimentais

Figura 13 : Concentrações séricas de lipídeos nos diferentes grupos experimentais

Figura 14 : Dosagens séricas de proteínas nos diferentes grupos experimentais

Figura 15: Concentrações séricas de uréia nos diferentes grupos experimentais

Figura 16: Variabilidade entre grupos para os teores de creatinina sérica

Figura 17 : Índice de mitose celular nos diversos grupos avaliados

Figura 18: Área de necrose celular intratumoral nos diversos grupos estudados

Figura 19: Índice de inibição tumoral nos diversos grupos estudados

Figura 20 : Linfócitos CD4 + avaliados em linfonodos dos animais

Figura 21: Linfócitos CD8 + avaliados nos linfonodos dos animais

Figura 22 : Análise histológica para determinação de índice mitótico

Figura 23: Análise histológica para determinação de índice mitótico de massa tumoral do grupo tratado com ração G25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac- Anticorpo

BDA- Batata dextrose ágar

C3 - Fração 3 do Sistema Complemento

CD- Diferenciação de grupo (cluster)

CM- Meio de cultivo condicionado

DEAE- Dimetilaminoetil

dL - Decilitro

EL- Extrato de levedura

Gl- Glicose

GC-Grupo controle

GP- Grupo profilático

GT- Grupo tratamento

GTR- Grupo tratamento retardado

HDL- High density lipoprotein

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

HPLC- Cromatografia líquida de alta performance

IFN - Interferon

Ig - Imunoglobulina

IL- Interleucina

i.p- Intraperitoneal

KDa- Kilo Dalton

LPS - Lipopolissacarídeo

LZ-8- Ling Zhi-8

MCP-1- “Monocyte Chemoattractant Protein-1”

MNC - Células mononucleares humanas

nm - Nanômetro

pg - Picograma

pH- Potencial hidrogeniônico

PS - Polissacarídeo

PBS- Solução isosmótica de cloreto de sódio tamponada com fosfato

rpm- Rotações por minuto

Tc - Célula T citotóxica

Th- Célula T auxiliadora

TNF- Fator de necrose tumoral

AGRADECIMENTOS

Começo meus agradecimentos primeiramente a Deus, por me dar força e tornar tudo isso possível.

Para que eu desenvolvesse esse trabalho, muitas pessoas foram imprescindíveis; tão importante quanto chegar ao final dessa etapa foi saber que posso contar com minha amada Andréa, meus familiares e meus novos amigos.

Dedico essa conquista a minha futura esposa Andréa, que sempre me apoiou, me compreendeu e me deu o estímulo necessário para que eu começasse, desenvolvesse e concluísse a tese, entendendo meus limites. Amor, eu fiz o que pude!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol pelos ensinamentos, orientação e exemplo que me fez conhecer um mundo novo, o mundo da pesquisa.

A minha co-orientadora Dr^a Rosalia Rubel que dispendeu seu tempo me ensinando e me ajudando em todas as etapas de meu experimento, mostrando o que era certo, o que era errado e como se fazia.

Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes por ceder material biológico e instalações para a realização deste trabalho, meu muito obrigado.

Aos meus pais, os melhores pais do mundo, que sempre se sacrificaram para dar tudo de melhor para seus filhos, nem que para isso tivessem que abrir mão de sonhos para que pudéssemos ter os nossos.

A minha irmã Roberta, meu cunhado Evando e minha sobrinha Fernanda, que sempre me apoiaram, em minhas jornadas, fossem elas curtas ou longas, como a que passei em São Paulo.

Aos meus amigos Herta e Sérgio, sem suas ajudas, essa tese não sairia do papel.

À todos os colegas do laboratório que sempre estiveram prontos para ajudar.

RESUMO

A cada ano, 10 milhões de pessoas tem diagnóstico positivo de câncer no mundo e destes 12% evoluem para morte. A estimativa é de que até o ano de 2020 serão 15 milhões de novos casos por ano (OMS, 2004). Diante disso, diversos estudos estão sendo realizados na tentativa de se identificar as possíveis causas desse aumento desordenado, das várias formas de câncer, buscam-se alternativas para tratamentos. *Ganoderma lucidum* é um cogumelo medicinal amplamente empregado no Oriente para o tratamento de diversas doenças, inclusive o câncer. Este trabalho tem por objetivo avaliar as propriedades farmacológicas do *G. lucidum* e sua ação antitumoral em organismos vivos (ratos Wistar) inoculados com Tumor Walker 256 e alimentados com ração suplementada com 25% de *G. lucidum* obtido por fermentação em estado sólido (ração G25). O grupo experimental constituiu de ratos Wistar de 90 dias que foram divididos em 4 grupos de acordo com o início da suplementação alimentar com a ração G25. Todos os grupos foram inoculados com Tumor Walker 256 no dia zero. O grupo Controle (GC) foi alimentado com ração normal, o grupo profilático GP iniciou a alimentação suplementada 30 dias antes da inoculação do tumor, o grupo tratamento GT iniciou a alimentação suplementada no mesmo dia da inoculação do tumor, o grupo tratamento retardado GTR iniciou a alimentação suplementada 10 dias após a inoculação do tumor. Com relação à inibição tumoral, observou-se redução significativa nos grupos GT (61%) e GTR (42%) sendo que o grupo GP também obteve valores de 35%. Como parâmetro histológico foi avaliado o índice mitótico nos diferentes grupos estudados. Observou-se no grupo controle um índice de mitose celular de 29,4 mitoses por campo no grupo tratamento esse índice foi de 6,4. Essa diferença estatisticamente significativa mostra que o grupo controle apresenta um prognóstico reservado, alta malignidade. Quando oferecida de forma terapêutica a ração suplementada com *G. lucidum*, observou-se a diminuição da agressividade tumoral, o índice mitótico diminuiu para 6,4. Sugere-se que prováveis princípios ativos possam ter inibida a proliferação de células malignas induzindo a apoptose. O presente estudo corrobora a percepção da comunidade científica a respeito das propriedades antitumorais do *G. lucidum* administrado em altas doses em suplementação animal. O caminho a ser seguido é isolar e purificar as substâncias ativas nesse processo para que no futuro possa-se ter mais uma alternativa para o combate ao câncer em seres humanos.

PALAVRAS CHAVES: Tumor Walker 256; *Ganoderma lucidum*; Propriedades antitumorais.

ABSTRACT

Every year, 10 million people are diagnosed positive for cancer in the world, representing 12% of deaths. According to estimates of the WHO, by 2020 there will be 15 million additional cases per year (WHO, 2004). In view of this, a number of new studies have been carried out in an attempt to identify the possible causes of such disordered increase of the various forms of cancer, and alternatives for treatments are being sought. *Ganoderma lucidum* is a medicinal mushroom widely used in the Eastern world in the treatment of various diseases, including cancer. The present work aims at evaluating *G. lucidum*'s pharmacological properties and its tumoral action in live organisms (Wistar rats) inoculated with Walker 256 Tumor and fed on a ration supplemented with 25% *G. lucidum* obtained through solid state fermentation. The experimental group consisted of 90 days old Wistar rats which were divided into 4 groups according to the day they started their food supplementation with G25 ration. All groups were inoculated with Walker 256 Tumor on day zero. The Control group (CG) was fed a normal ration, the GP group began to receive the supplemented ration 30 days before tumor inoculation, the GTR group began to receive the supplemented ration 10 days after tumor inoculation. As far as tumor inhibition is concerned, it was possible to observe a significant reduction in groups TG (61%) and GTR (42%) besides group GP also attaining values around 35%. The counting of cellular mitosis was carried out as a parameter in the various groups under study. In the control group, a 29.4 index of cellular mitosis was observed; in the treatment group this index was 6.4. This statistically significant difference shows that the control group presents a highly malignant reserved prognosis. When the ration supplemented with *G. lucidum* was offered as a therapeutic procedure, we observed a decrease in the tumor's aggressiveness, the mitotic index decreased to 6.4. It was possible to observe that the active principle of *G. lucidum* directs physiological stimuli of the cellular apoptosis to inhibit the proliferation of malignant cells. The present study ratifies the feeling the scientific community has about the antitumoral activities of the *G. lucidum* when administered in high dosages in animal supplementation. The path to be followed is to isolate and purify the active substances in this process in order that in the future we can have another alternative for fighting cancer in humans.

KEY WORDS: Walker 256 Tumor; *Ganoderma lucidum*; Antitumoral properties.

1 INTRODUÇÃO:

Os fungos constituem um reino muito grande de organismos encontrados em diversos nichos ecológicos. Hawksworth (1991) fez uma estimativa que no mundo inteiro existam cerca de 1,5 milhão de espécies de fungos. Todavia, até o presente foram descritas apenas cerca de 69000 espécies. A tremenda discrepância entre o número de espécies conhecidas versus espécies estimadas parece relacionar-se ao fato de que a amostragem dos fungos, em muitas partes do mundo, mais especificamente em regiões tropicais e subtropicais, tem sido inadequada. Há uma certa urgência na documentação desses organismos.

Com relação a compostos para uso na medicina produzidos por fungos destacam-se os agentes antibacterianos conhecidos como penicilinas. Inicialmente a penicilina foi obtida com fins comerciais do mofo *Penicillium chrysogenum*. Detalhes relacionados à descoberta das propriedades antibacterianas deste mofo, pelo microbiologista britânico Alexander Fleming em 1928 e o subsequente desenvolvimento da penicilina como a primeira droga antibiótica, pode tornar-se uma leitura muito produtiva (WILSON, 1976; MACFARLAND, 1984; HOBBY, 1985). Outro importante grupo de compostos fúngicos relacionados às penicilinas são as cefalosporinas, produzidas por *Cephalosporium acremonium*. Esses compostos, como as penicilinas, matam as bactérias por inibir as enzimas envolvidas na biossíntese de parede.

Um outro composto fúngico, que se destacou sobre a cena biomédica em anos recentes, é a ciclosporina. Sob os nomes fantasias de “Sandimman” e “Sandimmune”, este composto é um agente imunossupressor extremamente potente. Devido à disponibilidade da ciclosporina, certos transplantes de órgãos são considerados hoje como procedimentos de rotina. Esse composto foi descoberto no início dos anos 70 em *Cylindrocarpon lucidum* e *Tolyposcladium inflatum* (BOREL, 1982), dois fungos que foram isolados de amostras do solo. Enquanto a descoberta de novos compostos de origem fúngica importantes tem diminuído nos últimos anos, há pouca dúvida que muitas outras drogas fúngicas estão por ser descobertas na natureza. Por exemplo, Stone, (1993) pesquisador em Montana isolou uma nova espécie fúngica que é capaz de produzir taxol, uma droga normalmente obtida da

casca da árvore de teixo de suprimento limitado, que tem mostrado ser promissor no tratamento de câncer ovariano.

Extratos de cogumelos vêm sendo cada vez mais comercializados como suplementos de dietas baseados na idéia, geralmente com informações pobres, de que eles aumentam as funções imunológicas e promovem a melhoria da saúde.

Para mudar isso, nos últimos anos, o valor nutritivo e terapêutico de cogumelos e seus derivados vêm sendo extensivamente pesquisados, embora a milenar medicina chinesa já os empregue em uma grande variedade de situações (JONG e BIRGHMAN, 1992).

Cogumelos medicinais têm uma história estabelecida de uso na terapia tradicional oriental. Historicamente, frações hidro-solúveis de cogumelos são usadas na medicina no oriente, onde o conhecimento e a prática no uso foi originada. Cogumelos como o *Ganoderma lucidum* tem sido colhidos e usados por centenas de anos na Coréia, China, Japão e Rússia oriental.

Nesses países prescrevem-se cogumelos para o tratamento de várias doenças como diabetes, úlceras gástricas, hipertensão arterial sistêmica e neoplasias (KIM et al., 2002).

Assim, os metabólitos dos cogumelos têm sido utilizados para vários tratamentos particularmente na forma de adição na dieta.

Vários pesquisadores têm comprovado a ação antitumoral dos cogumelos, sugerindo que os mesmos induzem uma ação imunomoduladora. Tanto a massa micelial quanto corpos de frutificação demonstram potente efeito anticarcinogênico (BAO et al., 2001; BEAUX et al., 1997). Em especial, os polissacarídeos do grupo das β -glucanas, demonstraram ação sobre uma série de eventos biológicos (WASSER, 2002).

A forma de ação parece ser de acordo com a modulação da resposta imunológica sofrida pelo organismo hospedeiro, sendo ativadas várias células imunocompetentes, como macrófagos, células T e células dendríticas (CAO; LIN, 2003; LEE et al., 2003).

G. lucidum é um basidiomiceto pertencente à família Polyporaceae, popularmente chamado de “Lingzhi” ou “Reishi”, de acordo com a denominação chinesa ou japonesa empregada. Seu corpo de frutificação tem sido usado na medicina chinesa por mais de 2000 anos desde a dinastia Ming (ZHANG et al., 2002b). Ele é utilizado de diversas formas em bebidas ou cápsulas como suplementos alimentares ou medicamentos (CHIU et al., 2000).

Muitos estudos têm demonstrado, *in vitro*, que metabólitos de *G. lucidum* são capazes de modular a resposta imunológica e inibir o crescimento de células neoplásicas (MIZUNO et al., 1996). O exopolissacarídeo (EPS) foi testado em várias linhagens de tumores humanos e verificou-se efeito inibidor de até 80% (LIU et al., 2002). Células T humanas cultivadas na presença de EPS apresentaram incremento proliferativo e estímulo na secreção de interleucinas (CHUNG et al., 2001; LEE et al., 2003). Entretanto, apesar do seu largo uso no benefício da saúde, há pouca informação a respeito de seus possíveis efeitos tóxicos (BEROVIC et al, 2003).

Na atualidade, as principais causas de morte nos países desenvolvidos e em muitos países em desenvolvimento estão fortemente atreladas à dieta que o indivíduo tem ao longo de sua vida. Obesidade, diabetes melitus, arteriosclerose, cânceres de intestino são exemplos de patologias que impactam sobremaneira na vida e economia mundial, pois o tratamento dessas doenças, já instaladas, demanda além do desgaste físico e emocional das pessoas envolvidas, quantias consideráveis de dinheiro. Evidências científicas indicam que para se reduzir o risco dessas doenças é necessário a mudança dos hábitos alimentares, incluindo na dieta substâncias capazes de modular as funções orgânicas das pessoas (MUTO et al.,1989).

Assim, buscam-se alimentos que tenham, além de seu valor nutritivo, propriedades terapêuticas. Nesse contexto, os cogumelos possuem papel de destaque, sendo que muitos produtos são formulados a partir de seu corpo de frutificação e outros mais a partir de seus esporos.

Além disso, os cogumelos são facilmente propagáveis vegetativamente, possibilitando sua obtenção em curtos períodos de tempo quando em condições controladas. Seu micélio pode ser estocado durante longos períodos de tempo mantendo suas características genéticas. Outro aspecto a ser ressaltado é que ele pode se propagar em resíduos provenientes da agroindústria ajudando assim no processo de decomposição de matérias que podem ser danosas ao meio ambiente (WASSER, 2005).

Deve-se lembrar, entretanto, que muitas espécies de cogumelos têm a habilidade de concentrar e acumular metais, desta forma, altos índices de componentes tóxicos poderiam anular qualquer benefício à saúde que uma dieta rica em cogumelos poderia conferir (BORCHERS et al. 2004).

Os metais pesados encontrados em cogumelos normalmente são oriundos da água de irrigação. Chiu et al. (2000), ao analisarem o corpo de frutificação de *Ganoderma*, encontraram um conteúdo protéico de 68,9%, uma quantidade de glicose de 11,1% e metais pesados em torno de 10,2% .

O *Ganoderma*, devido as suas propriedades medicinais evidenciadas em diversos trabalhos científicos (WASSER e WEIS, 1999), vem ganhando importância em diversos países que utilizam os cogumelos, principalmente, como nutracêutico. Esse termo é usado para uma nova classe de subprodutos que são obtidos de frutificações (cogumelos) ou do micélio, minimamente processados, e encapsulados para serem consumidos como suplementos dietéticos com propósito terapêutico. As frutificações produzidas pelo fungo podem também ser consumido *in natura*, constituindo um alimento muito apreciado em diversos países, pelo seu sabor, tornando-se assim um alimento funcional ou nutracêutico (CHANG e BUSWELL, 1996).

Na preparação dos nutracêuticos são utilizadas frutificações em diferentes estágios de maturação, fato que pode influenciar na qualidade desses subprodutos. Pesquisas já foram realizadas envolvendo outras espécies de fungos relacionando os estágios de maturação e a quantidade de substância ativa, tendo verificado, por exemplo, que existe variação no teor, na estrutura e na atividade biológica das β -glucanas (MINATO et al., 2001; MOL, 1989). A produção e o desenvolvimento de nutracêuticos de qualidade requer um conhecimento adequado dos componentes com atividade terapêutica, assim como um controle da qualidade dos produtos finais obtidos a partir do fungo.

Segundo Chang (2000), em 1999, o mercado mundial de cogumelos movimentou cerca de US 6 bilhões e os EUA movimentaram cerca de US 35 milhões no comércio de cogumelos medicinais e subprodutos. A produção e as exportações no Brasil, que é um dos maiores produtores mundiais de cogumelos, aumentaram nos últimos anos, passando a sua produção/exportação em 1996 de 7.440 Kg para 32.602 Kg em 2001, porém houve um decréscimo para 20.072 Kg em 2003 (CACE, 2001, 2004).

O interesse nas diferentes espécies é devido às propriedades anti-mutagênicas, anti-tumorais, antivirais, anti-trombótica, hipocolesterolêmica, hipolipidêmica e anti-oxidante, atividades essas relacionadas a uma ampla gama de substâncias, como ésteres, ácido linoléico e oléico, proteínas, enzimas, vitaminas e polissacarídeos (BRUM, 2005; CHEN et

al., 2004; DELMANTO et al., 2001; EGUCHI et al., 1999; GUTERREZ et al., 2004; HUANG et al., 2004; LUIZ et al., 2003; MATSUI et al., 2003; STAMETS, 1997; WASSER; WEIS, 1999).Dentre essas substâncias ativas, os polissacarídeos, como as β -glucanas, os heteropolissacarídeos e as glicoproteínas, são os principais responsáveis pela atividade antitumoral.

As β -glucanas são constituintes naturais da parede celular de bactérias, fungos e plantas, diferindo entre si pelo tipo de ligações e ramificações, características que lhes conferem estruturas específicas e ações biológicas distintas, sendo, portanto, a característica estrutural um fator fundamental para a ação das β -glucanas no sistema imunológico (JONG, 2002). Esses e outros aspectos têm estimulado os pesquisadores a estudar mais e mais suas propriedades e formas de utilização. Métodos de cultivo também são objetos de estudo para cada vez mais se otimizar a produção de β -glucanas.

G. lucidum, dessa forma, deve ser encarado não só como um alimento, mas sim como um organismo que pode nos mostrar um pouco mais sobre suas diferentes propriedades que há milênios fascinam a humanidade.

G. lucidum contribui para importantes atividades farmacológicas, principalmente como agente imunomodulador, antitumoral, hipocolesterolêmico e antioxidante (WACHTEL-GALOR et al., 2004). Os produtos naturais derivados de *G. lucidum* geralmente são extratos aquosos obtidos a partir do corpo de frutificação, sendo compostos de misturas complexas que podem conter toxinas ou metais pesados (CHIU et al., 2000). O desenvolvimento do corpo de frutificação pode levar até seis meses, de forma que o cultivo micelial de *G. lucidum* se apresenta como uma alternativa viável para a obtenção de seus princípios ativos em curto espaço de tempo e sob condições controladas (YANG; KE; KUO, 2000).

Atualmente, a radioterapia, a quimioterapia e a remoção cirúrgica constituem as formas de tratamento convencionais contra o câncer. Pelo fato desses procedimentos se mostrarem extremamente agressivos para o paciente, a procura por novos agentes antineoplásicos, de preferência com ação imunomoduladora, tem se intensificado nas últimas décadas (WASSER, 2002).

A arteriosclerose representa uma das principais causas de morte no mundo ocidental. A principal estratégia no controle dessa doença e nos distúrbios cardiovasculares dela decorrentes, é o controle dos níveis plasmáticos de colesterol (LUZ, 1993).

Diante do exposto, extrair, purificar e analisar as biomoléculas com atividade anticancerígena, presentes no *G. lucidum* é um estudo de grande relevância. Devido a sua importância como matéria prima para a produção de um novo fármaco objetivando o tratamento de neoplasias, assim como e não menos importante, um estudo que possibilitará agregar valor a um produto de origem brasileira que é exportado em grandes quantidades e na forma bruta (cogumelo seco).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve por objetivo avaliar as propriedades do *G. lucidum* e seus efeitos antitumorais em organismos vivos (ratos Wistar) inoculados com Tumor Walker 256 e alimentados com ração suplementada com 25% de *G. lucidum* obtido por fermentação em estado sólido.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Cultivar *G. lucidum* por fermentação em estado sólido, empregando grãos de trigo como substrato.

Avaliar o potencial imunomodulador e antitumoral da ração suplementada com 25% de *G. lucidum* em ratos Wistar sadios e inoculados com tumor Walker 256.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 IMPORTÂNCIA DE *G. lucidum*

Do ponto de vista taxonômico, a maioria dos cogumelos pertencem às classes Basidiomycetes e Ascomycetes. Constituem um grupo de organismos muito grande e heterogêneo encontrado virtualmente em qualquer nicho ecológico.

Os fungos são seres eucarióticos altamente eficientes na degradação de uma ampla gama de substratos, podendo apresentar-se sob a forma leveduriforme, formar um pseudomicélio ou constituir hifas, que podem se agrupar ou justapor-se, porém nunca formando um tecido verdadeiro. Estima-se que existam cerca de 1,5 milhão de espécies de fungos, sendo que destas, apenas cerca de 69 mil foram descritas. Excluindo-se os insetos, os fungos constituem os mais numerosos seres vivos do planeta (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

Os fungos são responsáveis pela produção de importantes ácidos orgânicos, como o ácido cítrico; pela produção de fármacos, como alguns antibióticos; pela produção de enzimas de interesse industrial e de elevado valor econômico, destacando-se as celulases, lacases, xilanasas, pectinases e amilases; pelo controle biológico de insetos-pragas da agricultura, pelo controle de inúmeras moléstias que atacam plantas cultivadas e pela produção de etanol. Mais ainda, sem os fungos não existiriam produtos fermentados como as cervejas e vinhos, queijos dos mais diversos tipos e muitos outros alimentos nos quais esses organismos têm papel de destaque em sua produção (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

As propriedades medicinais ou nutracêuticas de alguns cogumelos (corpo de frutificação de certos fungos) também vêm incrementando o seu valor agregado. Os cogumelos já eram utilizados desde os tempos mais remotos com finalidades medicinais para combater hemorragias, cólicas, feridas, asma e outros problemas (TABELA 1). Algumas tribos indígenas brasileiras usavam *Pycnoporus sanguineus* (orelha-de-pau, cor vermelho intenso) para a cicatrização de feridas (BONONI et al., 1995).

Tabela 1 - Utilização de cogumelos na medicina popular

Espécie	Uso
<i>Claviceps purpúrea</i>	ajuda em partos
<i>Polyporus suaveolens</i>	Tuberculose, sudorese noturna
<i>Fomes officinalis</i>	Purgante, tuberculose, sudorese noturna, diurético
<i>F. fomentarius</i>	Hemorragia
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Hemoptise, verrugas
<i>Polyporus coccineus</i>	Hemorragia, distúrbios uterinos
<i>Gastrum saccatum</i>	Hemorragia, distúrbios uterinos
<i>Trametes cupreorosea</i>	Doenças próprias do sexo feminino
<i>Ustilago maydis</i>	Espinhas, escorioses, queimaduras, ajuda em partos
<i>Calvatia cyathiformis</i>	Cicatrizante, coagulante
<i>Citocybe gibba</i>	Febre
<i>Fomitopsis pinicola</i>	Hemorragia
<i>Auricularia fuscusuccinea</i>	Fortificante da circulação sanguínea
<i>Ganoderma lucidum</i>	Tônico, inflamações, diurético
<i>G. applanatum</i>	Câncer esofágico
<i>Lentinula edodes</i>	Evita doenças causadas pela falta de vitamina D
<i>Coprinus comatus</i>	Hemorróidas
<i>Calvatia gigantea</i>	Inflamação, sangramentos, limpeza dos pulmões e garganta

FONTE: BONONI et al., 1995.

O estudo de basidiomicetos produtores de polissacarídeos com atividades imunofarmacológicas vem sendo realizado desde o final da década de 60, sendo que o crescente interesse em algumas espécies de cogumelos, devido a seus atributos medicinais e tônicos, tem contribuído para intensificar o desenvolvimento de pesquisas para avaliar tais propriedades medicinais, bem como a natureza da ação dos compostos presentes nesses cogumelos (MATHEUS e OKINO, 1999). Chang, em 1993, afirmou que produtos com propriedades medicinais ou tônicas movimentaram no ano de 1991 uma cifra de US\$ 1,2 bilhões no mundo.

O fungo *G. lucidum* é amplamente utilizado como panacéia, pelos chineses, há mais de dois mil anos. Atualmente vários grupos de pesquisadores da China, Estados Unidos, Tailândia e outros países estão estudando as propriedades medicinais de polissacarídeos e triterpenóides de várias espécies do gênero *Ganoderma*. Tais estudos também têm demonstrado atividade biológica anti-cancerígena, além de atividade hipotensiva e hipoglicêmica.

3.2 HISTÓRICO DE *G. lucidum*

O termo **Ganoderma** advém do grego (ganos=brilho; derma=pele), em função das espécies típicas desse gênero apresentarem uma superfície brilhante e com aspecto envernizado. Denominam-se os representantes deste grupo como *G. lucidum*, embora estudos taxonômicos tenham demonstrado a existência de centenas de espécies diferentes dentro da família Ganodermatacea.

Esses cogumelos são conhecidos há milênios no oriente e dependendo da região, adquirem nomes próprios como “Lingzhi” na China e “Mannentake” ou “Reishi” no Japão. Eles são considerados “ervas da longevidade e da boa fortuna”. A forma mais comum de consumo é o chá em que o extrato aquoso é indicado para uma série de enfermidades devido as suas propriedades medicinais, como ação diurética, antiinflamatória, antimicrobiana, anti-hemorrágica, sedativa, cardiotônica e ação hipotensiva (MIZUNO, 2004).

Antigos textos chineses identificam seis grupos de *Ganoderma* em função de sua coloração. Segundo esses manuscritos, cada cor confere qualidades únicas a cada tipo. O vermelho é o mais conhecido, o qual apresenta corpo de frutificação riniforme, formando semicírculos; coloração marrom-avermelhada com aspecto lacado, ou seja, com um lustro semelhante a verniz e haste de sustentação. Outros tipos citados são o branco, violeta, amarelo, verde e preto.

Estudos mais recentes têm demonstrado ação antitumoral e imunomoduladora de polissacarídeos extraídos de *G. lucidum*, além de vários outros princípios ativos, como um grupo de terpenóides genericamente relatados como ácidos ganodéricos (GAS), com marcada atividade antiviral e inibidora de agregação plaquetária. Esses metabólitos são

fontes promissoras para o desenvolvimento de novos produtos na indústria farmacêutica e de alimentos (WASSER, 2005).

3.3 TAXONOMIA E CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS

O gênero *Ganoderma* foi estabelecido em 1881 por Peter Adolf Karsten, um renomado micologista finlandês. Na época, ele incluiu apenas uma espécie de fungo: *Polyporus lucidus*, o qual havia sido descrito no século XVI pelo botânico inglês William Curtis (KARSTEN, 1881).

A classificação dos fungos deste gênero é confusa, gerando a inclusão de centenas de espécies inadequadamente nesse táxon (MURRIL, 1902; BUCHANAN, 2001). Com o crescimento das pesquisas e do interesse comercial que este gênero vem despertando, há uma tentativa de identificá-lo mais acuradamente, principalmente com o propósito de proteção de patentes.

A família *Ganodermataceae* foi criada por DONK em 1933 para incluir fungos poliporos caracterizados por basidiósporos com dupla parede. Mais tarde, Julich (1981) introduziu o nome ordinal *Ganodermatales*.

Embora características fenotípicas sejam fundamentais para a triagem inicial dos isolados, uma classificação unicamente em dados morfológicos e culturais pode gerar dúvidas.

3.4 CARACTERES MORFOLÓGICOS

3.4.1 Macromorfologia

O desenvolvimento do basidiocarpo (corpo de frutificação) é geralmente anual e pode levar de 3 a 6 meses, dependendo da linhagem, substrato de cultivo e fatores bióticos e abióticos (URBEN, 2004). *In natura*, troncos de árvores constituídas por madeiras duras são as plantas-hóspedes usuais do *G. lucidum*, mas algumas espécies têm sido coletadas de coníferas (SEO e KIRK, 2000). O basidiocarpo pode ser sustentado por uma haste (estipe), ou ser séssil, e se apresentar umbilicado ou não umbilicado (SHIN et al., 1986). As

dimensões e a cor do basidiocarpo mostram diferenças significativas entre as espécies, sendo que a maneira da estipe se ligar ao píleo e ao hospedeiro também apresenta variação. O píleo do basidiocarpo normal é ligado lateralmente ao estipe, mas ligações tipo excêntrica, central e séssil também são produzidas. Características da estipe, incluindo tipo de ligação, diâmetro e comprimento, são consideradas ferramentas úteis para diferenciação das espécies (RYVARDEN,1991).

A característica lacada do píleo e estipe tem sido amplamente empregada na taxonomia de *Ganoderma*. De acordo com os conceitos tradicionais, a superfície de *Ganoderma* tem aspecto lacado, sendo o que o diferencia do gênero *Amauroderma*. Entretanto, algumas espécies de *Amauroderma* têm sido reportadas como lacadas (*A. austrofujianense* e *A. leptopus*), enquanto que algumas espécies de *Ganoderma* se apresentam sem laca (*G. mongolicum*).

Contudo, a característica de laca, embora não desempenhe um papel importante na separação das espécies, permanece como auxílio viável na identificação da família *Ganodermataceae* (SEO e KIRK, 2000).

A figura 1 ilustra alguns indivíduos típicos do complexo *G. lucidum*, com diferentes feitios e aspectos morfológicos. A cor da estrutura interna (contexto) varia de branco ao marrom escuro, se apresentando mutável, especialmente em isolados secos, dentro de uma mesma espécie. O tamanho e formato dos poros são, também, caracteres úteis na classificação das espécies (CORNER, 1983; ZHAO, 1989).

3.4.2 Micromorfologia

O sistema de hifas é geralmente trimítico (dividido em três séries), ocasionalmente dimítico. As hifas são hialinas de paredes finas, ramificadas, septadas ou não, formando alças entrelaçadas. Hifas esqueléticas se apresentam sempre pigmentadas, pouco ramificadas, com paredes grossas sofrendo influências de fatores ambientais (SEO e KIRK, 2000). O basídio apresenta dimensões grandes e formato em forma de clava à piriforme, com quatro esterigmas, um apêndice hilar e um a dois vacúolos.

Os basidiósporos possuem dupla parede, ovóides-elipsóides, ocasionalmente ovóides-cilíndricos, sempre truncados no ápice, de coloração acastanhada, apresentando

vacúolos. A espessura da parede não apresenta uniformidade, pois, a região do ápice é mais espessa que a base. A dupla parede é muito distinta, com a parte externa hialina e mais fina e a interna usualmente avermelhada e grossa.

Os basidiosporos têm um apêndice “hilar” excêntrico sobre uma base circular, a superfície é lisa ou enrugada, sendo que na grande maioria ocorrem pequenas depressões superficiais. Os basidiósporos, de espécimes crescidas naturalmente no Japão medem 8,5-11x 6,5 x 8,5 μm (média 10,1 x 7,5 μm) (SEO e KIRK, 2000).

Figura 1: *Ganoderma lucidum*



Figura 1: *Ganoderma lucidum*(continuação)



Fonte: SNOWARSKI, M. 2006

3.5 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS FUNGOS

Um exemplo de polissacarídeo já comercializado é o “Krestin”, nome comercial do polissacarídeo PSK, extraído do micélio de *Trametes versicolor*. O PSK é administrado via oral em tratamentos de câncer do sistema digestivo, de mama e pulmonar, movimentando cifras de US\$ 556 milhões anuais no Japão. Polissacaro-peptídeo (PSP) também foi extraído do micélio de *T. versicolor* e descrito como substância modificadora da resposta biológica no tratamento de câncer. É semelhante quimicamente ao PSK, diferindo apenas quanto à presença de alguns monossacarídeos na sua constituição (MATHEUS e OKINO, 1999). Na TABELA 2 é mostrado algumas espécies de interesse medicinal e suas aplicações.

TABELA 2 - Espécies de basidiomicetos com atividades medicinais e suas aplicações

Fungos /Basidiomicetos	Aplicações	Referência
<i>Agaricus blazei</i>	Ação anti-cancerígena.	Mizuno et al. (1990a, 1990b)
<i>Flammulina velutipes</i>	diminuição do colesterol.	Miles & Chang (1997)
<i>Gonoderma lucidum</i>	potencializador do sistema imunológico, efeitos cardiotônicos, ação anti-cancerígena, hipoglicêmico.	Hikino et al. (1985), Miles e Chang (1997), Jong & Birmingham (1992)
<i>Grifola frondosa</i>	diminuição do colesterol, ação anti-cancerígena, redução da pressão sanguínea, anti-diabético.	Kubo et al. (1993), Kubo & Nanba (1996), Stamets (1993)
<i>Hericium erinaceum</i>	Ação anti-cancerígena.	Mizuno et al. (1992)
<i>Lentinula edodes</i>	Imunopotencializador, efeito anti-cancerígeno, efeito contra HIV.	Chihara (1992), Jong & Birmingham (1992), Mizuno et al. (1992)
<i>Tremella spp.</i>	efeitos tônicos	Miles & Chang (1997)
<i>Tricholoma lobayense</i>	Ação anticancerígena	Liu et al. (1995, 1996)
<i>Volvariella spp.</i>	efeitos cardiotônicos	Miles & Chang (1997)

3.6 β -D-GLUCANAS EM FUNGOS

As β -D-glucanas foram identificadas pela primeira vez há 40 anos, e suas atividades imunomoduladoras, anti-tumoral e anti-inflamatórias têm sido amplamente estudadas e utilizadas na prática. A maioria das β -D-glucanas com atividade biológica são derivadas de fungos, particularmente as leveduras e estas substâncias são denominadas de modificadores da resposta biológica (BRM, Biological Response Modifier), pois interagem e modificam a resposta imunológica (biorregulação) do hospedeiro, controlam a homeostase, regulam o

biorrítmo, prevenindo várias doenças (DIJKGRAAF et al., 2002; JONG, 2002; ROSS et al., 1999; WASSER; WEIS, 1999).

Desde 1940, cientistas vêm pesquisando um produto obtido a partir da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, comercializado como Zymosan® na Europa. Este produto inclui a parede celular da levedura, e é constituído por proteínas, lipídios e polissacarídeos, com capacidade de ativar células independentemente do tipo de agente agressor (vírus, bactérias, fungos, parasitas ou células tumorais).

Em 1960, foi descoberto que a substância ativa da levedura era o polissacarídeo β -D-glucana, e em 1975, este composto foi testado na forma injetável, em nove pacientes com câncer maligno de pele, no National Cancer Institute, obtendo-se significativa redução das lesões, em curto período de tempo (BETA GLUCAN RESEARCH, 2003). As β -D-glucanas de *S. cerevisiae* estão disponíveis em larga escala já que esta levedura é um resíduo da indústria de fermentação cervejeira, e vêm sendo muito utilizada como produto nutracêutico (McGUFFIN, 2005).

Nutracêuticos contendo β -D-glucanas são geralmente reconhecidos como seguros (GRAS, Generally Recognized as Safe) pelo Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos, onde são comercializados na forma de extratos, cápsulas ou tabletes (BOBEK; 1997).

No entanto, no Brasil, conforme informe técnico n° 6, de 31 de janeiro de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os cogumelos, inclusive *G. lucidum*, nas formas dessecadas inteiras ou fragmentadas e em conserva são considerados alimentos e estão dispensadas da obrigatoriedade de registro (Resolução n° 23/00).

Quando avaliados e aprovados pela ANVISA, não são permitidas alegações medicamentosas e ou terapêuticas nos rótulos e no material publicitário dos cogumelos nas formas consideradas alimentos. As formas de apresentação como pós, cápsulas, tabletes, comprimidos e líquidos, dentre outras, não são considerados alimentos.

Existe polêmica no uso de produtos nutracêuticos, quanto à finalidade terapêutica recomendada aos consumidores, havendo necessidade de estudos das substâncias ativas para cada espécie, que indiquem a eficácia e segurança para tais recomendações terapêuticas (HOLT, 1994, ZEISEL, 1999).

3.7 DESENVOLVIMENTO FÚNGICO

No cultivo de uma espécie com o objetivo de produzir corpos de frutificações (ou cogumelos) diversos parâmetros ambientais devem ser considerados, distintos para diferentes fungos, tal como a temperatura, umidade, trocas de ar e luminosidade específicos em cada fase do cultivo.

A primeira fase no processo de cultivo denomina-se incubação, ou corrida miceliana, com duração de 30-40 dias e envolve o crescimento miceliano no substrato. A segunda fase consiste em propiciar o desenvolvimento dos primórdios, estrutura que precede a frutificação. Para que isso aconteça, procedimentos apropriados de indução, geralmente envolvendo modificações ambientais, como a adição de uma camada de cobertura ao substrato, e o aumento de ventilação para redução da concentração de CO₂, um inibidor de frutificação, devem ser propiciados. Esta fase denomina-se indução. A terceira e última fase consiste no crescimento do corpo de frutificação, que se denominou inicialmente primórdio e que crescendo apresenta diversos estágios tal como: botão, após o cogumelo imaturo (véu fechado, píleo fechado, e esporos imaturos) e por último o cogumelo completamente maduro (píleo aberto e esporos deiscentes) (IWADE; MIZUNO, 1997; STAMETS, 2000).

No decorrer do desenvolvimento, as hifas formam os primórdios (1 - 2 mm de diâmetro), um agregado de hifas que se orientam para a formação do botão (5 mm de diâmetro), no qual o fungo já se encontra morfogeneticamente completo, havendo apenas diferenciação do estipite (pé), píleo e lamelas que são estruturas encontradas nas frutificações em maturidade. Estas estruturas desenvolvem-se a partir de um processo de expansão das hifas existentes. A expansão das frutificações ocorre após uma elongação continuada da estipite durante 7 – 8 dias. Depois deste período, o píleo se abre, estendendo-se o véu ou anel e após o seu rompimento ocorre a liberação dos basidiosporos (esporos) marrons escuros, durante 2 – 3 dias.

Gunde-Cimerman e Cimerman (1995) verificaram que a lovastatina, substância de interesse terapêutico, obtida do fungo *Pleurotus ostreatus* encontra-se distribuída em diferentes concentrações no micélio vegetativo, nas diversas fases de maturação das frutificações, assim como nas diferentes partes estruturais da frutificação, píleo e estipe.

3.8 MECANISMO DE AÇÃO DAS β -D-glucanas

O mecanismo de ação anti-tumoral das β -D-glucanas é diferente da quimioterapia convencional, já que atua ativando e reforçando as diversas funções imunológicas do hospedeiro. Constitui-se, portanto, em um tratamento do tipo imunoterápico, na ativação de células NK, macrófagos, liberação de citocinas/interleucinas, estimulação de células T, produção de anticorpos (MIZUNO, 1999; JONG, 2002; BETA GLUCAN RESEARCH, 2003).

As β -D-glucanas são reconhecidas pelo sistema imunológico inato de vertebrados através de receptores de superfície celular, designados primariamente para o controle de patógenos fúngicos (BORCHERS, 2004). Elas reconhecem e se ligam a receptores de diversas células humanas, principalmente leucócitos do sistema imunológico, incluindo macrófagos, monócitos, neutrófilos, e NK (Natural Killer), como também de células não imunológicas como as endoteliais, e os fibroblastos (BROWN; GORDON, 2003). Recentemente, foram descobertos os receptores de β -D-glucanas: CR3, dectin-1 e lactosilceramida.

Os CR3 (receptor do complemento) são receptores celulares responsáveis por diversas atividades *in vitro* e *in vivo*, estimulando a secreção de citocinas (TNF- α , IFN- α , IFN- γ , e IL-6) em células NK, principalmente na presença de patógenos (ROSS et al., 1999).

Os receptores do tipo dectin-1 possuem um ligante para polissacarídeos exógenos e outro ligante co-estimulatório para células T. Estão presentes nas células dendríticas, células apresentadoras de antígenos, com potente capacidade de ativar células T do baço e timo, nas células de Langerhans da pele (WANG et al., 1994) e também em macrófagos, principalmente do fígado, pulmão e timo (ZHANG, 2002).

Alguns estudos demonstraram que os receptores celulares do sistema imunológico, dectin-1 de monócitos e macrófagos e lactosilceramida de linfócitos, por exemplo, reconhecem principalmente as ligações do tipo (1.3)- β e (1.6)- β (BROWN e GORDON, 2003; MONCALVO et al., 1995). No entanto, não há um consenso sobre a estrutura básica requerida para a atividade biológica das β -D-glucanas. Características importantes das β -D-glucanas que interferem na bioatividade são o peso molecular, o tipo de ligação e o grau de ramificação da cadeia principal (MIZUNO, 1999).

3.9 CARCINOGENESE

A carcinogênese pode ser dividida em três estágios: inicialização, promoção e progressão. A fase de inicialização envolve a exposição a substância mutagênica e geralmente requer sua subsequente transformação metabólica para uma forma biologicamente ativa. Essa exposição, mesmo se resultante em um dano permanente ao DNA, é geralmente insuficiente para causar o câncer. Pelo menos em tumores induzidos quimicamente em animais experimentais. Um promotor do tumor é necessário para estimular a divisão celular resultando na formação de tumores benignos. Uma fase similar de promoção é aquela que existe em cânceres idiopáticos, mas os eventos ainda são pouco conhecidos. Progressão para malignidade ocorre quando os rígidos controles que normalmente governam o ciclo de vida da célula são quebrados, resultando numa proliferação descontrolada de células cancerosas. Também envolve a habilidade dessas células de invadir tecidos vizinhos e até metastatizar. A modulação do sistema imunológico do hospedeiro atribuído aos cogumelos, particularmente aos vários polissacarídeos, é basicamente afetando primariamente as fases de promoção e progressão. Outras substâncias contidas nos cogumelos podem ser capazes de interferir com a iniciação tumoral através de uma variedade de mecanismos, como o aumento da capacidade antioxidante do hospedeiro ou o estímulo das enzimas da fase I e fase II envolvidas na transformação metabólica e detoxificação de componentes mutagênicos. Ainda, outros constituintes dos cogumelos podem inibir a promoção ou progressão exercendo citotoxicidade direta contra células tumorais, interferindo com a angiogênese tumoral ou estimulando outros mecanismos supressores tumorais não imunes.

Resultados sugerem que extratos de cogumelos contém componentes que podem modular a gênese tumoral e a carcinogênese em diferentes estágios e podem atuar no mesmo estágio mas através de diferentes mecanismos. Mais, eles podem prover adicional ou mesmo sinérgicos efeitos na prevenção e tratamento do câncer.

Estudos pgressos mostram que vários polissacarídeos são potentes indutores de citocinas proinflamatórias, enquanto outros os regulam negativamente.

3.10 TUMOR WALKER 256

O tumor de Walker 256 é um carcinosarcoma, que se desenvolveu espontaneamente na região da glândula mamária de uma rata grávida e que foi descoberto em 1928 por George Walker no John`s Hopkins University School of Medicine. Foi localizado na parede abdominal esquerda com tamanho semelhante ao de uma noz. Observou-se que durante a lactação o tumor regredia, mas retomava o crescimento após o desmame (EARLE, 1935). Em 1935 e 1954, esse tumor foi transplantado em ratos Sherman por inoculação subcutânea, sendo palpável em uma semana e, levando a morte dos animais após seis semanas.

Após 15 dias do transplante subcutâneo, o tumor foi descrito como uma massa firme, esférica, lobulada e parcialmente encapsulada, promovendo metástases nos linfonodos pulmonares, regionais e ocasionalmente retroperitoniais (VILLAS BOAS; 1988).

Dois subtipos de carcinomas de Walker 256 têm sido investigados por apresentar diferenças marcantes na interação com o organismo do hospedeiro. O tipo A, invasivo e metastatizante, tem um lento ritmo de crescimento induzindo a anorexia e caquexia somente na fase terminal, garantindo uma sobrevivência média de 27 a 30 dias. Ao contrário, o tipo B, não- invasivo e de crescimento rápido, induz a anorexia e a caquexia precoce com sobrevida de somente 15 dias. Logo, esse último tornou-se um importante modelo para estudos da caquexia induzida pelo câncer (ALVES; 2004).

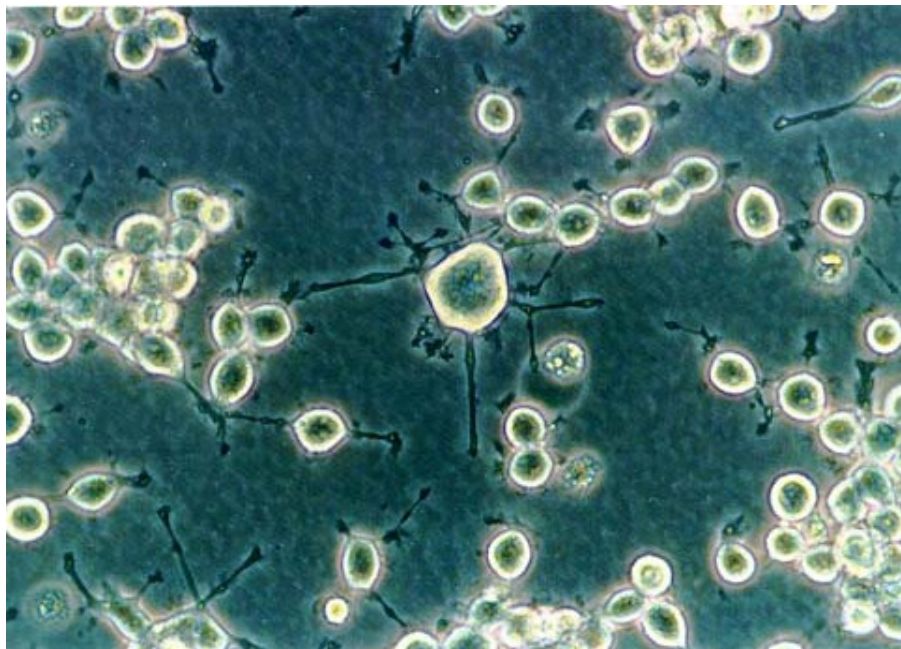
É um dos poucos modelos de tumores, disponíveis para estudos experimentais nas áreas médicas e biológicas em diferentes linhas de pesquisa (OLIVEIRA PFM; 1998).

Esse tumor tem a vantagem de ser facilmente obtido *in vivo* pela inoculação de células em ratos, desenvolve rapidamente e falhas de inoculação e regressão espontânea são pouco freqüentes. Mas o comportamento do mesmo modifica nos sucessivos implantes, as técnicas de inóculo empregadas são diferentes ou não são citadas por muitos autores, dificultando a comparação dos resultados observados em diferentes laboratórios. Também tem a característica de apresentar grande agressividade, crescimento muito rápido e pequeno período de latência.(ALVES; 2004).

3.11 Obtenção e transplante das células do tumor de Walker 256

Após a morte do animal portador de tumor ascítico de Walker 256, injeta-se 10mL de solução salina 0,9% na cavidade abdominal tomando-se cuidado para não perfurar o intestino. Em seguida, massageia-se a região e abre-se o abdômen de forma a favorecer a entrada de uma pipeta tipo Pasteur para a retirada do líquido ascítico, o qual deverá ser armazenado em um tubo Falcon 50mL em gelo com 1mL de EDTA para evitar a coagulação do sangue. Com o auxílio de um Ependorfe 2mL, coloca-se no mesmo 1980 μ L de salina 0,9% mais 20 μ L de célula, e desse meio formado por salina e células tumorais, entre outros constituintes, retira-se 20 μ L de meio mais 20 μ L de azul tripan e realiza-se contagem das células na câmara de Neubauer.

Figura 2: Fotomicrografia de células de tumor Walker 256



Fonte: CIPOLLA NETO 2004.

3.12 SISTEMA IMUNOLÓGICO

Os principais componentes do sistema imunológico são os leucócitos que podem ser classificados em dois grupos funcionais: os fagócitos (mastócitos, monócitos/ macrófagos,

neutrófilos e basófilos) e os linfócitos (células T e B). Outro componente celular fundamental para o sistema imunológico é a célula “natural killer” (NK) (STITES; TERR; PARSLOW, 1997). Cada classe específica de células pode ser diferenciada através de antígenos de superfície denominados CD (diferenciação de grupo).

Os macrófagos se originam na medula óssea, atingem a circulação como monócitos e finalmente se tornam macrófagos maduros, virtualmente espalhados por todos os tecidos e coletivamente inseridos no “sistema fagocítico mononuclear”. Funcionam como células apresentadoras de antígenos (APC), além de controlarem a proliferação e diferenciação de linfócitos através da síntese de mediadores químicos. Alguns macrófagos têm receptores manose-específicos, denominados CD14, que reconhecem carboidratos e lipídeos bacterianos ou de fungos (ERWIG et al., 1998).

As células NK derivam da medula óssea e formam uma linhagem linfóide distinta, cuja atividade contra células tumorais ou infectadas por vírus é espontânea, ou seja, não necessita de contato prévio com o antígeno. Além de outras proteínas, as células NK secretam perforinas, que são enzimas capazes de lesar a membrana celular das células-alvo (KODAMA et al., 1999).

O sistema imunológico é dividido em inespecífico (inato ou natural) e específico (adquirido) (McNEELA; MILLS, 2001).

As defesas inespecíficas atuam como uma primeira linha de ataque e compreendem as reações de febre e inflamação, o mecanismo de fagocitose, a ação de anticorpos circulantes e as defesas moleculares. As defesas moleculares envolvem a ação de mediadores químicos produzidos pelas células, como o interferon (IFN) e o sistema complemento (C) (STITES; TERR; PARSLOW, 1997). A imunidade específica é controlada por células B e T, após exposição a antígenos. Os linfócitos B participam da resposta humoral e, quando ativados, se diferenciam em plasmócitos, células capazes de secretar imunoglobulinas (Igs), que atuam como anticorpos (McNEELA e MILLS, 2001). Os linfócitos B se proliferam *in vitro* com adição de mitógenos como lipopolissacarídeos de parede bacteriana (LPS) (COLIGAN et al., 1992).

Os linfócitos T, responsáveis pela imunidade celular, atuam modulando a resposta imunológica através da produção de mediadores químicos e ativando outras células do sistema imunológico. As células T (CD3+) somente reconhecem antígenos apresentados na

superfície celular de células apresentadoras de antígenos (APC), sendo que essas células processam o antígeno e o apresentam ligado em sua superfície a proteínas pertencentes ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (McNEELA; MILLS, 2001). A proliferação *in vitro* dos linfócitos T ocorre com o emprego de mitógenos como a concanavalina A (Con-A) (COLIGAN et al., 1992). As células T são divididas em duas classes distintas: células T auxiliares CD4+ (Th) restritas ao MHC-II, que medeiam seus efeitos pela secreção de citocinas; e células T citotóxicas CD8+ (Tc) restritas ao MHC-I, que também secretam citocinas, mas atuam principalmente pela lise direta das células tumorais (ROSEMBERG, 1993; MCNEELA; MILLS, 2001). Os linfócitos Th são os principais coordenadores da resposta imunológica, os quais se diferenciam em subgrupo Th1 e Th2, por ação de diferentes citocinas. As células Th1 atuam na ativação de macrófagos, células Tc, reações de hipersensibilidade e reações inflamatórias. As células Th2 atuam na estimulação de linfócitos B, nas respostas alérgicas e anti-helmínticas. Cada grupo de citocinas produzida por um desses tipos celulares inibe a produção de citocinas pelo outro tipo, de forma que Th1 e Th2 se autoregulam (O'SHEA; MA; LIPSKY, 2002).

3.13 SISTEMA IMUNOLÓGICO E CÂNCER

O sistema imunológico do hospedeiro desempenha um papel fundamental na destruição precoce da célula tumoral ou mesmo na regressão de tumores já estabelecidos. A resistência às células tumorais depende de mecanismos humorais e celulares. As células tumorais podem ser fagocitadas por macrófagos ou lisadas por linfócitos Tc (CD8+). De grande importância também são as células NK, as quais utilizam mecanismos de lise celular semelhantes aos gerados pelas células CD8+, porém não necessitam da intervenção de APCs (SELIGER; MAUERER; FERRONE, 2001). No primeiro estágio do mecanismo de defesa do hospedeiro, a célula tumoral, recoberta por anticorpos, se liga à fração C3 do complemento, induzindo sua clivagem, este por sua vez se liga a receptores em fagócitos, desencadeando o processo de “citotoxicidade mediada por célula-dependente de anticorpo” (ADCC) (CHEUNG et al., 2002). Porém, o mecanismo de defesa mais eficaz contra células transformadas depende do repertório de células T. Os linfócitos Th (CD4+), ao reconhecerem antígenos tumorais apresentados por APCs via MHC-II, secretam citocinas

que vão ativar e regular a atividade de todas as células efetoras. Diferentes citocinas vão modular a expressão de Th-1 ou Th-2 (O'SHEA; MA; LIPSKI, 2002). As células Th-1 produzem IFN- α e IL-2, que ativam células Tc a exercerem a atividade citolítica, via MHC-I, contra a célula tumoral. As células Th-2 auxiliam produzindo IL-4, IL-5, IL-10, as quais vão estimular linfócitos B a produzirem anticorpos antitumorais. Os linfócitos B, com imunoglobulinas contra antígenos tumorais, podem também desempenhar importante papel na apresentação de antígenos tumorais às células Th (ROSEMBERG, 1993).

3.14 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *G. lucidum*

Tradicionalmente, se atribui ao *G. lucidum* múltiplos efeitos medicinais: diurético, hepatoprotetor, cardiotônico, normalizador da pressão sangüínea, hipoglicêmico, anticoagulante, hipocolesterolêmico, antimicrobiano, antiinflamatório, antialérgico, antitumoral, antiviral, analgésico e imunomodulador (MIZUNO, 2004). Esse amplo espectro de ação de *G. lucidum* resulta da interação entre seus vários princípios ativos, como triterpenóides, polissacarídeos, proteínas, lectinas, aminoácidos, nucleotídeos, alcalóides, esteróides, lactonas, ácidos graxos e enzimas (BEROVIC et al., 2003).

3.14.1 ATIVIDADE ANTITUMORAL E IMUNOMODULADORA

Friendscho et al. (1993) relatam potente efeito mitogênico de LZ-8(Ling Zhi) sobre linfócitos periféricos humanos. A incubação dos linfócitos com LZ-8 foi seguida pelos seguintes eventos: 1) produção de moléculas associadas com ativação e proliferação de linfócitos, como IL-2, INF- γ , TNF- α , IL-1 β e a expressão do receptor de IL-2; 2) formação de agregados celulares e aumento na expressão de moléculas de adesão intracelular (ICAM-1) sobre células T; 3) proliferação de células T. Segundo os autores, LZ-8 é um potente ativador de células T, apresentando um grande potencial terapêutico para ser empregado *in vivo* como imunomodulador.

Hem et al. (1995) relatam a atividade mitogênica de LZ-8 sobre células mononucleares humanas (MNC) e também o seu efeito imunossupressor *in vitro e in vivo*. Em dois diferentes modelos de transplante de tecidos alogênicos, LZ-8 provou ter uma

significante ação sobre a imunidade celular. A administração intraperitoneal de LZ-8 (7,5 mg/Kg), em um modelo de transplante alogênico de pele em rato, aumentou o tempo de sobrevivência. Em outro modelo de transplante alogênico de pâncreas em rato, LZ-8 (5 mg/Kg) foi efetiva em retardar o processo de rejeição. Não foram detectados efeitos colaterais sérios de LZ-8 nesses experimentos, a não ser uma pequena perda de peso nos primeiros dias pós-transplante. Nos experimentos com MNC humanas foi observada forte atividade mitogênica, porém LZ-8 não apresentou efeito estimulador notável sobre linfócitos T purificados, indicando que LZ-8 requer monócitos como células acessórias. Segundo os autores, LZ-8 poderá se tornar um novo agente imunossupressivo, requerendo para isso estudos futuros a respeito do seu modo de ação, dosagem e toxicidade.

WANG et al. (1997) cultivaram MNC humanas com diferentes concentrações de polissacarídeos (PS) de *G. lucidum* (3,13 – 400 µl/mL). A seguir, o sobrenadante do cultivo celular condicionado (MC) foi coletado, filtrado e estocado até o momento de uso. A análise do sobrenadante do MC mostrou que os níveis de IL-1β, TNF-α e de IL-6 foram mais elevados em relação ao controle não tratado. A produção de IFN-γ por linfócitos T também foi promovida na presença de polissacarídeo. O sobrenadante do MC foi incubado com MNC, na presença de polissacarídeo (PS-MNC-MC) (100µl/mL) e na ausência de polissacarídeo (MNC-MC). Células humanas leucêmicas foram cultivadas tanto na presença, quanto na ausência de PS-MNC-MC e de MNC-MC. Para fins de controle, células leucêmicas foram cultivadas com PS puro. O preparado PS-MNC-MC suprimiu a proliferação de linhagens celulares leucêmicas, por indução de apoptose e inibição de clonogenicidade. Entretanto, o polissacarídeo sozinho não apresentou efeitos, mesmo em altas doses (400 µl/mL). O preparado MNC-MC produziu pouca, ou nenhuma, citocina e não suprimiu o crescimento de células leucêmicas. Os autores sugerem que a atividade antitumoral de *G. lucidum* ocorre via sistema imunológico, através da ativação de células efectoras.

CHUNG et al. (2001) relatam a extração e caracterização de duas frações polissacarídicas do caldo de cultura de *G. lucidum*, sendo uma fração solúvel em água (A) e outra insolúvel em água (C). A amostra A apresentou a taxa molar de 3,6:1,5:0,5:2,1 (glicose:galactose:xilose:manose) e peso molecular de 1,2x10⁶ Dalton. A amostra C apresentou taxa molar de 1,7:1,9:1,0:0,2 (glicose:galactose:xilose: manose:frutose) e

peso molecular de $1,0 \times 10^6$ Dalton. As duas frações A e C foram testadas frente a várias linhagens celulares, como hepatocarcinoma humano (Hep3B), carcinoma humano de pulmão (A549), células humanas de câncer de estômago (AGS), células de leucemia humana (HL-60), células humanas normais de pulmão (WRL68), células T humanas (H9) e células CHO (Chinese Ovary Hamster Cell). Ambas as amostras apresentaram atividade antitumoral e antimutagênica, porém a amostra C foi mais eficaz.

Ambas as amostras promoveram a proliferação das células T humanas, sendo que a amostra C também elevou os níveis de IL-6 e TNF- α . A amostra C promoveu um aumento de 58% na taxa de diferenciação de células HL-60, contra 18% do controle.

NOTAS: AGS: linhagem cancerosa de estômago; A549: linhagem cancerosa de pulmão.

A: fração solúvel em água.

C: fração insolúvel em água

BAO et al. (2001a, 2001b) descrevem o isolamento de diferentes glucanas a partir de esporos de *G. lucidum*, das quais foram obtidos vários derivados funcionais. A atividade imunológica dessas glucanas e seus produtos de degradação, ou de substituição, foram investigados em camundongos (50 mg/Kg, via intraperitoneal, por quatro dias). A produção de anticorpos foi pesquisada em camundongos imunizados, com eritrócitos de carneiro a 5%, antes de iniciar o tratamento com os polissacarídeos.

Após o tratamento foram pesquisados os níveis séricos de IgG e complemento (C3) e a capacidade proliferativa das glucanas foi testada em cultivo de células esplênicas provenientes dos camundongos. A atividade proliferativa da glucana β -(1.3) nativa foi menor, porém resultou na elevação dos níveis séricos de C3. A glucana β -(1.3) degradada apresentou melhor atividade proliferativa, além de aumentar a produção de IgG, entretanto não teve efeito notável sobre os níveis séricos de C3. Os resultados sugerem que tanto o comprimento quanto o grau de substituição na cadeia principal interferem na atividade biológica das glucanas. Segundo os autores, a atividade biológica das glucanas pode estar relacionada com alto grau de ramificação, tamanho das cadeias laterais e configuração em solução aquosa.

Cao e Lin (2002, 2003) estudaram o efeito regulatório de polissacarídeos de *G. lucidum* sobre a maturação de células dendríticas e seu efeito ativador sobre linfócitos Tc. As células dendríticas são apresentadoras de antígenos, funcionando como iniciadoras da

resposta imunológica primária. Os autores relatam a capacidade do polissacarídeo de promover não somente a maturação dessas células, mas também induzir a sua resposta imunológica inicial. Nesse estudo, as células Tc aumentaram a produção de IFN- na presença de células dendríticas previamente tratadas com o polissacarídeo.

Berovic et al. (2003) testaram a atividade imunomoduladora de β -D glucanas extraídas de *G. lucidum* desenvolvido por fermentação submersa. Os polissacarídeos foram adicionados a cultivos de células mononucleares humanas, nas concentrações de 3,25 a 400 μ g/mL. Os autores relatam uma indução na produção de TNF- α comparável à ação de “romurtide”, um fármaco que já vem sendo usado como terapia de suporte no tratamento de pacientes com câncer.

Lee et al. (2003a) obtiveram polissacarídeos de micélio de *G. lucidum* os quais foram testados na sua totalidade e separados da fração protéica. A fração unicamente polissacarídica foi adicionada a cultivos mistos de células leucêmicas e MNC, induzindo apoptose e diferenciação nas células neoplásicas. Também foi observado estímulo sobre as MNC, as quais aumentaram a secreção de TNF- α , IFN- γ . e IL-1 β . Quando injetado intraperitonealmente, o polissacarídeo aumentou a sobrevida de camundongos implantados com carcinoma de pulmão, sozinho ou em associação com carcinostáticos. Na ausência de MNC, o polissacarídeo sozinho não exerceu atividade citotóxica sobre células neoplásicas e a sua ação antitumoral foi abolida por pré-tratamento dos camundongos com ciclosporina. A partir desse estudo, os autores concluíram que a fração polissacarídica foi a responsável pelos efeitos imunomoduladores observados.

As oncoproteínas Ras atuam transmitindo sinais dos receptores tirosinoquinases, presentes na membrana plasmática, para o núcleo, estimulando a proliferação e diferenciação celular. Se uma forma hiperativa de Ras é sintetizada pela célula, ocorre indução ao câncer através da ruptura dos mecanismos celulares de controle da proliferação e diferenciação celular. Essas oncoproteínas tornam-se ativas após sofrerem uma modificação pós transcricional por ação da farnesil proteína transferase (FPT), que possibilita a sua associação aos receptores de membrana. Em cerca de 30% dos casos de câncer em humanos é possível detectar essa mutação no gene ras. A inibição da ação da FPT sobre a Ras constitui uma importante estratégia terapêutica contra o câncer (ALBERT et al., 1997).

Lee et al. (1998) demonstraram a ação antiproliferativa dos ácidos ganodéricos sobre células cancerosas, via inibição da FPT, interferindo diretamente no fenômeno de transformação celular.

Cheung et al. (2000) relatam a atividade antiproliferativa de extrato aquoso de micélio de *G. lucidum* sobre células de feocromocitoma (PC12) de rato. As células PC-12 foram induzidas a apoptose por privação do fator de crescimento neuronal (NGF) e, a seguir, tratadas com o extrato aquoso, o qual reduziu em 15% as células apoptóticas. Não houve efeito citotóxico. Foi constatado também que o extrato induziu a expressão de marcadores de diferenciação celular próprios dos neurofilamentos, que são as principais proteínas do citoesqueleto neuronal. O extrato interferiu na via de sinalização liderada pelas oncoproteínas Ras e sobre as proteínas ligadoras do elemento de restrição do AMP cíclico (CREB), as quais atuam sobre as vias de sinalização dos processos de aprendizagem e memorização. Segundo os autores, *G. lucidum* apresenta potencial para ser empregado como fármaco antiapoptótico coadjuvante no tratamento de doenças neurodegenerativas. Recentemente, CHUNG et al. (2005) depositaram a patente de um produto à base de esporos germinados de *G. lucidum* para promoção da proliferação e diferenciação de células tronco-neuronais, objetivando o tratamento de injúrias da medula espinhal.

Sliva et al. (2002) testaram suplementos dietéticos, feitos a partir de esporos purificados e do corpo de frutificação de *G. lucidum*, contra formas altamente invasivas de câncer de seio e de próstata. Os ensaios foram feitos incubando linhagens de células cancerosas de seio (MDA-MB-231) e de próstata (PC-3) com suspensões do suplemento dietético. Houve inibição da transcrição de fatores constitutivos que conferem alta capacidade invasiva para essas células neoplásicas, culminando na supressão da migração celular. O produto à base de *G. lucidum* inibiu a expressão do ativador de uroquinase tipo-plasminogênio (uPA), o qual é uma protease que regula a motilidade das células de câncer mamário. A uPA cliva a matriz extracelular e também está envolvida no processo de adesão celular e migração, desempenhando importante função nos processos de metástases.

Lin et al. (2003) demonstraram a ação antitumoral seletiva de triterpenos de *G. lucidum* sobre uma linhagem celular de hepatoma humano Huh-7. O triterpeno causou um rápido decréscimo na atividade da proteína quinase C (PKC), que regula o crescimento celular, resultando em uma parada do ciclo celular na fase G2. Segundo os autores, a

atividade dos triterpenóides foi similar ao do fármaco anticâncer “Taxol”, o qual atua suspendendo o ciclo celular na fase G2.

Sirivichayakul (2004) relata a ação de extratos de *G. lucidum* e *Lentinula edodes* sobre células mononucleares humanas (MNC), provenientes de indivíduos normais e com HIV-1. As células mononucleares periféricas foram cultivadas com diferentes concentrações dos extratos. *G. lucidum* foi mais eficaz do que *L. edodes*, promovendo mitogênese e induzindo a expressão de células Th CD4 +, porém as células Tc CD8+ não foram afetadas. O extrato de *G. lucidum* foi mais atuante sobre células provenientes de indivíduos com imunodeficiência leve à moderada (HIV-1 assintomáticos), quando comparados com indivíduos normais ou pacientes com imunodeficiência severa (HIV-1 sintomáticos). Segundo o autor, esses resultados evidenciam o efeito imunorestaurador de *G. lucidum* nos estágios iniciais da doença.

Koji, Hiroshi e Kazuhisa (2005) patentearam um produto à base de extrato de Ganoderma, o qual inibe a ação de metaloproteinases, enzimas que degradam a matriz extracelular e estão implicadas em uma série de eventos biológicos, como periodontite, ulcerações, artrite reumatóide, osteoporose, envelhecimento da pele e metástases de células neoplásicas.

3.15.2. AÇÃO SOBRE A ANGIOGÊNESE

A terapia antiangiogênica é vista como um importante aliado nos regimes de tratamento contra o câncer, impedindo a vascularização do tumor e, conseqüentemente, a sua alimentação com nutrientes provenientes do sangue. Vários inibidores endógenos da angiogênese, incluindo a angiostatina (GATELY et al., 1997) e a endostatina (SASAKI et al., 1998) têm sido relatados.

Na literatura existem poucos e conflitantes relatos sobre a interferência de metabólitos de *Ganoderma* sobre os mecanismos que regem a angiogênese. SU et al. (1997) descreveram um polissacarídeo, extraído de corpo de frutificação de *G. tsugae*, com potencial aplicação como substituto de pele. As lesões produzidas em pele de ratos foram quase que totalmente cicatrizadas, quando recobertas com o biomaterial formulado à base do polissacarídeo. Os autores sugerem que o efeito cicatrizante foi resultado da ativação de

macrófagos residentes na pele (células de Langerhans), os quais produzem mediadores químicos, como o fator de crescimento epidermal e o fator angiogênico, que aceleram o processo de cicatrização.

SONG et al. (2004) demonstraram efeito antiangiogênico de extrato alcoólico, obtido do corpo de frutificação de *G. lucidum*, sobre membrana corioalantóide de embrião de galinha. Esse extrato também inibiu a produção de óxido nítrico por macrófagos de camundongo. Os autores relatam experimentos que comprovam a indução de angiogênese, em células endoteliais, pelo fator de crescimento endotelial vascular associado ao NO (VEGF)-NO. Concluem que a ação inibitória do extrato de *G. lucidum* sobre a produção de NO em macrófagos pode estar relacionada com a sua ação antiangiogênica.

3.14.3 EFEITO HIPOGLICÊMICO

TOMODA et al. (1986) relatam atividade hipoglicêmica de dois polissacarídeos, ganoderans B e C, extraídos do corpo de frutificação de *G. lucidum* em camundongos normais. Após 24 horas da administração via intraperitoneal dos polissacarídeos, foi observada uma redução de 83% nos níveis plasmáticos de glicose. GAO et al. (2004) demonstraram a atividade hipoglicêmica de polissacarídeos de *G. lucidum* em 71 pacientes portadores de diabetes mellitus tipo II.

3.14.4 EFEITO HIPOTENSIVO E HIPOLIPIDÊMICO

O emprego popular de Lingzhi como agente hipocolesterolêmico e hipotensivo tem despertado o interesse da comunidade científica sobre essas importantes propriedades. Kabir, Kimura e Tamura (1988) relataram o efeito hipotensor e hipocolesterolêmico de caldo de cultura de *G. lucidum* em ratos hipertensos. O efeito hipotensor pode ser atribuído à ação inibitória dos ácidos ganodéricos sobre a angiotensina-I que é relacionada com hipertensão (MIZUNO, 2004).

3.14.5 ATIVIDADE ANTIVIRAL

Eo et al. (1999) demonstraram a atividade anti-herpética, in vitro, de polissacarídeos extraídos do corpo de frutificação de *G. lucidum* contra o vírus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e tipo 2 (HSV-2).

Kim et al. (2000) relatam proteínas ácidas ligadas a polissacarídeos, extraídas de corpo de frutificação de *G. lucidum*, exercendo atividade anti-herpética em combinação com os agentes antivirais IFN- α e IFN- γ . Os resultados demonstraram um sinergismo entre as substâncias, sugerindo a possibilidade do desenvolvimento de um novo agente antiviral.

Min et al. (1998) relataram dois triterpenos tipo-lanostase, lucidumol A e ácido ganodérico- β , isolados de esporos de *G. lucidum*, com significativa ação inibidora sobre a atividade da protease do HIV-1.

3.14.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Espécies reativas de oxigênio produzidas pela luz solar, luz ultravioleta, radiação ionizante, reações químicas e processos metabólicos apresentam uma grande variedade de efeitos patológicos, causando danos à molécula de ácido desoxirribonucléico (ADN) e levando à degeneração celular. Polissacarídeos de *G. lucidum* podem reduzir a quebra da fita de ADN causada por luz ultravioleta e atenuar a formação de ânions super óxido em células leucêmicas humanas (LEE et al., 2001).

Pesquisas têm demonstrado a ação protetora de polissacarídeos de *G. lucidum* sobre macrófagos submetidos à agressão com diferentes espécies reativas de oxigênio (SHI et al., 2002; YOU; LIN, 2002).

Segundo Liu, Ooi e Chang (1997), a atividade neutralizante de radicais livres, encontrada em extratos de vários tipos de cogumelos, pode ser dependente da relação polissacarídeos/proteínas. Pesquisando oito diferentes cogumelos, os autores relatam que o lentinan (polissacarídeo com ação antitumoral extraído de *Lentinula edodes*), que contém apenas traços de proteínas, não demonstrou ação antioxidante. Em contraste, polissacarídeos de *Coriolus versicolor* e *G. lucidum*, nos quais o conteúdo protéico é mais elevado, tiveram forte atividade antioxidante.

3.14.7 ATIVIDADE HEPATOPROTETORA

A β -glucoronidase é uma enzima relacionada a danos hepáticos e sua inibição resulta em efeito hepatoprotetor. KIM et al. (1999) relatam o ácido ganoderênico A de *G. lucidum* exercendo efeito inibidor sobre os níveis séricos dessa enzima em ratos Wistar, após indução de dano hepático com tetracloreto de carbono. ZHANG et al. (2002b) demonstraram o efeito protetor de polissacarídeos de *G. lucidum* sobre células hepáticas de camundongos infectadas com BCG (Bacilo de Calmette-Guérin). Os danos hepáticos foram avaliados pelos níveis de alanina aminotransferase (ALT) e de NO. Também foram analisados cortes histológicos do fígado e alterações de peso nesse órgão. A administração do polissacarídeo mitigou significativamente a tumefação hepática, diminuiu os níveis de ALT e a produção de NO.

3.15 MECANISMOS DE AÇÃO ANTITUMORAL E IMUNOMODULADORA DE *G. lucidum*

Os mecanismos moleculares envolvidos nas atividades biológicas de *G. lucidum* ainda não foram totalmente desvendados.

Múltiplas formas de ação têm sido descritas:

- 1) inibição pós-transcricional de oncoproteínas (LEE et al., 1998);
- 2) inibição da ADN polimerase (MIZUSHINA et al.; 1999);
- 3) indução de apoptose (IWARI et al., 1999; CHUNG et al., 2001; HSU et al., 2002);
- 4) inibição de apoptose em neutrófilos humanos (HSU et al., 2002);
- 5) ação via sistema imunológico (WANG et al., 1997; CHUNG et al., 2001);
- 6) inibição constitutiva de proteínas que promovem a migração de células neoplásicas (SLIVA et al., 2002);
- 7) suspensão do ciclo celular na fase G2 em células de hepatoma (LIN et al., 2003);
- 8) atividade antimutagênica (LU et al., 2002);
- 9) inibição da angiogênese (SONG et al., 2004);
- 10) inibição de metaloproteases (KOJI; HIROSHI; KAZUHISA, 2005).

Como os princípios ativos de *G. lucidum* são absorvidos pelo organismo e qual rota metabólica eles seguem são questões que ainda não estão esclarecidas.

Segundo Hong et al. (2004), β -glucanas, administradas via oral, são captadas por macrófagos e transportadas para o baço, linfonodos e medula óssea. Dentro da medula óssea, os macrófagos degradam essas moléculas em pequenas frações solúveis que se ligam a receptores CR3 de granulócitos.

Outros pesquisadores relatam que polissacarídeos de *G. lucidum* se ligam a receptores TLR4 (Tool Like Receptor) na superfície de macrófagos, induzindo a expressão de citocinas (SHAO et al., 2004; CHEN et al., 2004; HSU et al., 2004).

Entretanto, várias dessas pesquisas são realizadas com extratos aquosos de *G. lucidum* ou misturas de polissacarídeos. A interação sinérgica entre vários princípios ativos poderia ser responsável pelos efeitos terapêuticos relatados. O fracionamento desses complexos resulta em substâncias com atividades farmacológicas individualizadas, diferentes daquelas apresentadas pelo sistema sinérgico inicial (PEZZUTO, 1997).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMO

Foram empregadas cepas do *G. lucidum* Cg 144, da cidade de Fuzhou, China. As cepas foram gentilmente cedidas pela EMBRAPA. A cepa foi cultivada em PDA, a 30°C por 10 dias. A cada 2 meses a cepa foi repicada para manutenção, e após, armazenada a 4°C.

4.2 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

G. lucidum foi cultivado em frascos erlenmeyer de 500mL contendo o seguinte meio (g/L): glucose 35; peptona 5; extrato de leveduras 2,5; KH_2PO_4 0,883 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5; pH 5,5 (TANG; ZHONG, 2002). Os frascos foram incubados sob agitação (120 rpm) a 30°C, durante 14 dias. A biomassa resultante foi separada por centrifugação e diluída em 200 ml de água deionizada estéril.

4.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Trigo de quibe (*Triticum aestivum* L.) foi lavado e deixado de molho em água filtrada por 24h, então foi acondicionado em alíquotas de 250g em frascos com capacidade para 300 g, com umidade inicial de 35%. Também foram preparadas bandejas de alumínio, ou de polipropileno, contendo o trigo e cobertas com papel filtro e papel Kraft. Os recipientes foram autoclavados a 120°C, uma atmosfera, por 50 minutos.

Inicialmente, *G. lucidum* foi desenvolvido em placas de petri de 90 mm contendo BDA (30°C – 10 dias). A superfície foi semeada em frascos erlenmeyer de 500ml, contendo 250 ml de meio líquido, os quais foram incubados por 10 – 14 dias a 30°C, sob agitação (120 rpm) (TANG; ZHONG, 2002). Após esse período, houve crescimento de 2,5g de micélio a cada 250 ml de cultivo (peso seco). O micélio foi separado do caldo de cultivo por filtração e suspenso em 100 ml de água destilada estéril. Foram semeados 40 ml desse inóculo em 100 g de trigo autoclavado, de forma a se obter umidade final em torno de 40 a 50 %. Os frascos e bandejas foram incubados em câmara de fermentação, na ausência de luz, com um aquecedor e umidificador (Climaterm) que mantinha as condições a 30°C e umidade em torno de 95 a 98% (higrômetro Labcraft), durante 30 dias (BEUX et al., 1997). Após esse período o trigo fermentado com *G. lucidum* foi seco em estufa com circulação de ar a 50°C, por cerca de 18 hs. A seguir foi passado por moinho de faca (DeLeo), peneirado em agitador de peneiras (Bertel), originando uma farinha grossa, com grãos de aproximadamente 0,4 a 1,7 mm.

4.4 ANÁLISE DO FERMENTADO

Em experimento posterior, foi empregado como substrato, trigo com granulometria de 0,8 a 2,0 mm, o qual foi preparado, inoculado com micélio de *G. lucidum* e incubado conforme técnica descrita no item anterior.

G. lucidum foi cultivado em frascos de erlenmeyer contendo 500ml do seguinte meio (g/L): glucose 35; peptona 5; extrato de hifas 2,5; KH_2PO_4 0.883 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, pH 5.5 (Tang and Zhong, 2002). Os frascos foram incubados sob agitação (120rpm) a 30°C por 10 dias. O inoculo foi preparado resultando em biomassa, a qual foi separada por centrifugação e então diluída em 200ml de água deionizada esterelizada. Bandejas contendo trigo, previamente autoclavados a 120°C, uma atm, durante 45 minutos, foram misturados ao inoculo até uma proporção de 40%. As bandejas foram incubadas a 30°C durante 20 a 30 dias (LI e SHEN, 2003). O fermentado foi secado a 50°C, com circulação de ar e posteriormente, moído, resultando em um produto com partículas de 0,4 a 1,7 mm.

4.5 PREPARAÇÃO DA DIETA SUPLEMENTADA

A dieta básica composta por grãos ração comercial foi suplementada com 25 % do produto fermentado, resultando na dieta G25. Uma dieta controle foi preparada sem cogumelo. De acordo com análise centesimal do produto fermentado foi necessário enriquecimento com albumina e óleo de soja até a obtenção de concentração de 22% e 4% de proteínas e lipídeos, respectivamente, no sentido de suprir as necessidades dos animais (National Research Council – USA).

4.6 ANIMAIS E INOCULAÇÃO DO TUMOR WALKER

Esse estudo foi aprovado pelo comitê de ética local. Inicialmente, foram usados 40 ratos Wistar de 90 dias de vida obtidos do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, os quais foram divididos em 4 grupos de 10 animais nomeados Control, GP, GT e GTR, de acordo com o início da alimentação suplementada em relação à inoculação do tumor. Durante todo o experimento, os ratos foram mantidos em gaiolas fechadas com um número fixo de 5 animais por gaiola, em condições de temperatura constantes de 23°C, umidade controlada, ciclo de 12 hs de luz e livre acesso a água e ração.

Células do tumor Walker 256 foram injetadas intraperitonealmente nos ratos e cultivadas sete dias para o preparo de suspensão celular com salina (3×10^7 células/ml). Após, foi implantado 1,0 mL dessa suspensão celular na região subcutânea de dorso direito nos 10 animais de cada grupo, nomeados Control, GP, GT e GTR. O peso foi monitorado semanalmente. Todos os procedimentos seguiram normas ditadas pelo Comitê de Pesquisa Animal da UFPR.

Nas Figuras 3, 4 e 5 são mostrados o acondicionamento dos animais, a forma de administração da ração e inoculação das células tumorais nos animais.

Figura 3: Acondicionamento dos animais em gaiolas com 5 animais



Figura 4: Dieta suplementada oferecida *ad libitum*



Figura 5: Inoculação das células do tumor Walker 256 em ratos Wistar.



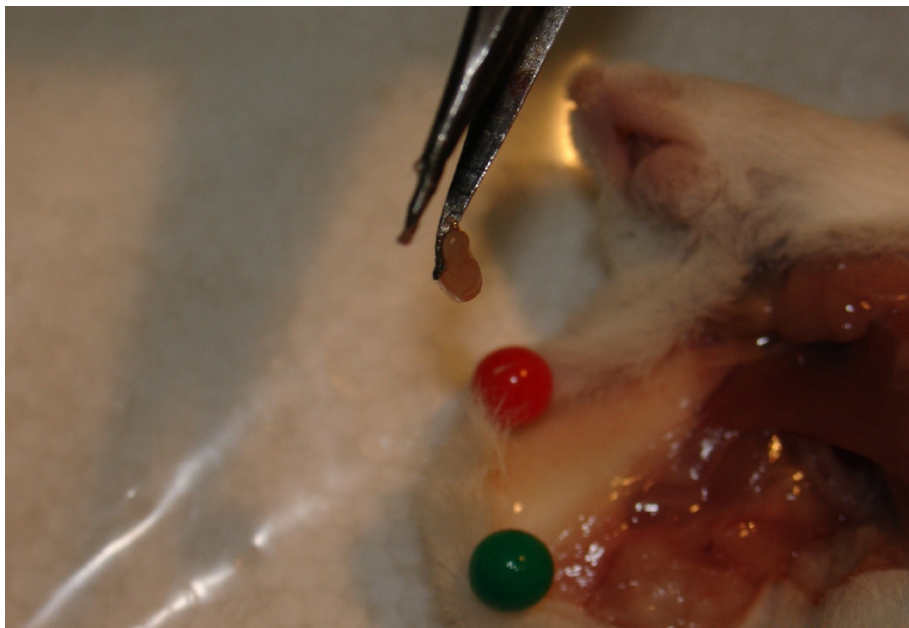
4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA

A avaliação da atividade imunomoduladora e antitumoral foi realizada no trigésimo dia após inoculação quando os animais do grupo controle entraram em estado de caquexia. Inicialmente os ratos foram sacrificados com método de deslocamento cervical e amostra de sangue foi colhida após decapitação em gilhotina para determinação de concentrações plasmáticas de diferentes substâncias.

Linfonodos axilares foram removidos e processados para avaliação das concentrações celulares de CD4+, CD8+ em citômetro de fluxo. Os seguintes

procedimentos foram adotados: tecidos foram dispostos em placas de petri de 60X15 mm (um para cada órgão) contendo 5ml de PBS (pH 7,4), após, foram cortados em vários pedaços. Utilizando o êmbolo de uma seringa de 10 ml, as peças foram desintegradas, por movimentos circulatorios até a produção de suspensão celular, os debris celulares foram eliminados pela filtração e centrifugação (10 min, 1000 rpm). Então o sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi ressuspenso em 20 ml de PBS. Depois disso, contagem de células viáveis foi realizada na suspensão celular através do método de azul de Tripán. O preparo do material para análise em citômetro de fluxo foi feito através de reações sucessivas nas quais as células foram incubadas em tubos de ensaio com anticorpos monoclonais marcados com substâncias fluorescentes. A remoção dos anticorpos não ligados foi feita através de sucessivas etapas de lavagem (Coligan et al., 1992) (Figura 6).

Figura 6: Retirada de linfonodo axilar para quantificação de CD4+ e CD8+.



4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL

Nos animais que desenvolveram tumores sólidos, estes foram removidos e analisados macroscopicamente e histologicamente através da coloração de hematoxilina e eosina. O volume do tumor [$V \text{ (cm}^3\text{)} = (4\pi/3) \times a^2 \times (b/2)$, onde a é o menor diâmetro e b é o maior diâmetro] foi medido e o resultado obtido foi comparado com aquele do grupo controle. O efeito inibitório foi calculado utilizando a seguinte fórmula: supressão tumoral (%) = $(1-T/C)$, onde T é o volume do tumor no grupo testado e C é o volume no grupo controle (MIZUNO et al, 1999). As figuras 7 e 8 mostram o aspecto do tumor nos animais após o sacrifício dos animais.

4.9 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

As peças foram fixadas em parafina, cortadas e coradas com hematoxilina-eosina conforme técnicas convencionais. As peças foram avaliadas em relação ao índice de mitose celular. Em um aumento de 40 vezes em 10 campos microscópicos para cada tumor de cada animal foram contados o número de células em mitose.

4.10 ANTICORPOS MONOCLONAIS

Os linfócitos são uma população de glóbulos brancos (leucócitos) com funções regulatórias importantes para o sistema imune. Eles estão classificados em três sub-populações: os linfócitos T, os linfócitos B e os linfócitos Natural-Killers (NK). Esta classificação é baseada nas funções específicas destas células dentro do sistema, que são características de cada grupo celular. Os linfócitos T são ainda sub-classificados em duas sub-populações funcionais: os CD4 Helper/ Inducer (Auxiliares/Indutores) e os CD8 Suppressor/Cytotoxic (supressores/citotóxicos). Vários métodos foram usados para identificar as sub-populações de linfócitos específicos. As técnicas mais antigas incluíam a aglutinação com hemácias de carneiro e as técnicas manuais baseadas em microscopia ocular (imunoperoxidase). A metodologia mais atual para a contagem de CD4 e CD8 utiliza uma técnica sofisticada de citometria de fluxo, baseada em anticorpos monoclonais marcados com substâncias fluorescentes, dirigidas contra os antígenos de superfície das células CD4, CD8 e CD3.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os valores foram expressos como médias \pm desvio padrão. Comparações entre as médias foram avaliadas através de análise de variância (ANOVA); e as diferenças estatísticas foram analisadas através do teste de Tukey, considerando um nível de significância de $P \leq 0.05$. Foram aplicados testes não paramétricos para a comprovação das hipóteses, em função da alta variabilidade dos dados (variâncias heterogêneas). Para uma análise individual de cada exame foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, e para uma análise bioquímica global, comparando cada grupo com o grupo controle foi aplicado o teste de Wilcoxon rank sum test, que é equivalente ao teste U de Mann-Whitney para observações independentes (LEVIN, 1985; FOWLER e COHEN, 1990).

5- RESULTADOS

Todos os ratos do experimento sobreviveram. Após 30 dias de injeção de tumor Walker 256, observou-se formação de massa de consistência fibroelástica, aderida a planos profundos e localizada em flanco direito de todos os ratos.

O diâmetro médio tumoral no grupo controle GC foi de 4,14 cm, já o grupo tratamento foi de 1,88 centímetros, o grupo tratamento retardado GTR obteve 2,37 cm de diâmetro médio e o grupo profilático GP foi de 2,8 cm (Figuras 7, 8 e 9).

Figura 7: Visão transoperatória do tumor do Grupo controle (GC)



Figura 8: Avaliação macrométrica tumoral.

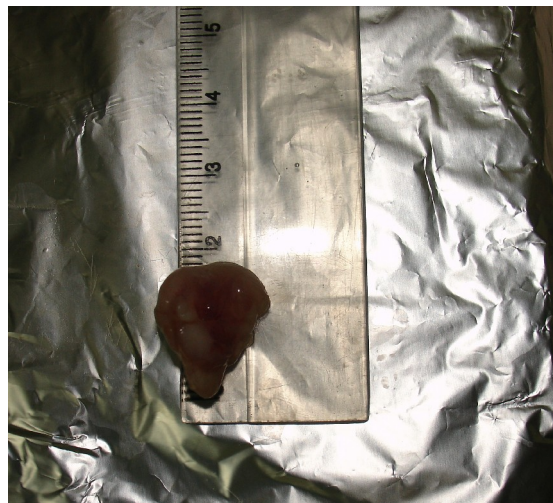
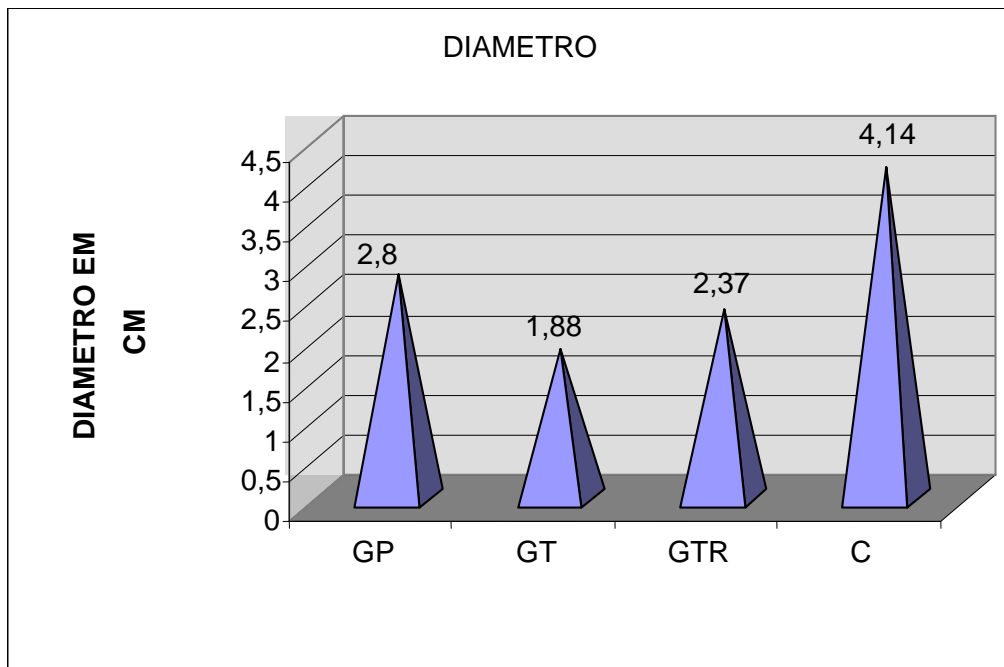


Figura 9 - Diâmetro médio do tumor nos respectivos grupos experimentais.



5.1 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

O HDL colesterol foi mensurado em todos os grupos. Encontrou-se o valor de 23,66 mg/dl no grupo controle, 28,33 mg/dl no grupo tratamento GT, 19,66 mg/dl grupo profilático GP e 26,63 mg/dl no grupo tratamento retardado GTR (Figura 10).

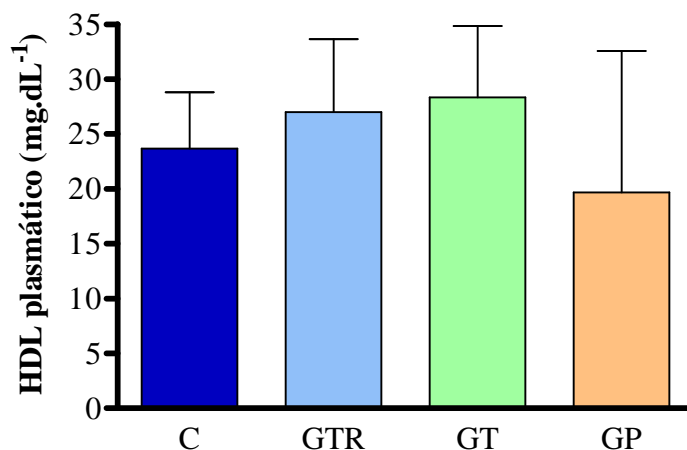


Figura 10 – Valores médios para HDL colesterol sérico nos diferentes grupos experimentais

O VLDL no grupo controle (C) foi de 16 mg/dl, para o grupo GP obteve-se 14mg/dl, para o GT foi de 12,4mg/dl e para o grupo GTR o valor de VLDL foi de 10,4 mg/dl (Figura 11).

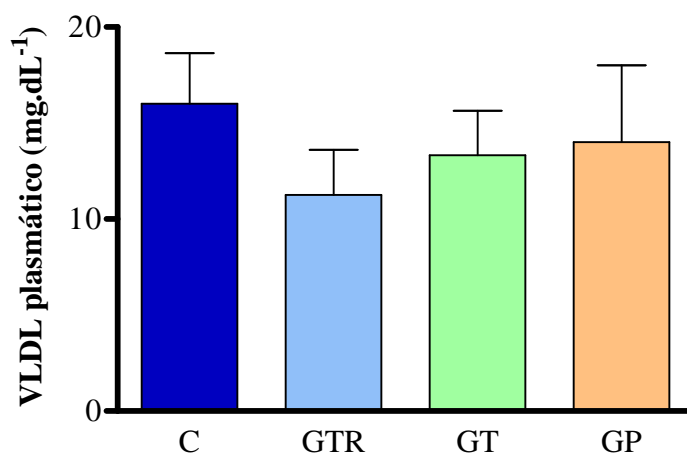


Figura 11 – Concentrações séricas de VLDL nos diferentes grupos experimentais.

Os triglicerídeos foram aferidos e os resultados obtidos em cada grupo em foram respectivamente: C: 80,0 mg/dl ; GP: 69,66 mg/dl; GTR mg/dl: 62,00mg/dl; GT:66,0 mg/dl (figura 12).

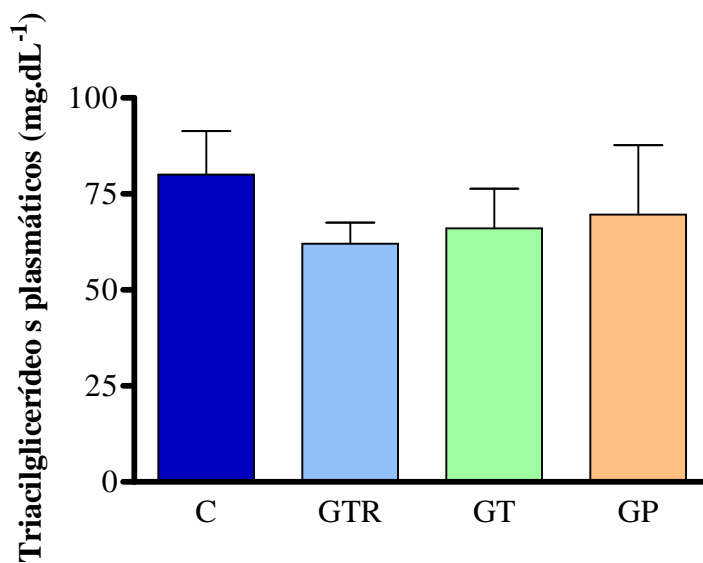


Figura 12 – Concentrações séricas de triglicerídeos nos diferentes grupos experimentais.

Os lipídeos totais foram encontrados na dosagem de 407 mg/dl no grupo controle (C); 405 mg/dl no grupo profilático (GP); 392 no grupo tratamento retardado (GTR) e 397 mg/dl no grupo tratamento (GT)(Figura 13).

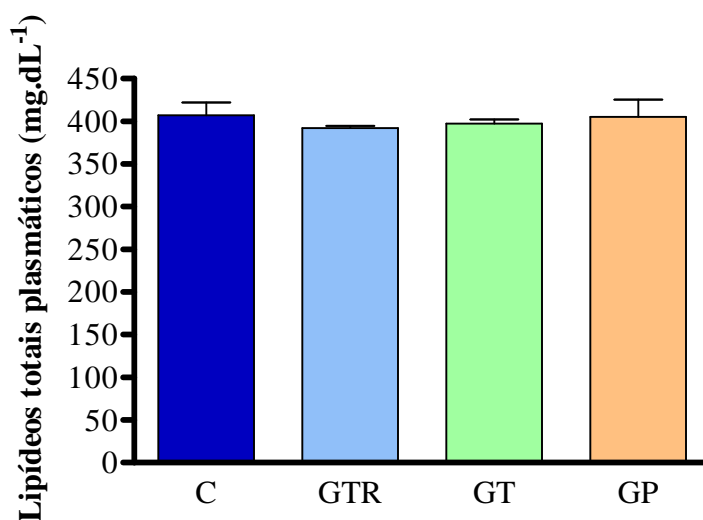


Figura 13 – Concentrações séricas de lipídeos totais nos diferentes grupos experimentais.

As proteínas totais, assim como suas frações – albumina e globulina também foram aferidas. Obteve-se como resultado em relação a dosagem protéica total no grupo controle(C): 5,26mg/dl; GP: 5,12; GTR: 4,80 e GT:5,20 mg/dl (Figura 14).

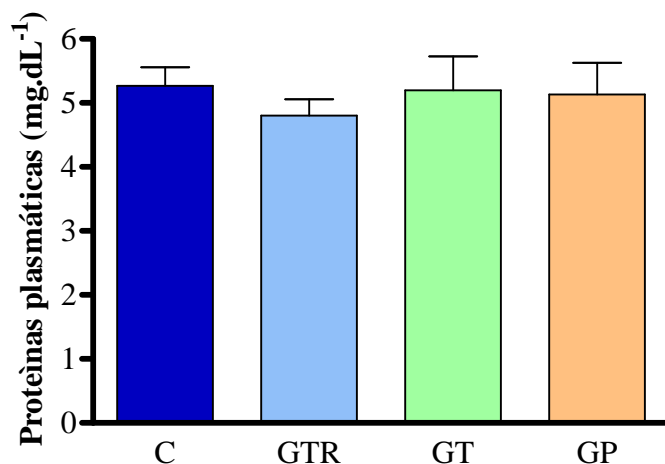


Figura 14 – Dosagens de proteínas séricas nos diferentes grupos experimentais

Quando foram avaliadas as diferentes frações protéicas verificou-se que os valores de albumina variaram de 2,82 a 3,13 mg/dl e para globulina variaram de 1,86 a 2,43mg/dl (Tabela 3).

Tabela 3: Dosagem de proteínas séricas nos grupos experimentais.

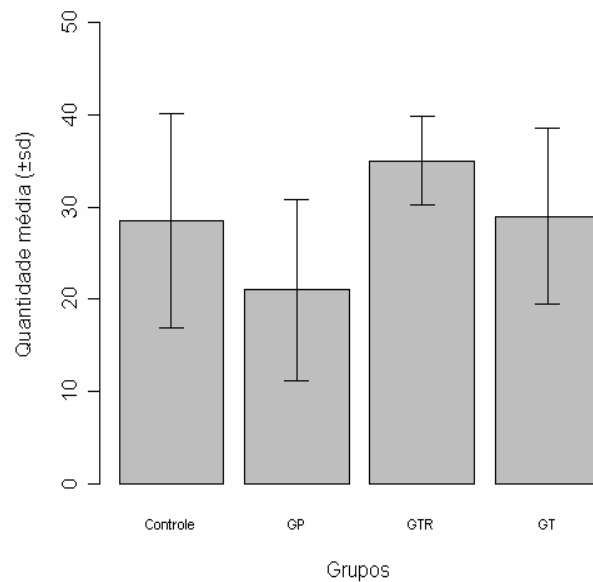
Frações protéicas (mg/dl)	C	GP	GTR	GT
ALBUMINA	2,83	3,26	2,82	3,13
GLOBULINA	2,43	1,86	1,97	2,06

Nota: C=controle; GP=grupo profilático; GTR=grupo tratamento retardado;

GT=grupo tratamento

A função renal foi avaliada medindo a uréia e creatinina sérica. Como pode se observar, o grupo que obteve maior valor médio em quantidade de uréia foi o grupo GTR (35,0 mg/dL \pm 4,83). O grupo GP apresentou valor médio inferior aos demais (21,0 mg/dL \pm 9,83). Os valores médios dos grupos GT (29 mg/dL \pm 9,48) e Controle (28,50 mg/dL \pm 11,67) foram os que mais se aproximaram, apesar de mostrar também uma alta variação (Figura 15).

Figura 15 –Concentrações séricas de uréia nos diferentes grupos experimentais



Os teores médios de creatinina nos grupos em estudo ficaram abaixo do grupo controle sendo que, o grupo GP foi o que apresentou o menor índice médio (0.125 ± 0.05) em relação aos demais (Tabela 4 e Figura 16)

Tabela 4: Medida sérica de creatinina nos diversos grupos experimentais.

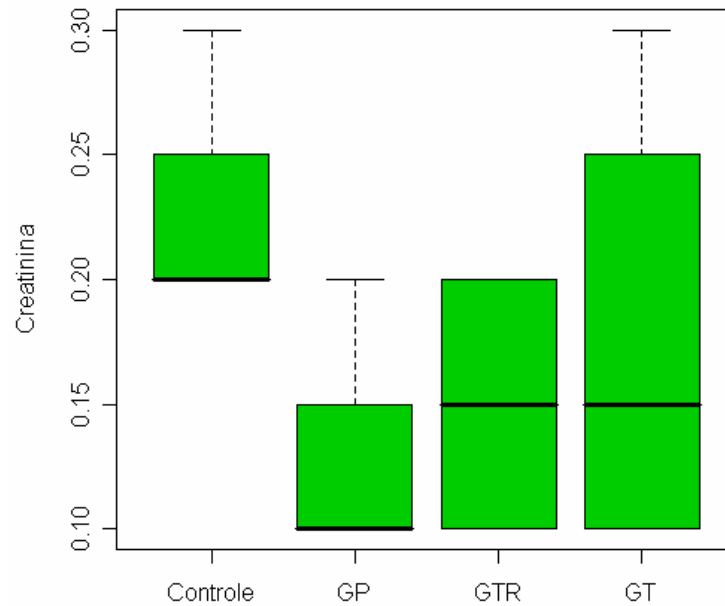
	GC	GP	GTR	GT
CREATININA	0,20	0,10	0,15	0,15

Mg/dl

Nota: C=controle; GP=grupo profilático; GTR=grupo tratamento retardado;

GT=grupo tratamento

Figura 16 - Variabilidade entre grupos para os teores de creatinina



A avaliação hepatocelular foi realizada através da medida das transaminases. Os resultados obtidos estão na tabela 5.

Tabela 5: Avaliação de função hepatocelular através da medida de transaminases séricas

	C	GP	GTR	GT
TGO (mg/dl)	208,33	249,0	268,66	218,66
TGP (mg/dl)	58,66	51,33	48,33	52,66

TGO: Transaminase Glutâmico Oxalacética

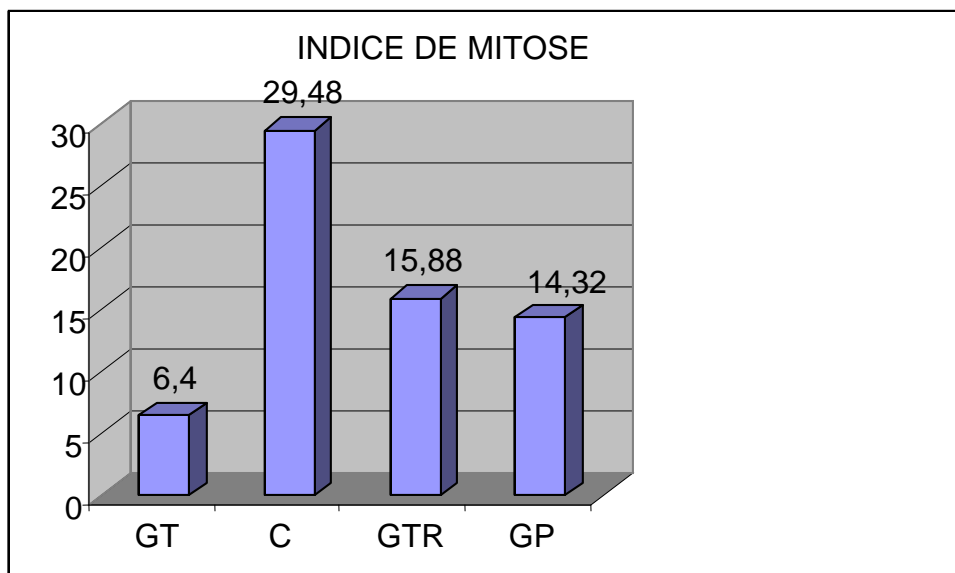
TGP: Transaminase Glutâmico Pirúvica

5.2 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

O índice de mitose celular foi calculado em cada grupo do experimento. Os resultados obtidos estão contidos na figura 17.

Colocar unidade no Y

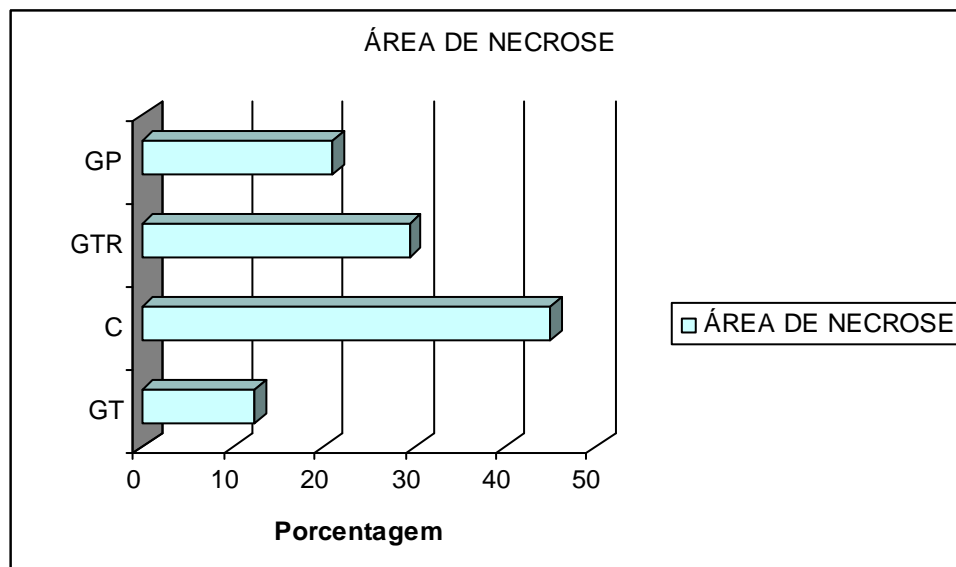
Figura 17 : Índice de mitose celular nos diversos grupos avaliados.



5.3 ÁREA DE NECROSE CELULAR

A área de necrose celular foi calculada dentro do volume total tumoral. No grupo controle (C) observou-se necrose em 45% da área total, já no grupo tratamento (GT) a necrose perfaz uma área de 12,5% apenas. No grupo profilático (GP) observou-se uma área de 21% de necrose e no grupo tratamento retardado (GTR) de 29,5% de área necrosada (Fig 18).

Figura 18: Área de necrose celular intratumoral nos diversos grupos estudados

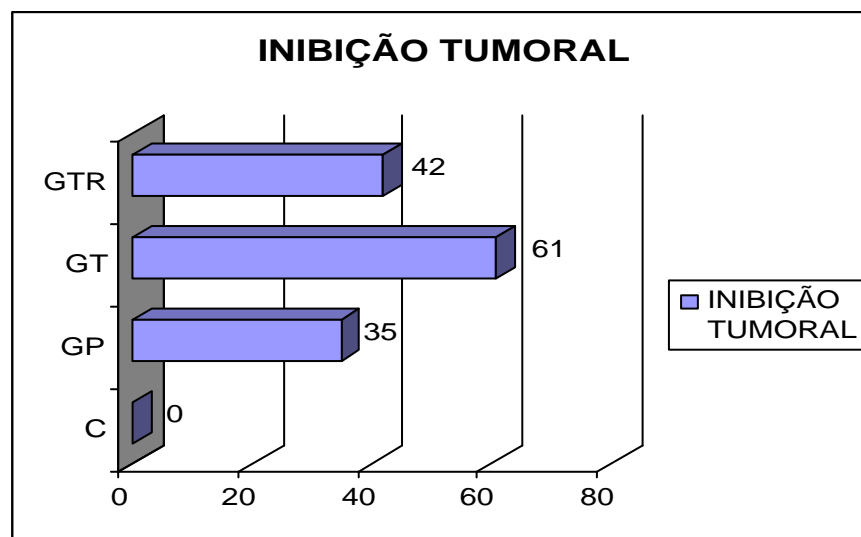


5.4 INIBIÇÃO TUMORAL

A inibição tumoral foi calculada através da fórmula: $T-C/C \times 100$, onde T = peso do Tumor do grupo teste, C= peso do tumor do grupo controle.

Os resultados mostraram inibição tumoral de 61% no grupo GT, inibição de 35% no grupo GP e inibição de 42% no grupo GTR (Fig 19).

Figura 19: Índice de inibição tumoral nos diversos grupos estudados



5.5 LINFONODOS

Os linfócitos CD4+ provenientes dos linfonodos dos grupos GT e GTR tiveram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Já em relação aos linfócitos CD8+ apenas o grupo tratamento teve uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (Tabela 6 e Fig 20 e 21).

Tabela 6: Linfócitos auxiliares (CD4+) e citotóxicos (CD8+) avaliados em linfonodos dos diversos grupos experimentais.

	CD 4+				CD8+			
	C	GP	GT	GTR	C	GP	GT	GTR
Média	61,8675	60,5137	35,0607	56,4650	7,3550	8,0162	14,9637	6,4512
DV	2,2883	1,9520	1,37356	1,8950	0,2937	1,5596	1,6870	0,7700

Figura 20 : Linfócitos CD4+ avaliados em linfonodos axilares dos animais

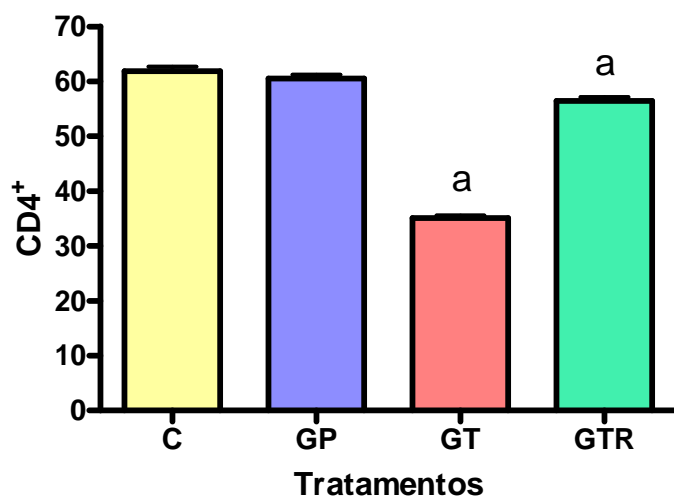
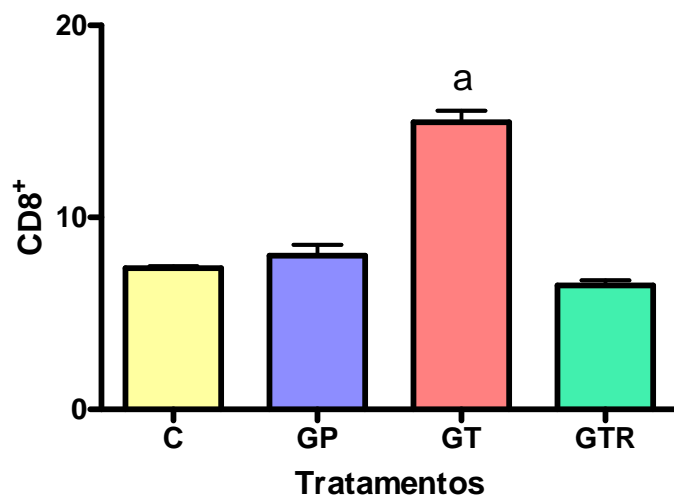


Figura 21: Linfócitos CD8+ avaliados nos linfonodos axilares dos animais.



6. DISCUSSÃO

Acredita-se que a supressão da proliferação celular induzida por β glucanas através da ativação do p38 MAPK está relacionada a apoptose mediada pelas β glucanas.

Esforços têm sido feitos em vários laboratórios para entender o processo antitumoral de *G. lucidum*. β glucanas potencializam a atividade citolítica dos macrófagos contra células tumorais *in vitro*. O mecanismo de ação das β glucanas envolve estimulação e subsequente liberação de mediadores inflamatórios tais como TNF α e IL1.

Dados da Organização Mundial da Saúde relatam que, a cada ano 10 milhões de pessoas no mundo que apresentam diagnóstico positivo de câncer resultam em 12% de mortalidade (JEMAL et al., 2005). As terapias convencionais de combate ao câncer, como a quimioterapia e a radioterapia, podem desencadear graves efeitos colaterais, principalmente debilitando o sistema imunológico do hospedeiro e tornando-o suscetível a infecções oportunistas. Neste contexto, a imunoterapia desempenha um papel fundamental, quer seja na forma de substâncias imunomoduladoras ou, mais recentemente, na construção de substâncias antineoplásicas acopladas a anticorpos dirigidos seletivamente contra as células cancerosas (WASSER; WEIS, 1999; AKEWANLOP, et al., 2001; HONG et al., 2004). Os modificadores da resposta biológica (MRB), também denominados biomoduladores, encontram ampla aceitação nesse contexto, habilitando o sistema imunológico do indivíduo a reconhecer e combater precocemente antígenos estranhos (WASSER, 2002). Polissacarídeos, especificamente β -glucanas extraídos de certos cogumelos medicinais apresentam efeito imunoestimulador, que se assemelha ao modo de ação de substâncias MRB.

Em número considerável compostos derivados de cogumelos, quer sejam componentes celulares ou metabólitos secundários, têm sido descritos exercendo ação imunomoduladora e antitumoral. CHIHARA et al. (1970) isolaram de *L. edodes* um polissacarídeo, denominado “lentinan”, o qual apresenta marcante atividade antitumoral. Do cogumelo *C. versicolor* foi extraído o Krestin e o PSK, substâncias imunomoduladoras e anticancerígenas (Ng,1998). LEIFA et al. (2003) demonstraram inibição do crescimento

de Sarcoma 180 em camundongos tratados com polissacarídeos extraídos do cogumelo *A. brasiliensis*.

Entre os cogumelos medicinais, *G. lucidum* ocupa um lugar de destaque, sendo objeto de vários estudos que, em sua maioria, são realizados *in vitro* e investigam separadamente a ação de seus princípios ativos, como polissacarídeos (β -glucanas), glicoproteínas (Ling-Zhi) e triterpenos (WASSER 2005).

Porém, considerando que essas substâncias podem produzir efeitos distintos e até mesmo completamente opostos, pouco se conhece sobre os efeitos desse cogumelo no organismo em sua totalidade.

Os resultados do presente estudo demonstram inibição do desenvolvimento tumoral nos animais alimentados com a ração suplementada com *G. lucidum*, sugerindo uma provável ação via sistema imunológico de reconhecimento de células tumorais implantadas e detecção de seu crescimento. Observou-se, portanto um efeito imunomodulador.

As ações linfocitárias foram pesquisadas nos linfonodos axilares de modo a verificar a amplitude das respostas desencadeadas pela ração suplementada. Os linfonodos respondem a antígenos próximos do tecido acometido pelo tumor (MINS et al., 1993). Ao nível de linfonodo, a presença do tumor Walker 256 levou a um aumento significativo de células CD8 ($p < 0,05$).

A atividade citolítica direta de células CD8+ contra células neoplásicas constitui uma etapa fundamental na resposta imunológica do hospedeiro no combate ao desenvolvimento tumoral. Através de uma complexa rede de interações bioquímicas, as citocinas regem o desenvolvimento, diferenciação e regulação do sistema imunológico. A mesma citocina pode ter atividade imunoestimulante ou imunossupressiva dependendo de fatores ainda não esclarecidos, de forma que sem sempre se evidencia a responsividade esperada (O'SHEA; MA; LIPSKY, 2002).

Os baixos valores de CD4+ evidenciam a agressividade ao sistema imunológico desencadeada pelo tumor Walker 256.

Os extratos de cogumelos têm sido proclamados como promotores da saúde e estimulantes do sistema imune (KIDD, 2003). Usualmente a maior parte das pesquisas tem utilizado frações ou o corpo de frutificação dos cogumelos. Neste trabalho escolheu-se usar o micélio produzido por fermentação sólida por maior rapidez e controle de produção e ter

presente em sua composição os princípios ativos como polissacarídeos, lectinas, ergosterol, e outros.

A função renal dos animais apresentou indícios de normalidade, sem alterações importantes para creatinina, uréia e ácido úrico na urina e proteínas totais, albumina e globulina no plasma dos ratos tratados com *G. lucidum* na dieta.

A função hepática não apresentou alterações significativas, mostrando que a dieta suplementada com *G. lucidum* não foi nem nefrotóxica nem hepatotóxica.

A ração formulada a base de trigo fermentado com *G. lucidum* não alterou as concentrações plasmáticas de proteínas totais e frações. Este resultado indica que a dieta proposta não levou a carência protéica que pudesse comprometer a higidez orgânica dos animais.

O metabolismo lipídico normalmente mantém um equilíbrio entre biossíntese e degradação. Quando o equilíbrio é perdido podem ocorrer hiperlipidemia, como hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia.

Numerosas pesquisas apontam que concentrações elevadas de colesterol total ou de LDL-colesterol no plasma constituem importante fator de risco para o desenvolvimento de eventos ateroscleróticos. A relação de redução de 1 mg.dL^{-1} de colesterol das LDLs no plasma possibilita redução de até 2% no índice de mortalidade por cardiopatia aterosclerótica (LAW, WALD e THOMPSON, 1994).

O mecanismo da ação hipolipidêmica dos cogumelos não está totalmente elucidado, entretanto, várias moléculas presentes podem estar envolvidas na diminuição do colesterol, como as fibras, que podem interferir na absorção do colesterol e reciclagem dos ácidos biliares, enquanto componentes lipofílicos podem afetar a síntese do colesterol.

A apoptose ou morte celular programada é uma forma de suicídio celular geneticamente definida, que ocorre de maneira fisiológica durante a morfogênese, a renovação tecidual e a regulação do sistema imunitário. Determinados erros celulares podem ser explicados por transtornos na regulação dos genes responsáveis pela apoptose, como é o caso da transformação e progressão tumorais.

Os mecanismos que regulam a morte celular são essenciais para a manutenção da homeostasia. As células crescem controladamente graças à expressão de novos genes que

induzem sinais de morte em estágios definidos de diferenciação e em resposta a estímulos fisiológicos determinados.

Considera-se apoptose como um mecanismo fisiológico de morte, que se desencadeia por diversos sinais, as quais podem ser fisiológicas, ou por estímulos ambientais externos. Esses sinais podem atuar sobre receptores de superfície e causar a ativação em cascata de proteínas citoplasmáticas, ele traz como resultado a ativação de um programa genético que conduz, geralmente, à nucleose por ação das endonucleases. Esse mecanismo de morte celular intervem em importantes fenômenos fisiológicos como: embriogênese, manutenção da homeostasia, renovação celular e funcionamento do sistema imunitário.

Os transtornos na regulação da apoptose por diferentes vias, estão presentes na etiopatogenia de diferentes enfermidades autoimunes, degenerativas e também se sugere que participem na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA).

As características da célula apoptótica diferem das observadas nas células que sofrem necrose. Nesse último fenômeno a morte é um processo “passivo” que não requer síntese protéica.

Neuroblastoma é um dos tumores malignos mais comuns na infância, esses tumores são classificados histologicamente por um sistema proposto por Shimada et al, Os critérios utilizados para avaliar a diferenciação neuroblástica são: alargamento nuclear, desenvolvimento do citoplasma. O estroma é avaliado através do Índice de Mitose e Cariorexis este conta o número de mitose celular a cada 5000 células e divide-se em três classes:

Baixo grau : menos de 100 mitoses a cada 5000 células;

Intermediário: 100-200 mitoses a cada 5000 células;

Alto grau: mais de 200 mitoses a cada 5000 células.

Essas características têm importância significativa no prognóstico do Neuroblastoma.

No presente estudo realizou-se a contagem de mitose celular nos diferentes grupos e animais estudados e observou-se no grupo controle um índice de mitose celular de 29,4, o grupo tratamento esse índice foi de 6,4. Essa diferença estatisticamente significativa mostra que o grupo controle apresenta um prognóstico reservado, alta malignidade. Quando

oferecida como terapêutica a ração suplementada com *G. lucidum*, observou-se a diminuição da agressividade tumoral, o índice mitótico diminuiu para 6,4. Provavelmente os princípios ativos do *G. lucidum* podem desencadear estímulos fisiológicos indutores da apoptose celular e assim inibir a proliferação de células malignas.

Quando oferecida ração suplementada profilaticamente (grupo GP) observou-se igualmente um índice mitótico celular significativamente menor que 14,32 (GP), quando comparada ao grupo controle. E mesmo quando oferecida o suplemento de *G. lucidum* 10 dias após a inoculação tumoral- (Grupo Tratamento Retardado- GTR) observou-se o comportamento tumoral com menor malignidade já que o índice mitótico foi de 15, significância estatística comprovada quando comparada ao grupo controle. As figuras 22 e 23 demonstram o elevado nível de mitose celular.

Figura 22: Histologia, em aumento de 40X, corada em HE em animais do grupo inoculado com células tumorais e não tratados.

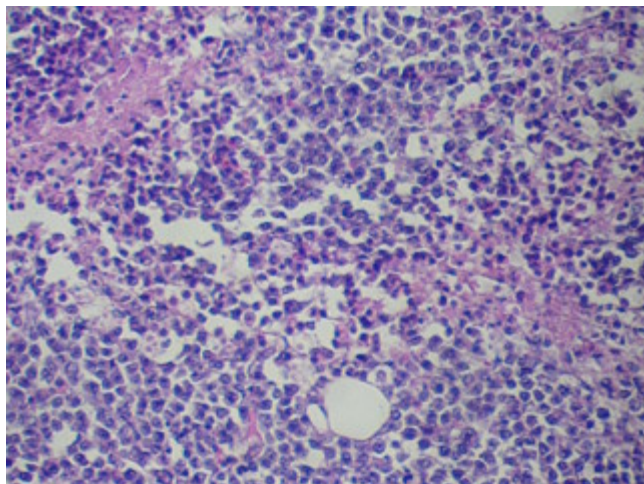
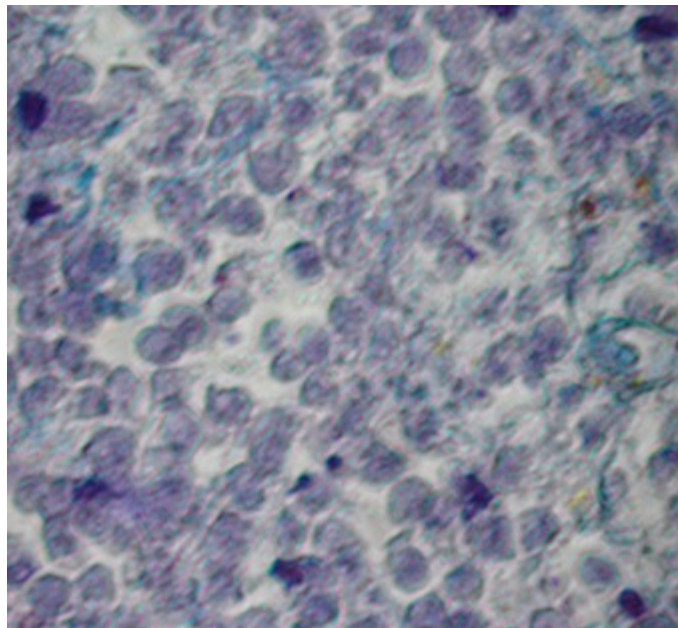


Figura 23: Histologia aumento de 100X, em Grupo de animais submetidos a tratamento, apresentando menor índice mitótico.



Neste trabalho, investigou-se a hipótese de que a alimentação concomitante de ratos, com ração suplementada com *G. lucidum*, poderia desencadear uma resistência do animal frente ao desenvolvimento tumoral. As alterações linfocitárias foram pesquisadas em baço e linfonodos axilares, de modo a se conhecer a amplitude da resposta imunológica desencadeada pelas rações suplementadas. Os linfonodos geralmente respondem a antígenos próximos que os alcançam através de tecidos vizinhos, enquanto que a resposta esplênica está relacionada a antígenos provenientes da circulação sanguínea (MINS et al., 1993).

Os resultados do presente estudo demonstram inibição do desenvolvimento tumoral nos animais alimentados com a ração suplementada com *G. lucidum*, sugerindo uma provável ação, via sistema imunológico, de reconhecimento das células tumorais implantadas e subsequente detenção do seu crescimento. Estudos futuros serão necessários para se estabelecer qual a dose terapêutica mais eficiente desses suplementos alimentares, visando obter o efeito imunomodulador e antitumoral desejado.

Organismos comprometidos por neoplasias freqüentemente apresentam resposta imunológica reduzida, o que contribui para as altas taxas de morbidade e mortalidade

nesses indivíduos (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998). TSUKAGOSHI et al., (1984), relatam que extratos de *C. versicolor* restauram o sistema imunológico de camundongos portadores de tumor, porém sem afetar a resposta imunológica de animais saudáveis.

A primeira linha de defesa do organismo contra patógenos é a “citotoxicidade dependente de complemento” (CDC), a qual é induzida por polissacarídeos presentes na parede celular dos microrganismos, sendo inativa contra células cancerosas (HONG et al., 2003).

Em outro mecanismo de defesa, mais elaborado, a célula infectada com microrganismos invasores é inicialmente recoberta com anticorpos e induz à clivagem da fração C3 do sistema complemento, a qual ativa receptores na superfície de células de defesa, desencadeando o processo de “citotoxicidade mediada por célula-dependente de anticorpo” (“antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity” - ADCC) (CHEUNG et al., 2002). Polissacarídeos, como β -glucanas, presentes na parede celular de microrganismos invasores, amplificam a resposta imunológica, induzindo a expressão de receptores C3b na superfície de fagócitos. Antígenos tumorais também induzem a produção de anticorpos, porém, devido à falta de β -glucanas, a célula cancerosa opsonizada (recoberta com anticorpos) não é capaz de ativar fagócitos, limitando a eficácia desse mecanismo de defesa (HONG et al., 2003). Para contornar essa limitação, regimes terapêuticos à base de anticorpos monoclonais específicos contra células cancerosas utilizam β -glucanas como adjuvantes no tratamento, as quais ativam a ADCC mediada por monócitos e granulócitos (HONG et al., 2004).

As células B também podem atuar na captação, processamento e apresentação de antígenos tumorais às células T auxiliaadoras ou, ainda, induzindo a resposta das células T citotóxicas contra o tumor, através da secreção de IL-1 e IL-2 (ROSEMBERG, 1993).

7. CONCLUSÕES

O cogumelo *G. lucidum* foi cultivado na sua fase vegetativa de micélio, sobre o substrato trigo em grãos e trigo granulado (“tipo para quibe”) para obtenção de material

fermentado no estado sólido. O inóculo foi obtido por fermentação submersa e a etapa de peneiramento da biomassa possibilitou a produção de inóculo na forma de micélio fragmentado que por sua vez propiciou rápido desenvolvimento micelial sobre o trigo, reduzindo o tempo de fermentação de 30 dias para 14 a 18 dias. Dessa maneira o presente estudo corrobora para agregação de valores a esse nutracêutico *G. lucidum*.

O micélio do cogumelo *G. lucidum* produzido por fermentação no estado sólido, em grãos de trigo, foi utilizado na formulação de ração e incorporado na dieta dos ratos, estes inoculados com Tumor Walker 256, para avaliação de seu efeito no metabolismo e ação imunomoduladora e anti-tumoral.

A função renal dos ratos manteve-se dentro dos limites de normalidade, sem alterações significativas para valores séricos de uréia e creatinina. Comprovando não existir nefrotoxicidade nos animais que alimentaram-se de ração suplementada com *G. lucidum*.

A função hepática não apresentou alterações significativas, não houve elevação significativa das enzimas TGO e TGP. Comprovando que a ração suplementada com *G. lucidum*, não é hepatotóxica, para esse modelo animal.

Atividade imunomoduladora foi observada com aumento significativo do CD8+(supressores/citotóxicos), no grupo tratamento quando comparada ao grupo controle. Atividade anti-tumoral foi verificada no presente estudo. Constatou-se uma inibição tumoral de 61% no grupo que recebeu ração suplementada com *G. lucidum*.

Observou-se um menor índice de mitose celular no grupo tratamento o que reflete a menor malignidade tumoral em resposta a ração suplementada com *G. lucidum*.

O presente estudo corrobora a percepção da comunidade científica. Verificaram-se propriedades anti-tumorais do *Ganoderma lucidum* contra o Tumor Walker nesse modelo animal.

Futuros trabalhos serão necessários para que exista aplicabilidade clínica real desse nutracêutico, com importante atividade imunomoduladora e anticancerígena, em humanos.

8.REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Imunologia celular e molecular. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1999.

AGGARWAL, B. B.; NATARAJAN, K. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. Eur. Cytokin Netw., v. 7, n. 93, 1996.

ADASKAVEG, J. E.; GILBERTSON, R. L. Cultural studies of four North American species in the *Ganoderma lucidum* complex with comparisons to *G. lucidum* and *G. tsugae*. Mycol. Res., v. 92, p. 182-191, 1989.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Informe técnico 6. Brasília,2003.Disponível:http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/06_310103.htm. Acessado em 20 set. 2005.

ALBERT, A. W.; MacDONALD, J. S.; TILL, A. E.; TOBERT, J. A. Lovastatin. Cardiol. Drug Rev., v. 7, p. 89-109, 1989.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M. ROBERTS, K.; WATSON, J. D. Biologia molecular da célula. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas. 1997. p. 1195- 1254.

ALBRECHT, J. T. Cachexia and anorexia in malignancy. Hematol. Oncol. Clin. Noth. Am. v. 10, n. 4, p. 791-800, 1996.

ALTSCHUL, R.; HOFFER, A.; STEPHEN, J. D. Influence of nicotinic acid on serum cholesterol in man. Arch. Biochem. Biophys., v. 54, p. 558-559, 1955.

Alves, APNN, Guedes RC, Costa-Lotufo LV, Moraes MEA, Pessoa CO, Ferreira FVA, Moraes MO. Modelo experimental de tumor na cavidade oral de ratos com carcinossarcoma de Walker 256. Acta Cir Bras. 2004; 19(4):354-60.

AKEWANLOP, C.; WATANABE, M.; SINGH, B.; WALKER, M.; KUFU, D. W.; HAYES, D. F. Phagocytosis of breast cancer cells mediated by anti-MUC-1 monoclonal antibody, DF3, and its bispecific antibody. *Cancer Res.*, v. 61, p. 4061-4065, 2001.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 17th. ed., v. 1 and 2, Gaithersburg, 2000.

BACKMAN, K. A.; GUYRE, P. M. Gamma-interferon inhibits Fc receptor II-mediated phagocytosis of tumor cells by human macrophages. *Cancer Res.*, v. 54, n. 9, p. 2456-2461, 1994.

BAKKER, S. J. L.; IJZERMAN, R. G.; TEERLINK, T.; WESTERHOFF, H. V.; GANS, R. O. B.; HEINE, R. J. Cytosolic triglycerides and oxidative stress in central obesity: the missing link between excessive atherosclerosis, endothelial dysfunction, and β -cell failure? *Atherosclerosis*, v. 148, p. 17-21, 2000.

BALLOW, M.; NELSON, R. Immunopharmacology – immunomodulation and immunotherapy. *JAMA*, v. 278, n. 22, p. 2008-2017, 1997.

BALKWILL, F.; BURKS, F.; TALBOT, D. Evidence for tumor necrosis factor/cachectin production in cancer. *Lancet*, v. 11, p. 3229, 1987.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, v.392, 1998.

BAO, X.; DUAN, J.; FANG, X.; FANG, J. Chemical modifications of the (1.3)- α -D-glucan from spores of *Ganoderma lucidum* and investigation of their physicochemical properties and immunological activity. *Carbohyd. Res.*, v. 336, p. 127-140, 2001a.

BAO, X.; LIU, C.; FANG, J.; LI, X. Structural and immunological studies of a major polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. Carbohydr. Res., v. 332, p. 67-74, 2001b.

BAO, X. F.; WANG, X. S.; DONG, Q.; FANG, J. N.; LI, X. Y. Structural features of immunological active polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. Phytochemistry, v. 59, p. 175-181, 2002.

BARNHART, J. W.; SEFRANKA, J. A.; McINTOSH, D. D. Hypocholesterolemic effect of 4,4'-(isopropylidenedithio)-bis(2,6-di-t-butylphenol) (probucol). Am. J. Clin. Nutr., v. 23, p. 1229-1233, 1970.

BARKIA, A.; ZOUARI, N.; KHROUF, W.; ELLOUZ, F.; ZOUAGHI, H. Reduction of lipoproteins with apoAI (LpAI) in non-insulin-dependent diabetic patients. Ann. Biol. Clin. V. 54, n. 2, p. 83-86, 1996.

BARTER, P. Anti-atherogenic effects of fibrates in type 2 diabetes. Current Controlled Trials in Cardiovascular Medicine, v. 2, n. 5, 2001.

BAZALO, M.E.; WRIGHT, J.E. Survey of the Argentine species of the *Ganoderma lucidum* complex. Mycotaxon, v. 16, p. 293-325, 1982.

BEAUX, M. R.; SOCCOL, C. R.; MARIN, B.; TONIAL, T. M.; ROUSSOS, S. Cultivation of *Lentinus edodes* on mixture of cassava and sugarcane bagasse. In: Advances in solid state fermentation, London: Kluwer Academic, 1997, p. 501-513.

BEROVIC, M.; HABIJANIC, J.; ZORE, I.; WRABER, B.; HODZAR, D.; BOH, B.; POHLEVEN, F. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. J. Biotechnol., v. 103, p. 77-86, 2003.

BIRCH, D.J.; FARLEY, K. F.; BECKER, G. J. et al. Microscopia urinária – texto e atlas. Brasil: Premiere, 2001.

BIRKEDAL-HANSEN, H.; MOORE, W. G. I.; BODDEN, M. K.; WINDSOR, L. J.; BIRKEDAL-HANSEN, B.; DECARLO, A.; ENGLER, J. A. Matrix Metalloproteinases: A review. Oral Biology and Medicine, v. 4, n. 2, p. 197-250, 1993.

BOBEK, P.; OZDIN, L.; GALBAVY, S. Dose-and time –dependent hypocholesterolemic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rats. Nutrition, v. 14, n. 3, 1998.

BOBEK, P.; OZDIN, L.; KUNIAK, L. Effect of oyster mushroom and isolated β -glucan on lipid peroxidation and on the activities of antioxidative enzymes in rats fed the cholesterol diet. Nutritional Biochemistry, v. 8, p. 469-471, 1997.

BOONE, C. W.; KELLOFF, G. J.; MALONE, W. E. Identification of candidate cancer chemopreventive agents and their evaluation in animals models and human clinical trials. A review. Cancer Res., v. 50, p. 2-9, 1990.

BORCHERS, A. T.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, E. Mushrooms, tumos, and immunity: an update. Exp. Biol. Med., v. 229, p. 393-406, 2004.

BRENNER, B. M.; LEVINE, S. A. Brenner & Rector – The Kidney. 7. ed. Philadelphia: Sunders Company, 2004.

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E.R. Tietz – Fundamentos de química clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

CAHLIN, C.; KÖRNER, A.; AXELSSON, H.; WANG, W.; LUNDHOLM, K.; SVANBERG, E. Experimental cancer cachexia: the role of host-derived cytokines interleukin (IL)-6, IL-12, Interferon- γ , and Tumor Necrosis Factor α evaluated in gene

knockout, tumor-bearing mice on C57 B1 background and eicosanoid-dependent cachexia. *Cancer Res.*, v. 60, p. 5488-5493, 2000.

CALABRESI, P.; CHABNER, B. A. Quimioterapia das doenças neoplásicas. In: GODMAN; GILMAN, A. G.; RALL, T. W.; NIES, A. S. Goodman & Gilman – As bases farmacológicas da terapêutica. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, p. 96-124.

CAO, L. Z.; LIN, Z.B. Regulation on maturation and function of dendritic cells by *Ganoderma lucidum* polysaccharides. *Immunol. Lett.*, v. 83, p. 163-169, 2002.

CAO, L. Z.; LIN, Z. B. Regulatory effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on cytotoxic T-lymphocytes induced by dendritic cells in vitro. *Acta Pharmacol. Sin.*, v. 24, n. 4, p. 321-326, 2003.

CARLSON, L. A.; BOTTIGER, L. E. Serum triglycerides, to be or not to be a risk factor for ischaemic heart disease? *Atherosclerosis*, v. 39, p. 287-291, 1981.

CARVALHO, J. C. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de pigmentos a partir de *Monascus* por fermentação em substrato sólido. Curitiba, 2004. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos). Setor de Tecnologia – Universidade Federal do Paraná.

CERNING, J. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol.*, v. 87, p.113-130, 1990.

CHEN, C. C.; CHOU, C. Y.; SUN, Y. T.; HUANG, W. C. Tumor necrosis α -induced activation of downstream NF- κ B site of the promoter mediates epithelial ICAM-I expression and monocyte adhesion: involvement of PKCa, tyrosine kinase, and IKK2, but not MAPKs, pathway. *Cell. Signal.*, v. 13, p. 543-553, 2001.

CHEN, H. S.; TSAI, Y. F.; LIN, S.; LIN, C. C.; KHOO, K. H.; LIN, C. H.; WONG, C. H. Studies on the immuno-modulating and anti-tumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides. *Biorgan. Med. Chem.*, v. 12, p. 5595-5601, 2004.

CHEUNG, N. K.; MODAK, S.; VICKERS, A.; KNUCKLES, B. Orally administered β -glucans enhance anti-tumor effects of monoclonal antibodies. *Cancer Immunol. Immunother.*, v. 51, p. 557-564, 2002.

CHEUNG, P. C. K. The hypocholesterolemic effect of two edible mushrooms: *Auricularia auricula* (tree-ear) and *Tremella fuciformis* (white jelly-leaf) in hypercholesterolemic rats. *Nutr. Res.*, v. 16, n. 10, p. 1721-1725, 1996a.

CHEUNG, P. C. K. The hypocholesterolemic effect of extracellular polysaccharide from the submerged fermentation of mushroom. *Nutr. Res.*, v. 16, n. 11/12, p. 1953-1957, 1996b.

CHEUNG, H.Y.; NG, C.W.; HOOD, D.J. Identification and quantification of base and nucleoside markers in extracts of *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma japonicum* and *Ganoderma capsules* by micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatography A*, v. 911, p. 119-126, 2001.

CHEUNG, W. M. W.; HUI, W. S.; CHU, P.W. K.; CHIU, S. W.; IP, N. Y. *Ganoderma* extract activates MAP kinases and induces the neuronal differentiation of rat pheochromocytoma PC12 cells. *Febs Letters*, v. 486, p. 291-296, 2000.

CHIHARA, G.; HAMURO, J.; MAEDA, Y.Y.; ARAI, Y.; FUKUOKA. Fractionation and purification of polysaccharides with market antitumor activity, specially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom). *Cancer Res.*, v. 30, p. 2776-2781, 1970.

CHIU, S.W.; WANG, Z.M.; LEUNG, T.M.; MOORE, D. Nutritional value of *Ganoderma* extract and assessment of its genotoxicity and antigenotoxicity using comet assays of mouse lymphocytes. *Food Chem. Toxicol.*, v. 38, p.173-178, 2000.

CHUNG, C. K.; TONG, S. K. Effects of sporoderm-broken germination activated *Ganoderma* spores on promotion of proliferation and/or differentiation of neural stem cells in injured spinal cord. *Int. A61K 035/84. U.S. 424/195.15.* 8 January 2004, 3 February 2005.

CHUNG, W.T.; LEE, S.H.; KIM, J.D.; PARK, Y.S.; HWANG, B.; LEE, S.Y.; LEE, H.Y. Effect of mycelial culture broth of *Ganoderma lucidum* on the growth characteristics of human cell lines. *J. Biosci. Bioeng.*, v. 92, n. 6, p.550-555, 2001.

CIMERMAN, N. G.; CIMERMAN, A. Pleurotus fruiting bodies contain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-lovastatin. *Experimental Mycology*, v. 19, p. 1-6, 1995.

COLIGAN, J. E.; KRUISBECK, A. M.; MARGULIES, D. H.; SHEVCH E. M.; STROBER W. *Current protocols in immunology.* New York: National Institutes of Health, 1992.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. *Pathologic basis of disease.* 5 ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1994, p. 240-303.

CORNER, E.J.H. *Ad Polyporaceas I. Amauroderma and Ganoderma.* Beihefte zur Nova Hedwigia, v. 75, p. 1-182, 1983.

DAVIES, C. C.; BEM, D.; YOUNG, L. S.; ELIOPOULOS, A. G. NF- κ B overrides the apoptotic of TNF receptor 1 but not CD40 in carcinoma cells. *Cell. Signal.*, v. 17, p. 729-738, 2005.

DORR, R. T. Interferon-a in malignant and viral diseases. *Drugs*, v. 45, p. 177-211, 1993.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

DUVILLARD, L.; PONT, F.; FLORENTIN, E.; GAMBERT, P.; VERGES, B. Significant improvement of apolipoprotein B-containing lipoprotein metabolism by insulin treatment in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia*, v. 43, n. 1, p. 27-35, 2000.

EHRNREICH, H. Foods as medicine. *The World of Food Ingredients*, p. 18-28, 2000.

EO, S. K.; KIM, Y. S.; LEE, C. K.; HAN, S. S. Antiherpetic activities of various protein bound polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum*. *J. Ethnopharmacol.*, v. 68, p. 175-181, 1999.

ERWIG, L. P.; KLUTH, D. C.; WALSH, G. M.; REES, A. J. Initial cytokines exposure determines function of macrophages and renders them unresponsive to other cytokines. *J. Immunol.* v. 161, n. 4, p. 1983-1988, 1998.

FANG, Q. H.; TANG, Y. J.; ZHONG, J. J. Significance of inoculation density control in production of polysaccharide and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochem.*, v. 37, p. 1375-1379, 2002.

FANG, Q. H.; ZHONG, J. J. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites – ganoderic acid and polysaccharide. *Biochem. Eng. J.*, v. 10, p. 61-65, 2002a.

FANG, Q. H.; ZHONG, J. J. Two-stage culture process for improved production of ganoderic acid by liquid fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum*. Biotechnol. Prog., v. 18, p. 51-54, 2002b.

FARRAR, M. A.; SCHREIBER, R. D. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. Annu. Rev. Immunol., v. 11, p. 571-611, 1993.

FELESZKO, W.; BALKOWIEC, E. Z.; SIEBERTH, E.; MARCZAK, M.; DABROWSKA, A.; GIEMASZ, A. Lovastatin and tumor necrosis factor- α exhibit potentiated antitumor effects against Ha-ras-transformed murine tumor via inhibition of tumor-induced angiogenesis. Int. J. Cancer, v. 81, p. 560-567, 1999.

FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. Aquaculture, v. 199, p. 197-227, 2001.

FRENDSCHO, M. H.; KINO, K.; SONE, T.; JARDIEU, P. Ling Zhi-8: A novel T cell mitogen induces cytokine production and upregulation of ICAM-1 expression. Cell. Immunol., v. 150, p. 101-113, 1993.

GADES, M. D.; STERN, J. S. Chitosan supplementation and fecal fat excretion in men. Obesity Research, v. 11, n. 5, p. 683-687, 2003.

GAO, J. J.; MIN, B. S.; AHN, E. M.; et al. New triterpene aldehydes, lucialdehydes A-C, from *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against murine and human tumor cells. Chem. Pharm. Bull., v. 50, n. 6, p. 837-840, 2002a.

GAO, Y.; DAI, X.; CHEN, G.; YE, J.; ZHOU, S. A randomized, placebo-controlled, multicenter study of *Ganoderma lucidum* (W. Cut.: Fr.) Lloyd (Aphyllophoromycetideae) polysacchrides (Ganopoly®) in patients with advanced lung cancer. Int. J. Med. Mushrooms, v. 5, n.5, 2003.

GAO, Y.; LAN, J.; DAI, X.; YE, J. ZHOU, S. A phase I/II study of Ling Zhi Mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr) Lloyd (Aphyllophoromycetideae) Extract in patients with type II diabetes mellitus. *Int. J. Med. Mushrooms*, v. 6, n. 1, 2004.

GAO, Y.; LAN, J.; GAO, H.; LIU, Z. Extraction and determination of *Ganoderma* polysaccharides. *Int. J. Med. Complement Med*, v. 1, n. 1, 2000.

GAO, Y.; ZHOU, S.; WEN, J.; HUANG, M.; XU, A. Mechanism of the antiulcerogenic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on indomethacin-induced lesions in the rat. *Life Sci.*, v. 72, p. 731-745, 2002b.

GATELY, S.; TWARDOWSKI, P.; STACK, M.S.; CUNDIFF, D.L.; GRELLA, D.; CESTELLINO, F.S.; ENGHILD, J.; KWAAN, H.C.; LEE, F.; KRAMER, R.A.; VOLPERT, O.; BOUC, N.; SOFF, G. A. The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 94, p. 10868-10872, 1997.

GIANNI, M.; ZANOTTA, S.; TERAIO, M.; RAMBALDI, A.; GARATTINI, E. Interferons induce normal and aberrant retinoic-acid receptors type a in acute promyelocytic leukemia cells: potentiation of the induction of retinoid-dependent differentiation markers. *Int. J. Cancer*, v. 68, p. 75-83, 1996.

GINER-LARZA, E. M.; MÁÑEZ, S.; GINER-PONS, R.; RECIO, M. C.; RÍOS, J. L. On the anti-inflammatory and anti-phospholipase A2 activity of extracts from lanostane-rich species. *J. Ethnopharmacol.*, v. 73, p. 61-69, 2000.

GOLDSTEIN, J. L.; KITA, T.; BROWN, M. S. Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis: lessons from an animal counterpart of familial hypercholesterolemia. *N. Engl. Med.*, v. 309, p. 288-295, 1983.

GONG, P.; GUAN, X.; WITTER, E. A rapid method to extract ergosterol from soil by physical disruption. *Applied Soil Ecology*, v.17, p. 285-289, 2001.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. *Tratado de fisiologia médica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

HA, T. B.; GERHÄUSER, C.; ZHANG, W. D.; et al. New lanostanoids from *Ganoderma lucidum* that induce NAD(P)H:quinone oxidoreductase in cultured hepatic murine hepatoma cells. *Planta Med.* v. 66, n. 6, p. 681-684, 2000.

HABIJANIC, J.; BEROVIC, M. The relevance of solid-state substrate moisturing on *Ganoderma lucidum* biomass cultivation. *Food Technol. Biotechnol.*, v. 38, n.3, p. 225-228, 2000.

HASHIM, S. A.; van ITALLIE, T. B. Cholestyramine resin therapy for hypercholesterolemia: clinical and metabolic studies. *J.A.M.A.*, v. 192, p. 289-293, 1965.

HATTORI, K.; HIROSHI, M.; KAZUHISA, O. Matrix metalloprotease inhibitor. A61K035/72, U. S. 20050037024, fev., 2005.

HEM, L. G. van der; VLIET, J. A. Vander; BOCKEN, F. M.; KINO, K.; HOITSMA, A. J.; TAX, W. J. M. Ling zhi-8: studies of a new immunomodulating agent. *Transplantation*, v.60, n. 5, p. 438-443, 1995.

HOLSTEIN, S. A.; HOHL, R. J. Synergistic interaction of lovastatin and paclitaxel in human. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 1, p. 141-149, 2001.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T. & WILLIAMS, S.T. - *The Mycobacteria*. In: *BERGEY'S manual of determinative bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1994. p.597-603.

HONG, F.; HANSEN, R. D.; YAN, J.; ALLENDORF, D. J.; BARAN, J. T.; OSTROFF, G. R.; ROSS, G. R. β -glucan functions as an adjuvant for monoclonal antibody immunotherapy by recruiting tumoricidal granulocytes as killer cells. *Cancer Res.*, v. 63, p.9023-9031, 2003.

HONG, F.; YAN, J.; BARAN, J. T.; ALLENDORF, D. J.; HANSEN, R. D.; OSTROFF, G. R.; XING, P. X.; CHEUNG, N. K. V.; ROSS, G. D. Mechanism by which orally administered β -1,3-Glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. *J. Immunol.*, v. 173, p. 797-806, 2004.

HSEU, R.S. Recent advances in molecular systematic of the *Ganoderma lucidum* complex, 1997. Disponível em: < <http://www.canited.com/reishi97d-8htm>.> Acesso em 22 dez. – 2003.

HSEU, R. S.; WANG, H. H.; WANG, H. F.; MONCALVO, J. M. Differentiation and grouping of isolates of the *Ganoderma lucidum* complex by random amplified polymorphic DNA-PCR compared with grouping on the basis of internal transcribed spacer sequences. *Appl. Envir. Microbiol.*, v. 62, n. 4, p. 1354-1363, 1996.

HSU, H. Y.; HUA, K. F.; LIN, C. C.; LIN, C. H.; HSU, J.; WONG, C. H. Extract of Reishi polysaccharides induces cytokine expression via TLR4-modulated protein kinase signaling pathways, *J. Immunol.*, v. 173, p. 5989-5999, 2004.

HSU, M. J.; LEE, S. S.; LIN, W.W. Polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum* inhibits spontaneous and Fas-mediated apoptosis in human neutrophils through activation of the phosphatidylinositol 3 kinase/AKT signaling pathway. *J. Leuk. Biology*, v. 72, n.1, p. 207-216, 2002.

IWARI, R. K. T.; GELIEBTER, J.; GARIKAPATY, V.P.S.; YEDAVELLI, S. P. K.; MITTELMAN, S. C. Pc spes 3: induction of apoptosis. *Int. J. Oncol.*, v. 14, p. 713-719, 1999.

JAKÓBISIAK, M.; BRUNO, S.; SKIERSKI, J. S.; DARZYNKIEWICZ, Z. Cell cycle-specific effects of lovastatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 88, p. 3628-3632, 1991.

JEMAL, A.; MURRAY, T.; WARD, E.; SAMUELS, A.; TIWARI, R. C.; GHAFOR, A.; FEUER, E. J.; THUN, M. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J. Clin.*, v. 55, p. 10-30, 2005.

JONG, S.C.; BIRMINGHAM, J. M. Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. *Adv. Appl. Microbiol.*, v. 37, p. 101-134, 1992.

JULICH, W. Higher taxa of basidiomycetes. *J. Cramer*. 485 p., 1981.

KABIR, Y.; KIMURA, S.; TAMURA, T. Dietary effect of *Ganoderma lucidum* mushroom on blood pressure and lipid levels in spontaneously hypertensive rats (SHR). *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 34, p. 433-438, 1988.

KABIR, Y.; YAMAGUCHI, M.; KIMURA, S. Effect of Shiitake (*Lentinus edodes*) and (*Grifola frondosa*) mushrooms on blood pressure and plasma lipids of spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, v. 33, p. 341-346, 1987.

KARSTEN, P. Enumeratio boletinearum et Polyporearum Fennicarum, systemate novo dispositarum. *Revue Mycologie (Toulouse)*, v. 3, p. 1-19, 1881.

KAWAGISHI, T.; MITSUNAGA, S. I.; YAMAWAKI, M.; IDO, M.; SHIMADA, A.; KINOSHITA, T.; MURATA, T.; USUI, T.; KIMURA, A.; CHIBA, S. A lectin from mycelia of the fungus *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, v. 44, n. 1, p. 7-10, 1997.

KIDD, P. M. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. *Alternative Medicine Review*, v. 5, n. 1, p.4-27, 2000.

KIM, Y. S.; EO, S. K.; OH, K. W.; LEE, C. K.; HAN, S. S. Antiherpetic activities of acid protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* alone and in combinations with interferons. *J. Ethnopharmacol.*, v. 72, p. 451-458, 2000.

KIM, S. W.; HWANG, H. J.; PARK, J.P.; CHO, Y.J.; SONG, C. H.; YUN, J. W. Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. *Blackwell Synergy. Lett. Appl. Microbiol.*, v.34, n. 1, p. 56, 2002.

KIM, D.H.; SHIM, S.B.; KIM, N.J.; JANG, I.S. Beta-glucuronidase-inhibitory activity and hepatoprotective effect of *Ganoderma lucidum*. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 22, n. 2, p. 162-164, 1999.

KINO, K.; YAMASHITA, A.; YAMAOKA, K. Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8), from *Ganoderma lucidum*. *J. Biol. Chem.*, p. 264-472, 1989.

KINO, K.; SONE, T.; WATANABE, J.; YAMASHITA, A.; TSUBOI, H.; MIYAJIMA, H.; TSUNOO, H. Immunomodulator, LZ-8, prevents antibody production in mice. *Int. J. Immunopharmacol.*, v. 13, n. 8, p. 1109-1115, 1991.

KODAMA, T., TAKEDA, K., SHIMOZATO, O., HAYAKAWA, Y., ATSUTA, M., KOBAYASHI, K., ITO, M., YAGITA, H., OKUMURA, K. Perforin-dependent NK cell cytotoxicity is sufficient for anti-metastatic effect of IL-12. *Eur. J. Immunol.*, v. 29, p. 1390, 1999.

KOJI, H.; HIROSHI, M.; KAZUHISA, O. Matrix metalloprotease inhibitor. *Int. A61K 035/72*. U.S. n. 424/195.16. 27 September 2002, 4 October 2005.

KURASHIGE, S.; MITSUHASHI, S. Macrophage activities in sarcoma 180 bearing mice and EL4 bearing mice. *Gann*, v. 73, p. 85-90, 1982.

LAMEIRE, N.; van BIESEN, W.; VANHOLDER, R. Acute renal failure. *Lancet*, v. 365, p. 417-427, 2005.

LAW, M. R.; WALD, N. J.; THOMPSON, S. G. By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischaemic heart disease?. *BMJ.com.*, v. 308, p. 367-372, 1994.

LEE, J.M; KWON, H.; JEONG, H.; LEE, J.W.; LEE, S.Y.; BAEK, S.J.; SURH, Y. J. Inhibition of lipid peroxidation and oxidative DNA damage by *Ganoderma lucidum*. *Phytother. Res.*, v. 15, n.3, p. 245-249, 2001.

LEE, M.K.; LEE, S.Y.; LEE, H.Y. Bistage control of pH for improving exopolysaccharide production from mycelia of *Ganoderma lucidum* in an air-lift fermentor. *J. Biosci. Bioeng.*, v. 88, n. 6, p. 646-650, 1999.

LEE, H.; SONG, M.; HWANG, S. Optimizing bioconversion of deproteinated cheese whey to mycelia of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochem.*, v. 00, p. 1-9, 2003.

LEE, H.; SONG, M.; YU, Y.; HWANG, S. Production of *Ganoderma lucidum* mycelium using cheese whey as an alternative substrate: response surface analysis and biokinetics. *Biochem. Eng. J.*, v. 3697, p. 1-7, 2003a.

LEE, S.; PARK, S.; OH, J. W.; YANG, C. H. Natural inhibitors for protein prenyltransferase. *Planta Med.*, v. 64, p. 303-308, 1998.

LEE, S.S.; LEE, P.L.; CHEN, C.F.; WANG, S.Y.; CHEN, K.Y. Antitumor effects of polysaccharides of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr) P. Karst. (Ling Zhi, Reishi Mushroom) (Aphyllophoromycetideae). *Int. J. Med. Mushrooms*, v. 5, n.1, 2003b.

LEIFA, F. Production of extra-cellular polyssaccharide from *Agaricus blazei* by submerged and solid state culture and its antitumor effect. Curitiba, 2003, 111 p. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná.

LEIFA, F.; SOCCOL, A. T.; PANDEY, A.; GERMANO, S.; RAU, R.; PEDROSO, A.L.; SOCCOL, C. R. Production of polysaccharide by culinary-medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. LPB 03 (Agaricomycetideae) in submerged fermentation and its antitumor effect. *Int. J. Med. Mushrooms*, v. 5, p. 17-23, 2003.

LEWIS, V. A.; KOCH, T.; PLUTNER, H.; MELLMAN, I. A complementary DNA clone for a macrophage-lymphocyte Fc receptor. *Nature*, v. 324, p. 372-375, 1986.

LIN, S.B.; LI, C.H.; LEE, S.S.; KAN, L.S. Triterpene-enriched extracts from *Ganoderma lucidum* inhibit growth of hepatoma cells via suppressing protein kinase C, activating mitogen-activated protein kinases and G2-phase cell cycle arrest. *Life Sci.*, v. 72, p. 2381-2390, 2003.

LINDBLOM, C. M.; WACHENFELDT, E.; TRANVIK, L. J. Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after fungal death. *J. Microbiol. Methods*, v. 59, p. 253-262, 2004.

LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T. H. J.; JÜLICH . The pharmacological potential of mushrooms. *eCAM*, v.2, n. 3, p. 285-299, 2005.

LIU, F.; OOI, V. E. C.; CHANG, S. T. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sci.*, v. 60, n. 10, p. 763-771, 1997.

LIU, X. L.; YUAN, J. P.; CHUNG, C.K.; CHEN, X. J. Antitumor activity of the sporoderm-broken germinating spores of *Ganoderma lucidum*. *Cancer Lett.*, v. 182, p. 155-161, 2002.

LU, H.; KYO, E.; UESAKA, T.; KATOH, O.; WATANABE, H. Prevention of development of N,N'-dimethylhydrazine-induced colon tumors by a water-soluble extract from cultured medium of *Ganoderma lucidum* (Rei-shi) mycelia in male ICR mice. *Int. J. Mol. Medicine*, v. 9, p. 113-117, 2002.

LU, H.; KYO, E.; UESAKA, T.; KATOH, O.; WATANABE, H. A water-soluble extract from cultured medium of *Ganoderma lucidum* (Rei-shi) mycelia suppresses azoxy-methane-induction of colon cancers in male F344 rats. *Oncol. Rep.*, v.10, p. 375-379, 2003.

LUO, J.; ZHAO, Y. Y.; LI, Z. B. A new lanostane-type triterpene from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *Journal of Asian Natural Products Research*, v. 4, n. 2, p. 129-134, 2002.

LUZ, P. L. Aterosclerose: aspectos atuais. *Atheros*, v. 4, n. 1, p. 14-17, 1993.

MAHLEY, R. W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, v. 240, p. 622-630, 1988.

MALORNI, W.; RAINALDI, G.; TRITARELLI, E.; RIVABENE, R.; CIANFRIGLIA, M.; LEHNERT, M.; DONELLI, G.; PESCHELE, C.; TESTA U. Tumor necrosis factor α is a powerful apoptotic inducer in lymphoid leukemic cells expressing the p-170 glycoprotein. *Int. J. Cancer*, v. 67, p. 238-247, 1996.

MATHEUS, D. R. ; OKINO, L. K. . Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos. In: Vera Lucia Ramos Bononi; Rosely Ana Piccolo Grandi. (Org.). *Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e biotecnologia*. 1a. ed. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, 1998, v. 1, p. 106-139.

McENTEE, M. F.; WHELAN, J. Dietary polyunsaturated fatty acids and colorectal neoplasia. *Biomed. Pharmacother.*, v. 56, p. 380-387, 2002.

McEVOY, G. K. *AHFS Drug information*. Bethesda: American Society of Health-System Pharmacists, 2002.

McGUFFIN, M.; YONG, A. L. Premarket notifications of new dietary ingredients – a ten-year review. Food and Drug Administration. Disponível em : <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/04n0454/04n-0454-bkg0001.pdf>. Acessado em 20 set. 2005.

McNEELA, E. A; MILLS, K. H. G. Manipulating the immune system: humoral versus cell-mediated immunity. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 51, p. 43-54, 2001.

MELLO, I. Studies on the Aphyllophorales of Portugal: the genus *Ganoderma*. Int. J. Mycology and Lichenology, v. 2, p. 183-204, 1986.

MEKKAWY, S. E.; MESELHY, M. R.; NAKAMURA, N.; TEZUKA, Y. Anti-HIV-1 and anti-HIV-1 protease substances from *Ganoderma lucidum*. Phytochemistry, v. 49, n. 6, p. 1651-1657, 1998.

MIN, B.S.; GAO, J.J.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M. Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against meth-A and LLC tumor cells. Chem. Pharm. Bull., v. 48, n. 7, p. 1023-1033, 2000.

MIMS, C. A.; PLAYFAIR, J. HL.; ROITT, I. M.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R.; ANDERSON, R.M. Medical Microbiology. Hong Kong: Mosby-Year Book Europe. 1993. p. 12.1-14.6.

MIN, B.S.; NAKAMURA, N.; MIYASHIRO, H.; BAE, K.W.; HATTORI, M. Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory activity against HIV-1 protease. Chem. Pharm. Bull., v. 46, n. 10, p. 1607-1612, 1998.

MINNICH, A.; ZILVERSMIT, D. B. Impaired triacylglycerol catabolism in hypertriglyceridemia of the diabetic, cholesterol-fed rabbit: a possible mechanism for protection from atherosclerosis. Biochem. Biophys. Acta, v. 1002, n. 3, p. 324-332, 1989.

MIZUNO, T. Farmacological effect and nutritional aliment of mushrooms. Chemical Times, v. 131, p.12-21, 1989.

MIZUNO, T. Bioactive substances and medicinal effects of the Reishi. Disponível em : <<http://www.toi-reishi.com>. > Acesso em 05 fev. 2004.

MIZUNO, T; KAWAGISHI, H; ITO, H; SHIMURA, K. Antitumoral activity and structural features of some glucans obtained from fruiting body of *Agaricus blazei* Murrill Proceeding of the 10th Symposium of the Sugar, Japan, 1987.

MIZUNO, T. Development of antitumor polysaccharides from mushroom fungi. *Foods Food Ingrid. J. Jpn.* V. 167, p. 69-85, 1996.

MIZUNO, T. Kawariharatake, *Agaricus blazei* Murrill: medicinal and dietary effects. *Food Rev. Int.*, v. 11, n. 1, p. 167-172, 1995.

MIZUNO, M.; MINATO, K.; ITO, H.; KAWADE, M.; TERAJ, H.; TSUCHIDA, H. Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* mill. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, v. 47, n. 4, p. 707-714, 1999.

MIZUSHINA, Y.; TAKAHASHI, N.; HANASHIMA, L.; KOSHINO, H. Lucidenic acid O and lactone, new terpene inhibitors of eukaryotic DNA polymerases from a basidiomycete, *Ganoderma lucidum*. *Bioorg. Med. Chem.* V. 7, p. 2047-2052, 1999.

MIZUSHINA, Y.; WATANABE, I.; TOGASHI, H. et al. An ergosterol peroxide, a natural product selectively enhances the inhibitory effect of linoleic acid on DNA polymerase beta. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 21, n. 5, p. 444-448, 1998.

MONCALVO, J. M.; RYVARDEN, L. A nomenclatural study of the Ganodermataceae Donk. *Synopsis Fungorum*, v. 11, p. 1-114, 1997.

MONCALVO, J.M.; WANG, F.H. Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complex based on ribosomal DNA sequences: comparison with traditional taxonomic characters. *Mycol. Res.*, v. 99, n. 12, p. 1489-1499, 1995.

MONTGOMERY, H. J.; MONREAL, C. M.; YOUNG, J. C.; SEIFERTD, K. A. Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 32, p. 1207-1217, 2000.

MURRIL, W.A. The polyporaceae of North America . I. The genus *Ganoderma*. Bulletin of the Torrey Botanical Club, v. 29, p. 599-608, 1902.

MUTO, Y.; NINOMIYA, M.; FUJIKI, H. Present status of research on cancer chemoprevention in Japan. Japanese Journal of Clinical Oncology, v. 20, p. 219-224, 1989.

NESS, G. C.; GERTZ, K. R.; HOLLAND, R. C. Regulation of hepatic lanosterol 14- α -demethylase gene expression by dietary cholesterol and cholesterol-lowering agents. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 395, n.2, p. 233-238, 2001.

NG, T. B. A review of research on the protein-bound polysaccharide (Polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes: Polyporaceae). Gen. Pharmacol., v. 30, p. 1-4, 1998.

NGAI, P. H. K.; NG; T. B. A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferative activity toward tumor cells. Biochem. Bioph. Res. Co., v. 314, p. 988-993, 2004.

Oliveira PFM, Henriques IA, Rodrigues-Filho F, Almeida PRC & Moraes, MO. Estabelecimento de um modelo de tumor experimental pela inoculação do tumor de Walker em estômago de rato. Acta Cir Bras. 1998

O'BRIEN, T.; NGUYEN, T. T.; HALLAWAY, B. J.; HODGE, D.; BAISLEY, K.; KOTTKE, B. A. HDL subparticles and coronary artery disease in NIDDM. Atherosclerosis, v. 121, n. 2, p. 285-291, 1996.

OOI, V.; LIU, F. A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides. Int. J. Med. Mushrooms, v.1, p. 195-206, 1999.

O'SHEA, J. J.; MA, A.; LIPSKY, P. Cytokines and autoimmunity. Nature Rev. Immunol., v. 2, p. 37-45, 2002.

PADAYATTY, S. J.; MARCELLI, M.; SHAO, T. C.; CUNNINGHAM, G. R. Lovastatin-induced apoptosis in prostate stromal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 82, n. 5, p. 1434-1439, 1997.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUES-LEÓN, J. A., NIGAM, P. *Solid-state fermentation in biotechnology – Fundamentals & Applications*. New Delhi: Asiatech, 2001.

PATOCKA, J. Anti-inflammatory triterpenoids from mysterious mushroom *Ganoderma lucidum* and their potential possibility in modern medicine. *Acta Medica*, v. 42, n. 4, p. 123-125, 1999.

PEGLER, D.N.; YOUNG, T.W.K. Basidiospore form in the British species of *Ganoderma* Karst. *Kew Bulletin*, v. 28, p. 351-364, 1973.

PERUSSIA, B.; TUTT, M. M.; QIU, W. Q.; KUZIEL, W. A.; TUCKER, P. W.; TRINCHIERI, G.; BENNETT, M.; RAVETCH, J. V.; KUMAR, V. Murine natural killer cells express functional Fc. receptor II encoded by the Fc.R. gene. *J. Exp. Med.*, v. 170, p. 73-86, 1989.

PEZZUTO, J. H. Plant-derived anticancer agents. *Biochem. Pharmacol.*, v. 53, p. 121-133, 1997.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, v.1, n. 3, 1998. Disponível: <http://www.ejbitechnology.info>

RAO, K. J.O.; KIM, C. H.O.; RHEE, S. K. Statistical optimization of medium for the production of recombinant hirudin from *Saccharomyces cerevisiae* using response surface methodology. *Process Biochem.*, v. 35, p. 639-647, 2000.

REEVES, P. G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J. Nutr.*, v. 127, p. 838s-841s, 1997.

ROSENBERG, S. A. Principles and applications of biologic therapy. In: DE VITA, V. T.; HELLMANN, S.; ROSENBERG, S. A. (eds.). *Cancer: principles & practice of oncology*. 4. ed., Philadelphia: J. B. Lippincott, 1993, p. 276-292.

ROSENBERG, S.; LOTZE, M.; MUUL, L. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v. 313, p. 1485-1492, 1985.

RUDDLE, N. H. Tumor necrosis factor (TNF-alpha) and lymphotoxin (TNF-beta). *Curr. Opin. Immunol.*, v. 4, n. 3, p. 327-332, 1992.

RYVARDEN, L. Genera of polypores, nomenclature and taxonomy. *Synopsis fungorum*, v. 5, p. 1-363, 1991.

SASAKI, T.; FUKAI, N.; MANN, K.; GOHRING, W.; OLSEN, B.R.; TIMPL, R. Structure and function of the C-terminal globular domain of collagen XVII containing the inhibitor endostatin. *EMBO Journal*, v. 17, p. 4249-4256, 1998.

SATO, S.; MILLER, A. S.; HOWARD, M. C.; TEDDER, T. F. Regulation of B lymphocyte development and activation by the CD19/CD21/CD81/Leu 13 complex requires the cytoplasmic domain of CD19. *J. Immunol.*, v. 159, p. 3278-3287, 1997.

SEITZ, L. M.; SAUER, D. B.; BURROUGHS, R.; MOHR, H. E.; HUBBARD, I. D. Ergosterol as a measure of fungal growth. *Phytopathology*, v. 69, p. 1202-1203, 1979.

SELIGER, B.; MAUERER, M. J.; FERRONE, S. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunology Today*, v. 21, p. 455-464, 2001.

SEO, G.S. In vitro photomorphogenesis and genetic diversity in the basidiomycete, *Ganoderma lucidum*. Tottori, 1995. Tese (Doutorado) - Tottori University, Japan. SEO, G. S.; KIRK, P. M. Ganoderma: nomenclature and classification. In: *Ganoderma* diseases of perennial crops. FLOOD, J.; HOLDERNESS, .M. UK, Royal Garden Academy: CABI Bioscience, 2000.

SEO, G.S.; OTANI, H.; KOHMOTO, K. Effect of light on the formation of atypical fruiting structures in *Ganoderma lucidum*. *Mycoscience*, v. 36, p. 227-233, 1995b.

SEO, G.S.; SHIN, L.G.C.; OTANI, H.; KOMADA, M.; KOHMOTO, K. Formation of atypical fruiting structures in *Ganoderma lucidum* isolates on a nutrition agar media. *Mycoscience*, v. 36, p. 1-7, 1995a.

SHAO, B. M.; DAI, H.; XU, W.; LIN, Z. B.; GAO, X. M. Immune receptors for polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, v. 323, p. 133-141, 2004.

SHARON, N.; LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. *Sci. Am.*, p. 74-81, 1993.

SHEENA, N.; AJITH, T.A.; JANARDHANAN, K. K. Prevention of nephrotoxicity by the anticancer drug cisplatin, using *Ganoderma lucidum*, a medical mushroom in South India. *Current Sci.*, v. 85, n. 4, p. 478-482, 2003.

SHI, Y.L.; JAMES, A.E.; BENZIE, I.F.F.; BUSWELL, J.A. Mushroom-derived preparations in the prevention of H₂O₂-induced oxidative damage to cellular DNA. *Teratogen. Carcin Mut.* V. 22, n. 2, p. 103-111, 2002.

SHIN, G.C.; PARK, Y.H.; SEO, G.S.; CHA, D.Y. Morphological characters of *Ganoderma lucidum* (Fr) Karsten grown naturally in Korea. *Research Reports of Institute of Agricultural Science and Technology*, v. 13, p. 44-51, 1986.

SHIN, G.C.; SEO, G.S. Formation of the nonbasidiocarpous basidiospore of *Ganoderma lucidum*. Korean Journal of Mycology, v. 16, p. 230-234, 1988a.

SHIN, G.C.; SEO, G.S. Classification of strains of *Ganoderma lucidum*. Korean Journal Mycology, v. d16, p. 235-241, 1988b.

SHIN, G.C.; SEO, G.S. Effect of temperature and aeration on the formation of non-basidicarpus basidiospores of *Ganoderma lucidum*. Korean Journal Mycology, v. 17, p. 194-196, 1989.

SILVA, P. M. Estatinas: ações farmacológicas e características farmaco-cinéticas. Revista da FML, v.4, n. 5, p. 3344, 1999.

SIRIVICHAYAKUL, S. In vitro immunomodulating effects of *Ganoderma lucidum* extracts. Disponível em: <http://www.kyotan.com/lectures/Lecture14.html>. Acesso em 08 jan. 2004.

SLIVA, D.; LABARRERE, C.; SLINOVA, V.; SEDLAK, M.; LLOYD Jr., F. P.; HO, N. W. Y. *Ganoderma lucidum* suppresses motility of highly invasive breast and prostate cancer cells. Biochem. Bioph. Res. Co., v. 298, p. 603-612, 2002.

SMITH, E. L.; HILL, R. L.; LEHMAN, I. R.; LEFKOWITZ, R. J.; HANDLER, P.; WHITE, A. Principles of Biochemistry. 7. ed. New York: McGraw-Hill, 1983.

SMYTH, M. J.; TANIGUCHI, M.; STREET, S. E. A. The anti-tumor activity of IL-12: mechanisms of innate immunity that are model and dose dependent. J. Immunol., v. 165, p. 2665-2670, 2000.

SOCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. Biochem. Eng. J., v. 13, p. 205-218, 2003.

SONG, Y. S.; KIM, S. H.; SA, J. H.; JIN, C.; LIM, C. J.; PARK, E. H. Anti-angiogenic and inhibitory activity on inducible nitric oxide production of the mushroom *Ganoderma lucidum*. J. Ethnopharmacol., v. 90, p. 17-20, 2004.

STAMETS, P. Evaluating a mushroom strain: photosensitivity. In: Growing gourmet and medical mushrooms. California: Ten Speed, p. 117-126, 1993a.

STEINBERG, D.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T. E.; KHOO, J. C.; WITZTUM, J. L. The role of post-secretory structural modification of low density lipoprotein in atherogenesis. N. Engl. J. Med., v. 320, p. 915-924, 1989.

STEWARTT, H. L.; SNELL, K. C.; DUNHAN, L. S.; SCHYLEN, S. M. Transplantable and transmissible tumors of animals. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, 1959.

STEYAERT, R.L. Species of *Ganoderma* and related genera mainly of the Bogor and Lieden herbaria. Persooni, v. 7, p. 55-118, 1972.

STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLow, T. G. Medical Immunology. 9. ed. Stamford: Appleton & Lange. 1997. 900 p.

STRASINGER, S. K. Uroanálise & Fluídos biológicos. 3. ed., Brasil: Premier, 2000.

STASSMANN, G.; FONG, M.; KENNEY, J. S.; JACOB, C. O. Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. J. Clin. Invest., 89: 1681-1684, 1992.

SU, C.Y.; SHIAO, M.S.; WANG, C.T. Differential effects of Ganodermic Acid S on the thromboxane A₂-signaling pathways in human platelets. Biochem. Pharmacol., v. 58, p. 587-595, 1999.

SU, C.Y.; SHIAO, M.S.; WANG, C.T. Potentiation of ganodermic acid S on prostaglandin E1-induced cyclic AMP elevation in human platelets. *Thromb. Res.*, v. 99, p. 135-145, 2000.

SU, C.H.; SUN, C.S.; JUAN, S.W.; HU, C.H.; KE, W.T.; SHEU, M.T. Fungal mycelia as the source of chitin and polysaccharides and their applications as skin substitutes. *Biomaterials*, v. 18, n. 17, p. 1169-1174, 1997.

SWEETMAN, S. *Martindale: The complete drug reference*. London: Pharmaceutical Press. Eletronic version, v. 20, Micromedex, Colorado, 2004.

TABATA, K.; ITOH, W.; KOJIMA, T.; KAWABATE, S.; MISAKI, K. Ultrasonic degradation of schizophyllan, an antitumor polysaccharide produced by *Schizophyllum communes* FRIES. *Carbohyd. Res.*, v. 89, p. 121-135, 1981.

TANG, Y.J.; ZHONG, J.J. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganodermic acid. *Enzyme Microb. Tech.*, v. 31, p. 20-28, 2002.

TANG, Y. J.; ZHONG, J. J. Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme Microb. Tech.*, v. 32, p. 478-484, 2003.

TIAN, X.; LUN, Z.; WANG, J.; ITO, H.; SHIMURA, K. Clinical observation on treatment of acute non lymphocytic leukemia with *A. blazei*. *Journal of Lanzhou Medical College*, v. 20, n. 3, p. 169-171, 1994.

TISDALE, M. J. Cancer cachexia: metabolic alterations and clinical manifestations. *Nutrition*, v. 13, n. 1, p. 1-7, 1997.

TOLOSA, L.; MORLÁ, M.; IGLESIAS, A.; BUSQUETS, X.; LLADÓ, J.; OLMOS, G. IFN-. prevents TNF-a-induced apoptosis in C2C12 myotubes through down-regulation of TNF-R2 and increased NF-.B activity. *Cell. Signal.*, v.17, n.11, p.1333-1342, 2005.

TOMODA, M.; GONDA, R.; KASAHARA, Y.; HIKINO, H. Glycan structures of ganoderans B and C, hypoglycemic glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Phytochemistry*, v. 25, n. 12, p. 2817-2820, 1986.

THORP, J. M.; WARING, W. S. Modification and distribution of lipids by ethyl chlorophenoxyisobutyrate. *Nature*, v. 194, p. 948-949, 1962.

TSUKAGOSHI, S.; HASHIMOTO, Y.; FUJII, G.; KOBAYASHI, H.; NOMOTO, K.; ORITA, K. Krestin (PSK). *Cancer Treat. Rev.*, v. 11, n. 2, p. 131-155, 1984.

UNIVERSITY OF MINNESOTA. Cancer Center. Flow Core User Handbook - FACSCalibur . Disponível em: <http://www.cancer.umn.edu/page/cores/flowcyte.html>. Acesso em: 08 jul. 2005.

URBEN, A. F. Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada. 2 ed. Brasília: Embrapa, 2005.

USDA Nutrient Database for Standard Reference, (2001). Disponível em: <http://www.unifesp.br/dis/serviços/nutri/nutri.phb>. Acesso em 09 fev. 2005.

USLU, R.; BONAVIDA, B. Involvement of the mitochondrion respiratory chain in the synergy achieved by treatment of human ovarian carcinoma cells line with tumor necrosis factor-alpha and cis-diammine dichloroplatinum (II). *Cancer*, v. 77, p. 725-732, 1996.

Villas-Boas FIP, Monico MH, Takehara CM. A sobrevida de ratos com tumor de Walker. *Rev Odontol Univ Est São Paulo*. 1988; 17(1/2):165-8.

WACHTEL-GALOR, S.; SZETO, Y. T.; TOMLINSON, B.; BENZIE, I. F. *Ganoderma lucidum* ('Lingzhi'); acute and short-term biomarker response to supplementation. *Int. J. Food Sci. Nutr.* v. 55, n. 1, p. 75-83, 2004.

WANG, L.; FENG, Q.; XU, X.; MA, H.; WANG, J.; ITO, H.; SHIMURA, K. Observation on the treatment effect of *A blazei* to the liver function of chronic hepatitis patients *Journal of Lanzhou Medical College*, v. 20, n.1, p. 24-26, 1994a.

WANG, S. Y.; HSU, M. L.; HSU, H. C.; TZENG, C. H.; LEE, S. S.; SHIAO, M. S.; HO, C. K. The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. *Int. J. Cancer*, v. 70, p. 699-705, 1997.

WANG, Y.Y.; KHOO, K.H.; CHEN, S.T.; LIN, C.C.; WONG, C.H.; LIN, C.H. Studies on the immuno-modulating and antitumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides: functional and proteomic analyses of a fucose-containing glycoprotein fraction responsible for the activities. *Biorgan. Med. Chem.*, v. 10, p. 1057-1062, 2002.

WANG, J.; MAO, X.; CHENG, R.; WANG, J.Z.; ITO, H.; SHIMURA, K. Observation on treatment effect of *A blazei* against alimentary tract tumor. *Gansu Medical J.* V. 13, n. 1, p. 5-7, 1994b .

WASSER S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 60, p. 258-274, 2002.

WASSER, S. P. Review of medicinal mushrooms advances: good news from old allies. Disponível em: <http://abm.objectis.net/conceptos>. Acesso em: 05 maio 2005.

WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Crit. Rev. Immunol.*, v. 19, p. 65-96, 1999.

WILLIS, R. A. The spread of tumors in the human body. In: Pathology of tumors. 2. ed. London: Butterworth, 1952.

WOO, Y.A.; KIM, H.J.; CHO, J.H.; CHUNG, H. Discrimination of herbal medicines according to geographical origin with near infrared reflectance spectroscopy and pattern recognition techniques. J. Pharmaceut. Biomed., v. 21, p. 407-413, 1999.

YAMAMOTO, K.; ASAKAWA, H.; TOKUNAGA, K.; WATANABE, H.; MATSUO, N.; TOKIMITSU, I.; YAGI, N. Long-term ingestion of dietary diacylglycerol lowers serum triacylglycerol in tipe II diabetic. Human Nutrition and Metabolism Research Communication, v. 131, n. 12, p. 3204-3207, 2001.

YANAI, K.; YANAI, T.; YANAI, I. Fungus obtained by the fusion of *Grifola umbellata* and *Ganoderma lucidum*. Int. A61K 037/00 U.S. 5,455,171. 15 November 1993, 3 October 1995.

YANG, F.C.; KE, Y.F.; KUO, S.S. Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. Enzyme Microb. Tech. v. 27, p. 295-301, 2000.

YANG, F. C.; LIAU, C. B. The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. Process Biochem., v. 33, n. 5, p. 547-553, 1998.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. Biochem. J., v. 57, p.508-514, 1954.

YOU, Y.H.; LIN, Z.B. Protective effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide on injury of macrophages induced by reactive oxygen species. Acta Pharmacol. Sin., v. 23, n. 9, p. 787-791, 2002.

Zeisel S. Regulation of "nutraceuticals". *Science* 285: 1853-1855, 1999.

ZGANIACZ, A.; SANTOSUOSSO; WANG, J.; YANG, T.; CHEN, L.; ANZULOVIC, M.; ALEXANDER, S.; GICQUEL, B.; WAN, Y.; BRAMSON, J.; INMAN, M.; XING, Z. TNF- α is a critical negative regulator of type 1 immune activation during intracellular bacterial infection. *J. Clin. Invest.*, v. 113, n. 3, p. 401-413, 2004.

ZHAO, J. D. The Ganodermataceae in China. *Bibliotheca Mycologica*, v. 132, p. 1-176, 1989.

ZHANG, G. L.; WANG, Y.H.; NI, W.; TENG, H.L.; LIN, Z.B. Hepatoprotective role of *Ganoderma lucidum* polysaccharide against BCG-induced immune liver injury in mice. *Acta Pharmacol. Sin.*, v. 23, n. 9, p. 787-791, 2002b.

ZHANG, H.; LIN, Z. Hypoglycemic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides. *Acta Pharmacol. Sin.*, v. 25, n. 2, 191-195, 2004.

ZHANG, J.; TANG, Q.; ZIMMERMAN-KORDMAN, M.; REUTTER, W.; FAN, H. Activation of B lymphocytes by GLIS, a bioactive proteoglycan from *Ganoderma lucidum*. *Life Sci.*, v. 71, p. 623-638, 2002a.

ZUCKERBERG, C. Ultraestrutura of Sarcoma 180. *Cancer Res.*, v. 33, p. 2278-2282, 1973.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.