



Ângela Mónica Pinto Carreira Guedes

## Cogumelos em Fitoterapia: Eficácia e Segurança

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Lúcia Maria Ribeiro Pires Salgueiro e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ângela Mónica Pinto Carreira Guedes

# Cogumelos em Fitoterapia: Eficácia e Segurança

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,  
orientada pela Professora Doutora Lígia Maria Ribeiro Pires Salgueiro e apresentada à Faculdade de  
Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

*À Doutora Lígia Salgueiro, pela orientação, disponibilidade e conhecimentos transmitidos.*

*Aos meus pais, José e Celeste pelos valores transmitidos, por todo o carinho, apoio e amor incondicional. Obrigada por sempre acreditarem em mim e pela oportunidade de concretizar este sonho.*

*Ao meu irmão e melhor amigo, António, por estar presente em todos os momentos da minha vida.*

*À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, da qual tenho um enorme orgulho em pertencer, em especial aos docentes pela dedicação e conhecimentos transmitidos.*

*Aos meus amigos, pela amizade, apoio e companheirismo.*

*A Coimbra, a cidade que tão bem acolheu ao longo destes anos. A cidade que levo no coração.*

**Índice**

ABREVIATURAS .....	2
RESUMO .....	3
ABSTRACT .....	4
1. INTRODUÇÃO .....	5
2. COGUMELOS COM PROPRIEDADES MEDICINAIS .....	6
2.1. <i>Coriolus versicolor</i> .....	6
2.2. <i>Ganoderma lucidum</i> .....	10
2.3. <i>Grifola frondosa</i> .....	14
2.4. <i>Inonotus obliquus</i> .....	18
2.5. <i>Hericium erinaceus</i> .....	21
3. INTERAÇÕES ENTRE COGUMELOS MEDICINAIS E MEDICAMENTOS.....	23
4. TOXICIDADE ASSOCIADA AOS COGUMELOS MEDICINAIS .....	23
5. MYCOLOGY RESEARCH LABORATORIES .....	25
6. CONCLUSÃO .....	26
7. BIBLIOGRAFIA .....	27

## **ABREVIATURAS**

**Bad**-*Bcl-2 antagonist of the cell death*

**Bax** - *Bcl-2 associated X protein*

**Bcl-xL** - *B-cell lymphoma 2 extra large*

**Bcl-2** - *B-cell lymphoma 2*

**CDK** - cinase dependente da ciclina

**CDKI** - Inibidores de cinase dependente da ciclina

**Cv**- *Coriolus versicolor*

**EPO** - Ergosterol Peroxidase

**EEIO** - Extrato Etanólico de *Inonotus obliquus*

**GI** - *Ganoderma lucidum*

**Gf** - *Grifola frondosa*

**GPII** - *Water-soluble polysaccharide*

**He** - *Heridium erinaceus*

**HEPG2** - Linha celular de hepatoma humano

**HPV** - Vírus do Papiloma Humano

**IL** - Interleucina

**INFARMED** - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.

**Io** - *Inonotus obliquus*

**JNK** - *Jun N-terminal Kinase*

**LPS** - Lipopolissacárido

**MTC** - Medicina Tradicional Chinesa

**MRL** - *Mycology Research Laboratories*

**NK** - Células *Natural Killer*

**NF-κB** - Fator Nuclear KB

**PSK** - *Polysaccharide-Krestine*

**PSP** - *Polysaccharide Peptide*

**SFC** - Síndrome da fadiga crónica

**TNF-α** - Fator de necrose tumoral-α

**TRL** - *Toll-like receptors*

**VEGF** - Fator de crescimento endotelial vascular

## RESUMO

As primeiras evidências das propriedades medicinais dos cogumelos foram reconhecidas na Ásia. Atualmente, verifica-se um interesse crescente nesta área por parte dos países Ocidentais. A prova disso são os avanços importantes que se têm feito notar nas investigações científicas realizadas por equipas qualificadas multidisciplinares, nas quais o papel do farmacêutico é também importante.

Os cogumelos medicinais são uma fonte de compostos bioativos benéficos para a saúde, associados a atividades biológicas como a atividade antitumoral, imunomoduladora, neuroprotetora, cardioprotetora, antiviral, anti-inflamatória, antioxidante, hepatoprotetora, antidiabética. Por isso, são um potencial alvo para o desenvolvimento de novas terapêuticas, como por exemplo, a prevenção e tratamento de patologias como o cancro, de modo a permitir uma melhoria na qualidade de vida dos doentes.

Esta monografia tem como objetivo abordar alguns cogumelos com propriedades medicinais, tais como, *Coriolus versicolor*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Inonotus obliquus* e *Hericiium erinaceus*, por serem dos mais usados e com mais estudos clínicos. Dá-se ênfase aos compostos bioativos e à atividade que lhes está associada, em particular, a atividade antitumoral e imunomoduladora referindo o seu modo de ação, aspetos de eficácia e segurança, tendo em conta estudos realizados *in vitro* e *in vivo*.

**Palavras-chave:** Cogumelos medicinais, *Coriolus versicolor*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Inonotus obliquus*, *Hericiium erinaceus*, eficácia, segurança.

**ABSTRACT**

The primary evidences of medicinal properties in mushrooms were firstly acknowledged in Asia. Nowadays, it is undeniable the progressive interest of Western countries regarding this subject. Subsequently, several major developments in the related research have been achieved by qualified and multidisciplinary teams, in which the pharmaceutical display a valuable role.

Medicinal mushrooms are a source of healthy bioactive compounds, linked to biological activities such as the antitumor, immunomodulating, neuroprotective, cardioprotective, antiviral, antiinflammatory, antioxidant, hepatoprotective and antidiabetical. As we can see, they represent a potential target for the development of new therapeutics, especially associated with the prevention and treatment of pathologies like cancer, in order to increase the quality of life of the sick.

The main focus of the present monography is to analyse some mushrooms with medicinal properties, such as, *Coriolus versicolor*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Inonotus obliquus* and *Hericium erinaceus*, considering these are the most used and clinically tested. It will be emphasized the bioactive compounds and its activity, particularly the antitumor and the immunomodulating, mentioning the respective course of action and the efectiveness and security aspects, always keeping in mind studies conducted *in vitro* and *in vivo*.

**Key words:** Medicinal mushrooms, *Coriolus versicolor*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Inonotus obliquus* and *Hericium erinaceus*, efectiveness and security aspects.

## I. INTRODUÇÃO

A Fitoterapia é a ciência que estuda a utilização de produtos de origem vegetal com uma finalidade terapêutica como prevenir, atenuar ou curar um estado patológico.<sup>1</sup>

Empiricamente, as civilizações primitivas usavam as plantas e outros produtos de origem vegetal para o tratamento de diversas patologias. Estes eram os únicos recursos disponíveis, e ainda o são nos dias de hoje, em alguns países em vias de desenvolvimento. No entanto, é fundamental referir que o conceito de que, o natural é benéfico e não traz efeitos adversos, é errado. Podem estar presentes constituintes que em determinadas concentrações, e após um uso prolongado são nefastos. O interesse crescente por esta área é evidente, uma vez que os benefícios são diversos e os efeitos secundários associados aos medicamentos convencionais são comuns. A Fitoterapia não se baseia apenas no uso tradicional de plantas, cogumelos e outros produtos de origem vegetal mas em aspetos que garantam a qualidade, segurança e eficácia dos mesmos.<sup>2</sup>

“De acordo com o Decreto-Lei n.º 176/2006, de 30 de Agosto, entende-se por «Medicamento à base de plantas», qualquer medicamento que tenha exclusivamente como substâncias ativas uma ou mais substâncias derivadas de plantas, uma ou mais preparações à base de plantas ou uma ou mais substâncias derivadas de plantas em associação com uma ou mais preparações à base de plantas”, sendo o INFARMED a Autoridade Competente.”<sup>3</sup>

Em Portugal, parte dos produtos à base de produtos naturais, como as plantas e os cogumelos, são comercializados como suplementos alimentares.

De acordo com o Decreto-Lei n.º 118/2015 de 23 de junho, os suplementos alimentares são “géneros alimentícios que se destinam a complementar e ou suplementar o regime alimentar normal e que constituem fontes concentradas de determinadas substâncias nutrientes ou outras com efeito nutricional ou fisiológico, estemes ou combinadas” e são regulados pela Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV).<sup>4</sup>

A Micologia é a ciência que estuda os fungos, inicialmente considerada uma ramo da Botânica. Os fungos eram denominados de plantas primitivas, posteriormente, identificaram-se diferenças, tais como: a decomposição da matéria orgânica, a ausência de clorofila e do processo de fotossíntese, a presença de ergosterol e quitina (um polissacárido derivado da glucose ausente nas plantas).<sup>5</sup>

Os cogumelos, assim comumente designados, são macrofungos que possuem um corpo frutífero distinto, e pertencem na maioria ao filo Basidiomycota, do reino Fungi. Estima-se que existem 140 000 espécies em todo o Mundo, destas apenas 14 000 a 22 000

são conhecidas. As espécies que se conhecem são um recurso ainda pouco explorado e investigado.<sup>6</sup>

No entanto, o uso de cogumelos com fins medicinais está descrito há mais de 3000 anos pelos países Asiáticos, sendo muito utilizados na Medicina Tradicional Chinesa (MTC) e também na alimentação. Nas últimas décadas, o interesse dos países Ocidentais pelas suas propriedades terapêuticas tem vindo a aumentar.<sup>7</sup>

Investigações recentes demonstram que estes possuem atividades biológicas, tais como: antitumoral, imunomoduladora, cardioprotetora, antiviral, anti-inflamatória, antioxidante, hepatoprotetora e antidiabética.<sup>8,9</sup>

Alguns exemplos de cogumelos com este potencial terapêutico são: o *Coriolus versicolor*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Hericium erinaceus* e *Inonotus obliquus*.

Com esta monografia pretendo fazer uma abordagem dos cogumelos acima mencionados, referindo quais são os seus principais constituintes e as propriedades medicinais que lhe estão associados dando ênfase à atividade antitumoral e imunomoduladora. São também referidas potenciais interações com medicamentos e eventual toxicidade, tendo em conta estudos *in vitro*, *in vivo* e ensaios clínicos realizados até ao momento, e por fim fazer uma abordagem dos produtos comercializados em Portugal.

Escolhi este tema porque o considero bastante aliciante, uma área ainda pouco explorada mas com um enorme potencial. Desta forma, posso alargar os meus conhecimentos nesta vertente que será sem dúvida, enriquecedora para o meu futuro como Farmacêutica.

## 2. COGUMELOS COM PROPRIEDADES MEDICINAIS

### 2.1. *Coriolus versicolor*

*Coriolus versicolor* (Cv) é um macrofungo também denominado de *Trametes versicolor* e *Polyporus versicolor*. Na China é conhecido por Yun Zhi e no Norte da América por “turkey tail”. É um cogumelo basidiomiceto e pertence à família Polyporaceae. Este fungo encontra-se em zonas temperadas arborizadas da Ásia, Europa e América do Norte. Com uma longa história na medicina tradicional nos países Asiáticos, é frequentemente indicado para vários tipos de cancro, hepatite crónica e infeções do trato respiratório, urinário e digestivo.<sup>10,11</sup>

#### Constituintes ativos

Os compostos responsáveis pelas atividades biológicas, nomeadamente imunomoduladora e anticancerígena são: o PSK (*Polysaccharide-Krestine*) e o PSP (*Polysaccharide Peptide*). O PSK é um polissacarídeo com ligação proteica, é usado no Japão

há mais de 30 anos pelo seu efeito imunomodulador em vários tumores como pulmão, mama, e coloretal. Foi o primeiro composto isolado em 1971 do Cv. Tal como o PSK, o PSP é também um polissacarídeo constituído por  $\beta$ -D-glucanos com ligação proteica. Têm estruturas idênticas mas são distinguidos pela sua composição. O PSK apresenta fucose enquanto o PSP apresenta ramnose e arabinose. A composição destes complexos polissacárido-proteína é dependente da fonte e do método de extração. A tabela seguinte demonstra as diferenças entre o PSK e PSP.<sup>12,13</sup>

**Tabela I - Diferenças entre PSK e PSP.**

	<b>PSP</b>	<b>PSK</b>
Source	Mycelia of <i>Coriolus versicolor</i> Cov-1 strain	Mycelia of <i>Coriolus versicolor</i> CM-101 strain
Produced in	China	Japan
Appeared on the market in	1987	1977
Extract method	Recovered by alcoholic precipitation from hot water extract	Recovered from hot water extracts of the biomass by salting out with ammonium sulfate
Physicochemical properties	Brown in color; soluble in water; insoluble in organic solvents; stable to heat; mean MW=100kDa	Brown in color; soluble in water; insoluble in organic solvents; stable to heat; mean MW=100kDa
Chemical composition	(1 $\rightarrow$ 3) $\beta$ -glucan branched at 4' and 6' positions	18%--38% w/w protein (1 $\rightarrow$ 3) $\beta$ -glucan branched at 4' and 6' positions
Biological properties	rhamnose, arabinose <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> immunorestorative and anti-tumor activities	fucose <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> immunorestorative and anti-tumor activities
References	Sakagami and Takeda, 1993; Ng et al, 1999; Kidd, 2000; Cui and Yusuf, 2003	

É utilizado como extrato ou biomassa. A biomassa contém micélio e primórdios, sendo mais resistente a enzima proteolíticas do que os extratos. A biomassa contém  $\beta$ -glucanos tal como os extratos mas também enzimas como a superoxidase dismutase, peroxidase,  $\beta$ -glucanase, citocromo redutase, glucoamilase, e protease. Metabolitos secundários, como terpenos, esteróis, antraquinonas, derivados do ácido benzóico e quinolonas não são detetadas em grandes quantidades nos extratos.<sup>14</sup>

### Principais atividades biológicas

São-lhe reconhecidas diversas propriedades medicinais nomeadamente imunomoduladora, antitumoral, antimicrobiana e hepatoprotetora.<sup>11</sup>

## Atividade imunomoduladora e antitumoral

Cv é frequentemente utilizado como adjuvante no tratamento do cancro. Os extratos obtidos demonstram a sua capacidade de estimular o sistema imune e inibir o crescimento das células cancerígenas. O efeito antitumoral deve-se sobretudo a esta capacidade de regulação imunomoduladora mas também ao seu efeito citotóxico direto, e por isso é conhecido como um modificador da resposta biológica.<sup>13</sup>

### Estudos *in vitro* e *in vivo*

Cv foi responsável por aumentar a proliferação de linfócitos-T em ratos;<sup>15</sup> inibir a proliferação de uma linha celular de hepatoma humano (HEPG2) mas o mesmo não se verificou em hepatócitos fetais humanos. A progressão do sarcoma 180 inoculado em ratinhos foi também reduzido com a administração de PSP e PSK.<sup>10</sup>

A ciclofosfamida é um fármaco citotóxico com efeito deletério no sistema imune. Investigações demonstram que PSP antagoniza a imunossupressão causada por agentes quimioterápicos. A administração de PSP (2 g/kg/dia) em ratos com imunossupressão induzida por ciclofosfamida foi avaliada; o extrato deste cogumelo demonstrou ser efetivo no restabelecimento do sistema imune ao estimular da proliferação de linfócitos, e as funções de células *Natural Killer* (NK).<sup>13</sup>

### Ensaio Clínico

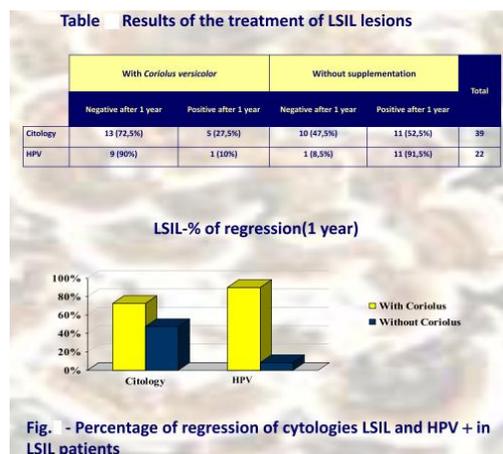
Os doentes com Síndrome de Fadiga Crónica (SFC) têm valores baixos de células NK e a mudança nestes níveis são um indicador da progressão e da evolução da sua condição. Foi realizado um estudo<sup>16</sup> desenvolvido em 15 pacientes diagnosticados com SFC, durante 15 dias com um suplemento de *Coriolus-MRL*\* (6 comprimidos por dia de 500 mg), e posteriormente durante 45 dias, 3 comprimidos por dia. No fim, avaliou-se a atividade das células NK e verificou-se que o suplemento aumentou a atividade das células NK, logo tem capacidade para aliviar os sintomas de SFC.<sup>16</sup>

\**Coriolus-MRL*: *Coriolus versicolor* fornecido por Mycology Research Laboratories (MRL).

Foi realizado um estudo<sup>17</sup> para avaliar a eficácia do suplemento *Coriolus-MRL* no tratamento de lesões provocadas pelo Vírus do Papiloma Humano (HPV).<sup>17</sup> Durante 1 ano, um grupo de 43 mulheres com lesões cervicais, confirmadas por citologia, colposcopia e biopsia foram divididas ao acaso em 2 grupos. Das 43 apenas 39 completaram o estudo. Um grupo (22 pacientes) tratado com o suplemento (3 g por dia, 6 comprimidos por dia) e um grupo controlo (21 mulheres) que não recebeu tratamento. Verificou-se após 1 ano de

tratamento que a citologia cervical estava normal em 72,5% (13 mulheres) do grupo tratado e que apenas 47,5% (10 mulheres) do grupo controlo apresentaram citologia cervical normal. Os resultados obtidos no estudo estão descritos na Figura 1. Foi demonstrada a eficácia do suplemento de *Coriolus*-MRL nas lesões provocadas por HPV, ao regredir a displasia (lesão de baixo grau) provocada por HPV e no desaparecimento de HPV de alto risco.<sup>17</sup>

Figura 1 - Resultados obtidos no estudo.



Posteriormente a este estudo, outros dois<sup>18</sup> foram realizados separadamente e num período de 6 meses. O primeiro com 100 mulheres entre os 16 e 50 anos infetadas com subtipos de HPV de alto e baixo risco tratadas com *Coriolus*-MRL (500 mg por dia) durante 6 meses. Um grupo de 73 mulheres apenas com o suplemento e outro de 27 mulheres com terapia combinada (intervenção cirúrgica e *Coriolus*-MRL). Das 73 mulheres tratadas apenas com o suplemento em 64 desapareceu o HPV (88% do total). No grupo do tratamento combinado 93% (25 pessoas) tinham HPV negativo. No fim do estudo apenas 11 pessoas eram HPV positivo, sendo que o subtipo HPV 16 foi o mais resistente ao tratamento.<sup>18</sup>

Um outro estudo<sup>18</sup> com 200 mulheres HPV positivo com idades entre os 16 e os 45 anos foram também tratadas com 500 mg de *Coriolus*-MRL. Neste estudo foi avaliada a possibilidade de reações adversas, interações com medicamentos e a possibilidade de efeitos adversos em grávidas. Ao fim de 6 meses 95% das mulheres tinham HPV negativo. As mulheres com HPV positivo mas sem alterações histológicas reverteram a situação logo ao fim de 3 meses. O HPV 16 também demonstrou ser o mais resistente ao tratamento. Concluiu-se que a redução do período de tratamento de 1 ano para 6 meses foi também eficaz, ocorreu regressão das displasias e desaparecimento de HPV; não ocorreram reações adversas nem interações medicamentosas, e verificou-se que *Coriolus*-MRL pode ser utilizado na gravidez.<sup>18</sup>

Há 13 subtipos de HPV, sendo alguns deles de alto risco nomeadamente o 16, 18, 31 e 45. O HPV do tipo 16 e 18 são responsáveis por 70% dos cancros cervicais. E por isso erradicar ou controlar o vírus HPV é fundamental. O resultado destes 3 estudos sugerem que o *Coriolus*-MRL é efetivo no tratamento da infeção por HPV.

Um ensaio clínico de fase I com Cv permitiu analisar o seu efeito no sistema imune após a quimioterapia e a radioterapia em mulheres com cancro da mama. Durante 6

semanas fez-se um escalonamento de dose (3, 6, 9 g/dia) e administrou-se em 11 doentes. Apenas 9 terminaram o estudo por efeitos adversos, como ataque de ansiedade, palpitações, febre, dor no peito. Dos parâmetros imunológicos analisados o número de linfócitos aumentou com 6 e 9 g/dia, a atividade das células NK aumentou com 6g/dia e ocorreu um aumento dose-dependente nas células T CD8<sup>+</sup> e nas células B CD19<sup>+</sup>. Estes resultados sugerem que a preparação de Cv foi seguro e tolerável em mulheres com cancro da mama, e que pode melhorar o sistema imune após o tratamento da quimioterapia e radioterapia.<sup>19</sup>

Um ensaio piloto de fase II<sup>15</sup>, duplamente cego e controlado por placebo foi realizado em doentes com cancro avançado nas células pequenas do pulmão. Analisou-se o efeito da administração de PSP (3 cápsulas por dia com 340 mg cada) durante 4 semanas. Verificou-se no grupo tratado com PSP uma melhoria nos níveis de leucócitos, neutrófilos, imunoglobina M (IgM) e imunoglobina G (IgG) no soro e gordura corporal. O tratamento com PSP parece estar associado há diminuição da progressão do tumor. No entanto, este mecanismo do PSP em melhorar os índices hematológicos, imunoglobulinas no soro e o aumento de teor de gordura corporal não ficou claro.<sup>15</sup>

Os extratos de Cv demonstraram ser seguros e efetivos a longo prazo como imunoterapia adjuvante em conjunto ou após o tratamento de quimioterapia. Aumentam o tempo sobrevivência e melhoram os sintomas associados aos tumores em doentes com cancro do pulmão.<sup>12</sup>

## 2.2. GANODERMA LUCIDUM

O *Ganoderma lucidum* (Gl) também designado de *Reishi* e *Lingzhi* é um cogumelo comestível muito popular e também comumente designado de “cogumelo vermelho”; *lucidum* significa “brilhante” em latim e refere-se ao seu corpo de frutificação com um aspeto envernizado. É um fungo basidiomiceto faz parte da família Ganodermataceae. Cresce em árvores como o Carvalho e a Ameixeira do Japão. Foi usado durante séculos na China e no Japão pelas suas propriedades medicinais; é conhecido por preservar a vitalidade humana e promover a longevidade. O cogumelo Gl foi usado para o tratamento de várias doenças como alergias, bronquite, hiperglicemia, hipertensão, hepatite crónica, insónia e cancro.<sup>6,20</sup>

### Constituintes ativos

Estudos realizados com *Ganoderma lucidum* permitiram identificar e isolar aproximadamente 400 substâncias diferentes, mais de 150 possuem efeitos medicinais.<sup>6,21</sup>

Os compostos identificados presentes no micélio e corpos de frutificação são na maioria polissacarídeos dos quais  $\beta$ -glucanos, triterpenos nomeadamente ácido ganodérico,

ácido lucidénico, ácido ganolucidico, e também proteínas, aminoácidos, péptidos, ergosterol e alcalóides.<sup>20</sup>

### **Principais atividades biológicas**

Investigações científicas recentes indicam que este cogumelo tem atividade antitumoral, anti-inflamatória, imunomoduladora, antioxidante, antiviral, antibacteriana, antialérgica, sendo que a sua atividade anticancerígena é das mais atrativas.<sup>21</sup>

### **Atividade antitumoral e imunomoduladora**

Em geral, os polissacáridos são os que apresentam maior capacidade imunomoduladora e antitumoral, os (1-3)- $\beta$ -D-glucanos são responsáveis por essa atividade no GI.<sup>22</sup>

Este cogumelo modela várias vias de sinalização que resultam na inibição do ciclo celular, indução da apoptose e supressão de metástases.<sup>20</sup> GI inibe fatores de transcrição como o Fator Nuclear KB (NF-kB) e a proteína ativadora-1 (AP-1), que sugerem ser um potente alvo terapêutico para o tratamento do cancro. O NF-kB controla a expressão de proteínas envolvidas na adesão, migração e invasão celular (uPA, o ativador de plasminogénio urocinase; uPAR, recetor do ativador de plasminogénio tipo urocinase), proteínas protetoras contra a morte celular (Bcl-2, *B-cell lymphoma 2* e Bcl-xL, *B-cell lymphoma 2 extra large*), oncoproteínas que estimulam a desregulação do ciclo celular e a formação do tumor (ciclina D1) e fatores de angiogénese que estimulam o crescimento tumoral como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento fibroblástico-2 (FGF2), Fator de Transformação do Crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), MMP-9 (Matrix metalopeptidase-9) e COX-2 (Ciclo-oxigenase-2). A inibição de NF-kB é especialmente importante na prevenção e tratamento do cancro. Uma característica das células no cancro metastático é a ativação de fatores de transcrição NF-kB e AP-1. A inibição destes fatores resulta na ausência da secreção de uPA levando a inibição da migração celular em células altamente invasivas do cancro da mama. Têm-se verificado que GI inibe estes fatores em células do cancro da mama e da próstata. Além disso inibe a adesão da fibronectina (FN) por ligação ao  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 e da vitronectina (VN) por ligação ao recetor  $\alpha$ V $\beta$ 3. A inibição de complexos uPA-uPAR-FN- $\alpha$ 3 $\beta$ 1 e uPA-uPAR-VN- $\alpha$ V $\beta$ 3 por GI resulta na inibição da adesão celular e da motilidade em células invasivas do cancro da próstata e da mama.<sup>20</sup>

A atividade tumoral deste cogumelo deve-se a inibição e estimulação de mecanismos e vias de sinalização específicas. Parte destes efeitos são indiretos e causados pela

estimulação do sistema imune e libertação de citocinas a partir de macrófagos ativadas e linfócitos T. Outros atuam diretamente no tumor por modelação das vias de sinalização intracelular e pode afetar o comportamento das células cancerígenas. A tabela seguinte (Tabela II) resume os mecanismos referidos anteriormente.<sup>20</sup>

**Tabela II** – Mecanismos de ação do *Ganoderma lucidum* em células cancerígenas.

Target Molecule		Biological Effect	Cell Type	References
NF-κB	↓	Inhibition of cell adhesion and cell migration	Breast cancer, prostate cancer	36, 40, Figure 1
AP-1	↓			
uPA	↓	G1 cell cycle arrest	Breast cancer	37
uPAR	↓			
p21/Waf-1	↑	Induction of apoptosis	Hepatoma	38
Cyclin D1	↓			
Bax	↑	G2 cell cycle arrest	Hepatoma	38
PKC	↓			
JNK	↑	Prevention of apoptosis	Pheochromocytoma	39
p38 MAPK	↑			
Erk1	↑			
Erk2	↑			
CREB	↑			

NF-κB = nuclear factor κB; AP-1 = activator protein-1; uPA = urokinase plasminogen activator; uPAR = uPA receptor; PKC = protein kinase C; JNK = c-Jun N-terminal kinase; MAPK = mitogen-activated protein kinase; Erk = ras/extracellular signal-regulated kinase; CREB = camp-response element binding protein.

### Estudos *in vitro* e *in vivo*

Um estudo<sup>20</sup> realizado demonstrou que um extrato etanólico inibiu a proliferação de células do cancro da mama por inibição do ciclo celular na fase G1 através do aumento de p21/Waf-1 e diminuição de ciclina D1. O mesmo extrato induziu a apoptose por aumento da expressão pro-apoptótica de proteicas Bax (*Bcl-2 associated X protein*).

Um extrato rico em triterpenos inibiu o crescimento de células do hepatoma, o mesmo não se verificou em células saudáveis do fígado humano. A inibição neste caso foi causada pela diminuição da proteína cinase C (PKC) e ativação de JNK (*Jun N-terminal Kinase*) e p38 MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*) que resulta na inibição do ciclo na fase G2 do ciclo.<sup>20</sup>

Um outro estudo<sup>23</sup> realizado com um extrato de GI para caracterizar o seu efeito no crescimento de metástases do cancro da mama para o pulmão permitiu concluir que a administração oral de GI inibe as metástases através da supressão da expressão de genes responsáveis pelas células invasivas.

As células humanas do cancro da mama (MDA-MB-231) foram implantadas em ratinhos. O extrato (100 mg/kg/dia) foi administrado oralmente durante 4 meses. O tratamento com o extrato demonstrou ter um efeito inibitório no peso e tamanho do tumor. Um estudo<sup>23</sup> anterior evidenciou que o extrato contém triterpenos e polissacáridos que suprimem as células invasivas do cancro da mama. *In vivo*, foi demonstrada a inibição de metástases no fígado e no pulmão por frações triterpénicas e isolados de ácido ganodérico.<sup>23</sup>

Os genes envolvidos no processo tumoral invasivo e o efeito do extrato foram analisados. O HRAS (*v-Ha-Ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*) é um oncogene expresso no cancro agressivo da mama responsável pela migração celular, e verificou-se estar silenciado. O S100A4 (*S100 calcium binding protein A4*) é uma proteína presente em cancros metastáticos e controla a migração celular, o seu gene foi silenciado. Também a expressão génica da proteína SET e da fibronectina I foi silenciada.

A migração celular é um processo complexo e é controlado por mais do que uma proteína, neste estudo analisaram-se as proteínas não expressas por silenciamento dos seus genes. Concluiu-se que o extrato inibe a expressão de diferentes proteínas pro-invasivas. No entanto, são necessários ensaios clínicos uma vez que esta pode ser uma terapia natural ou alternativa para o cancro da mama invasivo.<sup>23</sup>

Foi determinado o potencial dos polissacáridos de GI na supressão de linfócitos em doentes com cancro do pulmão. Em variados tumores, incluindo o do pulmão, um dos mecanismos diretos para suprimir o sistema imune é a libertação de mediadores imunossupressores como TGF- $\beta$ , interleucina 10 (IL-10) e VEGF. Prova disso, foi o aumento destes mediadores no plasma dos doentes neste estudo.<sup>24</sup> A expressão da proteína CD69 diminuiu nos linfócitos destes doentes. Verificou-se que a proliferação de linfócitos induzida por PHA (fitohemaglutinina) foi suprimida no plasma de doentes com cancro do pulmão. A supressão foi antagonizada por polissacáridos de GI.<sup>24</sup> A perforina e a granzima B são secretadas por linfócitos citotóxicos quando há indução de apoptose celular de células tumorais; estas proteínas foram também suprimidas e este efeito foi antagonizado por polissacáridos de GI.<sup>25</sup>

A imunossupressão provocada pelo tumor está associada à libertação de moléculas supressoras, tal como referido. No entanto, o antagonismo da imunossupressão por GI ainda não foi completamente definido e esclarecido, podendo fazer-se por diferentes vias que promovem a degradação de moléculas imunossupressoras, a inibição de recetores e vias de sinalização.<sup>24</sup>

### Ensaio clínico

Avaliou-se o efeito de polissacáridos de GI na resposta imunomoduladora de doentes com cancro coloretal avançado. O tratamento com 5,4 mg/dia de GI durante 12 meses foi realizado em 47 pessoas. Verificou-se um aumento da atividade de células NK, interleucinas (IL-2, IL-6), interferão  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) mas diminuiu fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e IL-1. Pensa-se que estas variáveis no sistema imune se devem ao reduzido tamanho da amostra e variabilidade interpessoal. Os resultados indicam que GI tem um potencial efeito

imunomodulador em doentes com cancro coloretal avançado. No entanto, devem ser realizados mais estudos para explorar os benefícios e a segurança em doentes oncológicos.<sup>25</sup>

O extrato aquoso de micélio de GI demonstrou ter um potencial efeito preventivo contra o desenvolvimento de tumor coloretal em estudos animais. Com o intuito de verificar este efeito preventivo em humanos foi realizado um estudo,<sup>26</sup> com um grupo de pessoas com adenocarcinoma, com mais de 40 anos submetidos a 1.5 g/dia durante 12 meses. Dos 123 doentes apenas 96 completaram o estudo. O tratamento com o extrato foi descontinuado em 6 casos por efeitos adversos (diarreia, desconforto gastrointestinal e dor de cabeça). Foram selecionadas 102 pessoas para o grupo controlo. Verificou-se que o número e o tamanho dos adenomas diminuí no grupo tratado com extrato e aumentou no grupo controlo, estes resultados sugerem que o extrato inibe o desenvolvimento de adenomas coloretais através de um potencial efeito imunomodulador de GI. O mecanismo envolve a ativação de células NK e aumento de citocinas (como IL-2, IFN- $\gamma$ ).<sup>26</sup>

### 2.3. GRIFOLA FRONDOSA

*Grifola frondosa* (Gf) também denominado de Maitake e “cogumelo dançante”, é um fungo basidiomiceto pertence à Família Meripilaceae da Ordem Polyporales.

A sua coloração é cinza acastanhado e apresenta basidiocarpos ramificados de grandes dimensões podendo atingir 20 kg. Cresce na base e troncos de árvores coníferas e caducifólias, em espécies como *Quercus*, *Betula*, *Castanea* e *Fagus* na Ásia, Europa e também América do Norte. É um cogumelo muito apreciado principalmente nos países Asiáticos pelas propriedades medicinais e pelo seu uso na alimentação.<sup>27</sup>

#### Constituintes ativos

Gf é uma fonte de polissacarídeos com um enorme potencial na promoção da saúde. Os  $\beta$ -glucanos presentes neste cogumelo são responsáveis pelas propriedades medicinais que lhe estão associadas; nomeadamente fração-D, um extrato de  $\beta$ -glucanos, e mais recentemente a fração-MD mais bioativa e com menos impurezas. A fração-D tem uma estrutura complexa e única, é constituída por proteínas e uma cadeia principal de  $\beta$ -(1,6)-glucano com ramificações de  $\beta$ -(1,3)-glucano.<sup>27,28</sup> Estas frações são extraídas do micélio e corpo de frutificação.<sup>29</sup>

É também uma fonte de vitaminas do complexo B, ergosterol (provitamina D2), magnésio, potássio, cálcio, ácidos gordos insaturados, fosfolípidos e proteínas. Contêm também substâncias análogos da vitamina C com glicosídeos associados (5-O- $\alpha$ -D-

glucopiranosil-ácido eritroascórbico); é rico em fibras e pobre em calorias e gordura pelo que, pode ter potencial na perda de peso.<sup>28,30</sup>

### **Principais atividades biológicas**

Gf é um cogumelo associado a várias propriedades medicinais, nomeadamente anticancerígena, imunoestimulante, anti-inflamatória, anti-hipertensora, antiviral, antidiabética, antimicrobiana e neuroprotetora.<sup>31</sup>

### **Atividade imunomodeladora e antitumoral**

Gf em particular, a fração D e MD possuem atividade antitumoral por estimulação do sistema imune. Os polissacáridos são geralmente imunoestimulantes por ativação de macrófagos.<sup>27</sup> Das investigações realizadas com este cogumelo sabe-se que inibe o crescimento tumoral, ajuda na prevenção de metástases e na diminuição dos efeitos secundários da quimioterapia.<sup>28</sup> Numerosos estudos confirmam os benéficos que Gf proporciona ao sistema imune. Além da ativação de macrófagos, ativa também as células NK, células T citotóxicas e aumenta a eficiência do sistema imune ao libertar IL-1, IL-2 e linfocinas. E por isso, tem um efeito protetor aumentado contra infeções e o desenvolvimento de tumores.<sup>28</sup>

### Estudos *in vitro* e *in vivo*

O efeito imunomodelador do Gf e de um dos seus compostos ativos, o ergosterol peroxidase (EPO), presente no extrato do corpo de frutificação, foi avaliado. O estudo *in vitro*,<sup>31</sup> foi realizado numa linha celular humana (THP-1) com citotoxicidade induzida por um lipopolissacárido (LPS). LPS é um componente das bactérias Gram negativas reconhecido por monócitos e macrófagos. MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) é uma molécula que ativa TLR-4 e tem um papel importante nas cascatas de sinalização incluindo o NF-kB. O NF-kB é um fator de transcrição que regula a expressão genética associada a processos biológicos como a resposta imune, reações inflamatórias e apoptose. Quando há um estímulo inflamatório por LPS, o NF-kB é ativado e translocado para o núcleo, onde são regulados os genes de citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ), moléculas de adesão celular, iNOS (*Inducible nitric oxide synthase*) e Cox-2.

Com este estudo<sup>31</sup>, verificou-se que o EPO inibe a citotoxicidade induzida por LPS ao inibir significativamente a produção de mediadores pro-inflamatórios como a IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ . O EPO demonstrou ter um forte efeito inibitório na MyD88 e na expressão de VCAM-1 (*vascular cell adhesion protein 1*), verificou-se também a supressão da ativação de

NF- $\kappa$ B, há um bloqueio da sua translocação para o núcleo. O EPO possui atividade inflamatória ao inibir o efeito de produção de citocinas.

Foi o primeiro estudo em que se associou a atividade imunomoduladora ao EPO do Gf, sendo que, o mecanismo de ação passa pela inibição de produção de mediadores pró-inflamatórios por supressão da via de sinalização do NF- $\kappa$ B.<sup>31</sup>

Recentemente foi identificado um polissacárido de Gf, o GPII (*water-soluble polysaccharide*) e caracterizada a sua atividade antitumoral e imunomoduladora em ratinhos inoculados com células tumorais Heps e numa linha celular de macrófagos (RAW264.7). GPII é um polissacárido purificado composto por manose, glucose e galatose com um peso molecular de  $6.9 \times 10^3$  Da. *In vivo* foi avaliada a atividade antitumoral de GPII. Os tumores, o timo e o baço foram recolhidos e pesados. A tabela seguinte sumariza os resultados obtidos.

**Tabela III - Resultados obtidos no estudo.**

Groups	Dose	Weight of tumor (g)	Inhibitory rate of tumor (%)	Spleens (mg/g)	Thymus (mg/g)
Normal control	Saline	-	-	4.74 ± 0.26	3.68 ± 0.50
GPII normal	216 mg/kg	-	-	4.66 ± 1.40	3.65 ± 0.46
Negative control	Saline	1.46 ± 0.26	-	4.99 ± 1.09	3.53 ± 0.39
Positive control	25 mg/kg	0.46 ± 0.27 <sup>aa</sup>	68.49	3.27 ± 1.01 <sup>aa,cc</sup>	2.80 ± 0.38 <sup>aa,cc</sup>
GPII	216 mg/kg	0.71 ± 0.48 <sup>aa,b</sup>	51.37	5.16 ± 1.03 <sup>bb</sup>	4.13 ± 0.79 <sup>bb</sup>
	108 mg/kg	0.64 ± 0.16 <sup>aa</sup>	56.16	5.56 ± 1.64 <sup>bb</sup>	4.55 ± 0.96 <sup>aa,bb,cc</sup>
	54 mg/kg	1.17 ± 0.15 <sup>a,bb</sup>	19.86	4.82 ± 0.90 <sup>bb</sup>	3.55 ± 0.12 <sup>bb</sup>
	27 mg/kg	1.23 ± 0.08 <sup>bb</sup>	15.75	4.81 ± 0.77 <sup>bb</sup>	4.49 ± 0.33 <sup>bb</sup>

Each value is presented as mean ± SD of 10 separate experiments. p Values are shown as <sup>a</sup> p < 0.05, <sup>aa</sup> p < 0.01 compared with negative control group; <sup>b</sup> p < 0.05, <sup>bb</sup> p < 0.01 compared with positive control group; <sup>c</sup> p < 0.05, <sup>cc</sup> p < 0.01 compared with normal control group. - mean have no tumor or the inhibitory rate is 0. Note: The tumor weight of negative control group greater than 1 g, indicating the mouse tumor model was successfully established.

O crescimento tumoral foi inibido com o aumento de dose de GPII. Foi também investigada a secreção de citocinas induzidas por GPII em células Heps, verificou-se um aumento de TNF- $\alpha$ , IL-2, o que sugere a capacidade de GPII para potenciar o sistema imune.<sup>32</sup>

GPII tem atividade antitumoral indireta *in vitro* em células HepG-2 mas apresenta uma inibição do crescimento tumoral significativa *in vivo* em células Heps. A ativação de macrófagos levou à libertação de citocinas e outras substâncias, como TNF- $\alpha$ , NO e IL-1 $\beta$ , moléculas que induzem a atividade antitumoral de macrófagos. A análise desta atividade demonstrou estar elevada em RAW264.7 com o aumento de GPII. O aumento significativo de atividade fagocítica como a libertação de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e NO deve-se ao aumento da expressão génica e proteica em RAW264.7. Vários recetores TRL (*Toll-like receptors*) como o TLR-4, TLR-2 e dectina-1 foram identificados em estudos anteriores com polissacáridos de fungos. Neste estudo verificou-se que GPII medeia a ativação de macrófagos, a atividade fagocítica, e a libertação de NO, TNF- $\alpha$  pela via de sinalização do TLR-4.<sup>32</sup>

*In vitro* tem um efeito citotóxico indireto contra as células HepG-2 e *in vivo* inibe significativamente o crescimento das células Heps. Este estudo permitiu concluir que a atividade tumoral do GPII se deve à estimulação das funções do sistema imune.<sup>32</sup>

A avaliação do potencial de inibição de metástases por Gf fez-se por injeção de células do carcinoma hepático em ratinhos<sup>28</sup>; foram divididos em 3 grupos, 1 grupo controlo alimentado com ração, 1 um grupo em que 20% da sua ração continha Gf e um outro que recebeu fração-D por injeção intraperitoneal. Ao fim de 30 dias foram observadas as metástases no fígado, 100% no grupo controlo, 81,3% no grupo com 20% de Gf e o 3º com fração-D em que a inibição de metástases foi de 91,3% (Figura II).

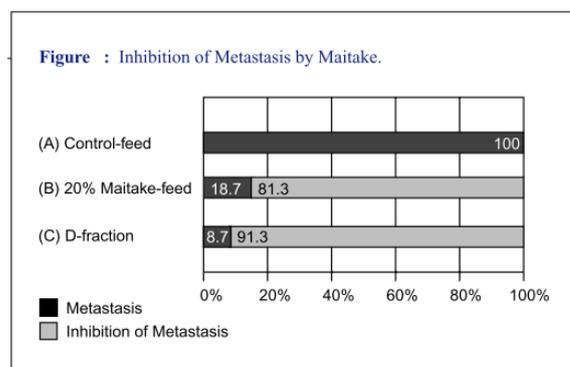
Também neste estudo, a administração intraperitoneal de fração-D foi a que apresentou maior poder de inibição de metástases.<sup>28</sup>

Embora os estudos pré-clínicos demonstrem a bioatividade dos extratos de Gf, não há evidências clínicas rigorosamente concebidas. É necessário definir previamente doses orais apropriadas. Foi realizado um estudo com várias doses e a partir das quais se fez uma curva dose-resposta para cada parâmetro imunológico. Este estudo de fase I/II permitiu verificar o efeito imunológico de um extrato de Gf em mulheres em pós-menopausa com cancro da mama, a tolerabilidade e segurança do mesmo.<sup>33</sup>

O extrato constituído por polissacáridos foi obtido do corpo de frutificação. Durante 3 meses, 34 mulheres foram expostas a doses orais de 0,1, 10,5, 1,5, 3 e 5 mg/kg duas vezes por dia durante 3 semanas. Amostras de sangue periférico foram recolhidas nos dias 7, 14 e 21 e analisadas *ex vivo*. Não foi estabelecida uma dose tóxica limite, duas doentes não concluíram o estudo por efeitos adversos, náuseas e inchaço nas articulações (dose diária-1 mg/kg) e uma por *rush* e prurido (dose diária-10 mg/kg). Não foi estabelecida uma dose máxima, a dose ideal variou consoante os parâmetros imunológicos. Por exemplo, a produção de IL-10, IL-2 e TNF- $\alpha$  têm uma dose ótima de 5-7 mg/kg, no entanto, o TNF- $\gamma$  tem 10 mg/kg.<sup>33</sup>

A concentração até 10 mg/kg/dia foi bem tolerada e não foi observada citotoxicidade. Não é claro, o efeito em simultâneo da produção de citocinas estimuladoras (IL-2) e

**Figura II** – Inibição de metástases por *Grifola frondosa*.



supressoras (IL-10) do sistema imune. Não se pode concluir que a administração oral de extrato de Gf potencia o sistema imune mas que tem uma atividade imunomoduladora.<sup>33</sup>

## 2.4. INONOTUS OBLIQUUS

*Inonotus obliquus* (Io) é um fungo basidiomiceto e pertence à família Hymenochaetaceae. É também denominado por Chaga e *Fuscoporia oblique* na Rússia. Apresenta uma morfologia bastante característica, superfície irregular e fissuras profundas, a sua estrutura pode atingir 5-40 cm de diâmetro e com aparência de carvão queimado que se deve à produção de grandes quantidades de melanina. É um fungo parasita que cresce e vive em troncos de árvores do género *Betula*, *Grebillea* e *Ulmus*. O seu habitat natural caracteriza-se por ser muito frio, com temperaturas até -40°C no Norte da América, Finlândia, Polónia, Rússia, nordeste da China e Japão. Este cogumelo é usado desde o Século XVI pelas suas propriedades medicinais no tratamento do cancro e doenças gastrointestinais na Rússia e na Europa Oriental. Contrariamente aos cogumelos até aqui referidos, não é considerado um cogumelo comestível por ser de crescimento lento, custo elevado e de cultivo difícil.<sup>34,35</sup>

### Constituintes Ativos

Io é constituído por polissacáridos ( $\beta$ -glucanos), ácido betulínico, compostos fenólicos, triterpenóides (inotodiol, lanosterol), esteróis, ácidos trametenólicos, ergosterol, ergosterol peroxidase e superoxidase. Além disso, é uma fonte de aminoácidos, cálcio, cobre, ferro, manganês, magnésio, ácido pantoténico, selénio, sódio, fósforo, potássio, vitaminas do complexo B e zinco.<sup>35</sup>

### Principais atividades biológicas

Estudos demonstram que este cogumelo exibe atividades biológicas como: antitumoral, antioxidante, antiviral, antifúngica, anti-inflamatória, hipoglicémica, e imunomoduladora.<sup>6,35</sup>

### Atividade antitumoral e imunomoduladora

A proliferação e morte celular estão envolvidos na manutenção da homeostase. A atividade antitumoral dos compostos deve-se à alteração de mecanismos normais na célula, como a inibição da proliferação, interrupção do ciclo celular em vários pontos, aumento da apoptose e alteração da expressão de enzimas que regulam as vias de transdução de sinal.<sup>35</sup>

A inibição do ciclo celular e indução de apoptose é um dos maiores mecanismos na prevenção da proliferação de células cancerígenas. O ciclo celular está dividido em 4 fases G1,S,G2 e fase M. As cinases ou cinases dependes da ciclina (CDKs), os inibidores de CDK

(CDKIs) e as ciclinas são fundamentais no controlo do ciclo celular. Nas células eucariotas, cada fase do ciclo é controlado por diferentes CDKs que são ativados ou inibidos por diferentes ciclinas. A fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> é regulada por CDK4 e CDK6 associada à ciclina D, a transição de G<sub>1</sub> para S por CDK2 e ciclina E, a fase S por CDK2 e ciclina A e a fase G<sub>2</sub>/M por CDK1 e ciclina A ou B. Sabe-se que a hiperativação de CDK e ciclinas é comum em células tumorais e responsável pela proliferação incontrolada. A proteína p21 é um potente inibidor de CDK que se liga ao complexo ciclina-CDK2 e inibe a progressão do ciclo na fase G<sub>1</sub> e S. A sua expressão está altamente controlado por uma proteína supressora, a p53. p27 é também um CDKI que se liga à ciclina E-CDK2 ou ciclinaD-CDK4 e controla a fase G<sub>1</sub>.<sup>36</sup>

Um estudo<sup>36</sup> *in vitro* investigou o efeito de um extrato etanólico de *Io* (EEIO) e o seu mecanismo de ação na progressão do ciclo celular na fase G<sub>1</sub>, de células do cancro do colon humano (HT-29). Foi preparado o EEIO e 3 frações a partir do mesmo. O EEIO diminuiu a viabilidade celular dependendo da dose. O crescimento foi inibido e a síntese celular diminuiu significativamente com 10 µg/ml de extrato.

Para determinar se EEIO tem efeito na progressão do ciclo celular as células HT-29 foram tratadas com e sem 10 µg/ml de extrato durante 2 dias observando-se um aumento na % celular em G<sub>1</sub> e a correspondente redução em S e na fase G<sub>2</sub>/M, o que leva a concluir que a inibição de G<sub>1</sub> se deve ao EEIO. Posteriormente fez-se o mesmo para cada fração, sendo a fração 2 a que apresentou mais atividade. Para verificar a síntese de DNA utilizou-se BrdU (5-bromo-2deoxiuridina). O BrdU estava em menor quantidade na fração 2. Assim, esta fração foi a mais ativa e na qual a viabilidade celular foi menor. O estudo permitiu também observar o efeito do EEIO nas proteínas que controlam a transição de G<sub>1</sub>/S. Observou-se que o nível de CDK2 e CDK4 diminuíram e a expressão proteica de p21, p27 e p53 aumentaram depois do tratamento com o extrato. A fosforilação de proteínas Rb na fase G<sub>1</sub> diminuiu. Os resultados sugerem que o EEIO induz a inibição do ciclo celular na fase G<sub>1</sub> por aumento de p21, p27 e expressão de p53, e consequente inibição de CDK2, CDK4, ciclina D1 e Rb. Neste estudo, não foram analisados os compostos responsáveis por esta atividade. Contudo, estudos anteriores identificaram triterpenos do tipo lanostano, inotidiol, ergosterol, ergosterol peroxidase com efeito antitumoral em extratos aquosos, orgânicos e etanólicos de *Io*.<sup>36</sup>

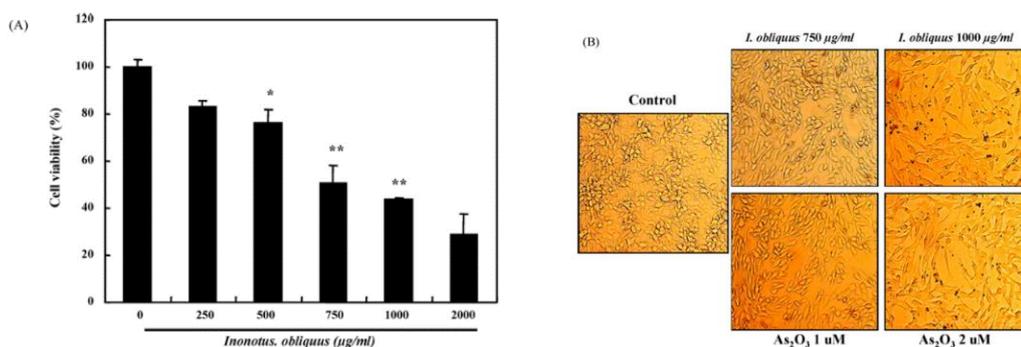
Um outro estudo, *in vitro* e *in vivo*<sup>37</sup> usou uma linha celular do melanoma (BI6-F10) para avaliar o efeito antitumoral de um extrato aquoso de *Io*.

*In vitro*, as células foram expostas a diferentes concentrações de extrato durante 48h para verificar a viabilidade celular, tal como se pode observar na Figura III, a proliferação

diminui 51% com 750  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de extrato; o lo inibiu a proliferação celular. A diferenciação foi analisada usando 2 concentrações de extrato e um controlo positivo (trióxido arsénico), tendo-se observado protuberâncias (Figura III) nas células B16-F10 tratados com o extrato, o que permitiu concluir que o mesmo induziu a diferenciação celular. O gene supressor tumoral p53 tem um papel ativo no ciclo celular e na indução de apoptose. O pRb e p27 têm um papel inibitório na transição da fase G1 para S.

O efeito do extrato nestes modeladores do ciclo celular foi também avaliado, contrariamente a estudos anteriores, a sua concentração diminuiu com o aumento de dose de extrato. Analisou-se o efeito na progressão do ciclo e verificou-se um retardamento da transição de G0/G1 e posterior diminuição da % celular em fase S. A indução da apoptose deve-se a ativação da caspase-3, uma vez que a sua concentração aumentou com a dose de extrato.

**Figura III** – Efeito do extrato de lo no crescimento e diferenciação celular do melanoma B16-F10. **(A)**: Viabilidade celular em função de diferentes doses de lo **(B)**: Alterações morfológicas nas células B16-F10 expostas ao extrato de lo e  $\text{As}_2\text{O}_3$ .



*In vivo*, a determinação da inibição do crescimento do tumor em camundongos Balb/c por lo fez-se através da implantação intraperitoneal de células B16-F10. Avaliou-se o retardamento do crescimento do tumor. Nos camundongos tratados com o extrato não houve aumento de peso significativo pelo que se considera que o aumento de peso nos ratos não tratados se deva ao aumento da massa tumoral. Verificou-se também que a administração intraperitoneal (20 mg/kg/dia) foi mais efetiva do que a administração oral (200 mg/kg/dia).

Conclui-se deste estudo que, o extrato inibe *in vitro* e *in vivo*, o crescimento de células tumorais do melanoma B16-F10 ao induzir a inibição do ciclo celular e apoptose. Não se verificou envolvimento do sistema imune na atividade antitumoral. No entanto, o mecanismo de ação não ficou totalmente esclarecido. Além disso, ainda não são claros os componentes

do cogumelo e da célula tumoral que participam neste processo por isso mais investigações são necessárias.<sup>37</sup>

Outros estudos com Io em linhas celulares demonstram que a indução da apoptose é um dos mecanismos que lhe confere atividade antitumoral.<sup>35</sup>

As células HT-29 foram tratadas com 0.25, 0.5 e 1.0 mg/mL de extrato aquoso de Io durante 48h. Observou-se que a concentração de 1.0 mg/ml teve um efeito inibitório de 56% na proliferação celular acompanhado da diminuição de Bcl-2 e aumento de Bax e caspase-3. O Bcl-2 forma canais iônicos nas membranas celulares que influenciam a permeabilidade de membranas intracelulares fazendo com que o conteúdo mitocondrial vá para o citoplasma e potencialmente induza a ativação de caspase que leva a indução de apoptose. No entanto, a expressão aumentada de Bcl-2 tem um papel protetor na apoptose das células ao manter a integridade da membrana e prevenir a libertação do conteúdo mitocondrial. Bax é um fator pro-apoptótico que se desloca do citoplasma para a membrana mitocondrial externa onde forma heterodímeros com Bcl-2 e cria poros para a libertação do citocromo-C. A sub-expressão de Bcl-2 por indução do extrato de Io e a indução de Bax e caspase-3 foram os responsáveis pelo processo apoptótico das células HT-29.<sup>38</sup>

## 2.5. *HERICIUM ERINACEUS*

*Hericum erinaceus* (He) é um cogumelo com propriedades medicinais também conhecido de “Juba de Leão” pelo seu aspeto bastante característico; no Japão é chamado de “yamabushitake” e na China de “Houtou”. É um cogumelo comestível muito usado nos países Asiáticos na alimentação e com uma longa história na MTC. Faz parte do filo Basidiomycota e da classe Agaricomycetes.<sup>39,40</sup>

He é um cogumelo bastante promissor no alívio, prevenção e tratamento de diversas patologias nomeadamente cancro, depressão, diabetes, dislipidemia, e doenças neurodegenerativas.<sup>41</sup>

### Constituintes ativos

Os micélios e corpos de frutificação de He são ricos em compostos com enorme potencial medicinal. Os polissacarídeos nomeadamente os  $\beta$ -glucanos são responsáveis pela atividade antitumoral e imunomoduladora associada a este cogumelo.<sup>39</sup>

Além dos polissacarídeos foram isolados e identificados metabolitos secundários tais como: erinacinas, hericerinas, hericenonas, resorcinóis, esteróides (ergosterol), mono- e diterpenos e compostos voláteis.<sup>41</sup>

### Principais atividades biológicas

Os constituintes do He encontrados no micélio e corpo de frutificação são responsáveis pelas suas propriedades benéficas para a saúde nomeadamente propriedades anticancerígenas, imunomoduladoras, hipolipidémicas, antioxidantes e neuroprotetoras. Além disso foram também reportadas propriedades antimicrobianas, anti-hipertensoras e antidiabéticas.<sup>39</sup>

### **Atividade antitumoral e imunomoduladora**

A inibição da proliferação celular e a indução da morte celular ocorre por vários mecanismos, tais como, a interação com proteínas essenciais envolvidas na carcinogénese, a supressão de vias de sinalização, inibição da angiogénese e de metástases, e ainda por estimulação do sistema imune. Sendo que, a imunomodulação é o maior mecanismo antitumoral de He.<sup>39,41</sup>

#### Estudos *in vitro* e *in vivo*

Foi fracionado um extrato polissacárido de He do corpo de frutificação e avaliada a sua capacidade imunomoduladora, Uma das frações isoladas de He foi a mais favorável na libertação de óxido nítrico (NO) e produção de citocinas (IL-1 e TNF- $\beta$ ) por macrófagos, que têm um papel importante na resposta imune e são responsáveis por propriedades anticancerígenas.<sup>42</sup>

Um estudo<sup>43</sup> realizado em células HepG2 demonstrou que He tem potencial para induzir a apoptose mediada por doxorubicina ao reduzir a expressão de c-FLIP pela via JNK e pela acumulação intracelular de doxorubicina por inibição da atividade de NF-kB. A combinação de He com o fármaco sugere que são efetivos e têm um efeito sinérgico no tratamento do carcinoma humano hepatocelular.<sup>43</sup>

A capacidade dos extratos de He induzirem a apoptose numa linha celular humana de leucemia monócítica (U937) foi avaliada. Os resultados sugerem que o extrato aquoso e o extrato aquoso/etanólico induzem o mecanismo de apoptose através da produção de NO por macrófagos, suprimindo fortemente a proliferação das células U937, o mesmo não se verificou em células saudáveis. Embora não esteja esclarecido o motivo desta seletividade, pensa-se que possa estar associada à produção de NO, uma vez que as células cancerígenas tem níveis baixos de enzimas antioxidantes. A indução da apoptose ocorreu por ativação da via intrínseca mitocondrial mediada pela caspase 3 e 9 mas não pela caspase 8. Na via intrínseca há libertação de fatores pro-apoptóticos, tal como se verificou neste estudo, como o aumento dos níveis de proteínas pro-apoptóticas (Bax, Bad e Bid). Os resultados

sugerem que o cogumelo poderá ter um grande potencial no tratamento da leucemia humana.<sup>44</sup>

O efeito antitumoral em extratos de He em camundongos Balb/c transplantados com células do cancro do colon (CT-26) foi investigado. A injeção diária durante duas semanas reduziu significativamente o tamanho do tumor. A regressão do tumor foi associada ao aumento da atividade das células NK e aos fatores de necrose tumoral (TNF). Os fatores pro-angiogénicos como o VEGF, COX-2 e 5-LOX (5-Lipoxigenase) diminuíram significativamente. Este estudo permitiu concluir que a redução do tamanho do tumor se deve à indução da atividade de células NK, ativação de macrófagos e inibição da angiogénese.<sup>45</sup>

Os estudos realizados em linhas celulares e em roedores demonstram o seu potencial terapêutico e as suas propriedades benéficas para a saúde. No entanto, é fundamental realizar ensaios clínicos que comprovem o seu potencial e garantam a sua eficácia e segurança em humanos.<sup>39,41</sup>

### **3. INTERAÇÕES ENTRE COGUMELOS MEDICINAIS E MEDICAMENTOS**

A população recorre aos cogumelos medicinais pelas suas propriedades benéficas, nomeadamente anti-hipertensoras, hipoglicemiantes, antiateroscleróticas. Ou seja, para o tratamento de patologias para as quais na maioria dos casos, há uma terapêutica prescrita pelo médico, fazem-no sem o conhecimento prévio do mesmo podendo levar a situações de hipoglicémia grave, e hipotensão por exemplo. Não se trata propriamente de uma interação entre cogumelos e medicamentos mas de um efeito sinérgico, que pode levar a situações indesejadas inconscientemente.<sup>6</sup>

Por exemplo, não estão descritos casos de interações do Cv com medicamentos. No entanto, devido ao seu efeito imunoestimulante não deve ser coadministrado com medicamentos imunossupressores porque pode neutralizar o efeito dos mesmos.<sup>11</sup> Não é apropriado em pessoas com doenças autoimunes ou a receber transplantes de medula.<sup>12</sup>

Há uma preocupação crescente com as interações que possam ocorrer entre os cogumelos medicinais e os medicamentos. Apesar de algumas estarem descritas na literatura não foram comprovadas, sendo necessária a realização de mais estudos nesta área.<sup>6</sup>

### **4. TOXICIDADE ASSOCIADA AOS COGUMELOS MEDICINAIS**

A diversidade de cogumelos existente é enorme, são vários os que são conhecidos pelas suas propriedades medicinais e nutricionais. No entanto, algumas espécies podem

tornar-se perigosas porque causam toxicidade. Esta toxicidade pode ser devido à presença de toxinas que estão presentes também em espécies de cogumelos nos quais são reconhecidas propriedades benéficas.<sup>46</sup>

Os cogumelos medicinais são usados na alimentação em várias partes do Mundo, e considerados seguros mesmo quando consumidos em quantidades significativas. No entanto, é fundamental conhecer a origem dos cogumelos, condições de produção, armazenamento, uma vez que podem conter metais pesados ou outros contaminantes.<sup>6</sup>

O GI, comumente utilizada na prevenção e tratamento de várias patologias pode causar hepatotoxicidade. Em 2003, foi reportado 1 caso, de uma senhora chinesa, 78 anos com hepatotoxicidade após o consumo prolongado de GI. A hepatotoxicidade ocorreu 4 semanas após a alteração da formulação de GI. Formulações diferentes podem conter compostos diferentes, alguns com potencial hepatotóxico. Pensa-se que neste caso a toxicidade hepática tenha sido induzida por constituintes presentes na formulação em pó. Além disso, a alteração da dose associada à alteração da formulação, não pode ser excluída.<sup>47</sup> Em 2005, foi reportado outro caso de hepatite fulminante fatal, num homem, 47 anos, uma vez mais após a alteração de formulação de GI.<sup>48</sup> Foi também reportado um caso de diarreia crónica num homem com linfoma não Hodgking depois do consumo prolongado de extrato de GI.<sup>49</sup>

O conhecimento e as investigações realizadas até aqui são ainda escassas em comparação com a diversidade de cogumelos existentes, sejam eles, medicinais, para consumo humano ou para outros fins. A caracterização do perfil toxicológico das espécies de cogumelos é essencial para que a segurança da sua utilização no Homem não fique comprometida. Assim, é fundamental que a população seja devidamente informada e use produtos comercializados com qualidade, eficácia e segurança comprovada.<sup>46</sup>

## 5. MYCOLOGY RESEARCH LABORATORIES

A título de exemplo, a Mycology Research Laboratories (MRL) produz biomassa fúngica patenteada nos EUA. A gama de produtos de nutrição com cogumelos, nomeadamente *Coriolus versicolor*, *Ganoderm lucidum*, *Grifola frondosa*, *Hericium erinaceus*, *Innonotus obliquus* estão disponíveis em comprimidos e em pó. Apresentam-se na forma de biomassa cultivada num substrato estéril, em conformidade com normas rigorosas, tal como na produção de medicamentos, respeitando as “Good Manufacturing Pratices” (GMP). A biomassa contém o micélio e os primórdios (corpos do fruto jovem) do cogumelo, e está isenta de pesticidas, metais pesados ou outros fungos. O controlo de qualidade destes produtos passa pela análise de metais pesados e testes microbiológicos (bactérias aeróbias, leveduras, e outros fungos, *Escherichia coli*, coliformes e enterobactérias).<sup>50</sup>

Os produtos com cogumelos MRL são comercializados em Portugal pela EWH, Produtos Naturais, Lda (East West Herbs) com o nome comercial Gama Plus e estão também disponíveis através de uma loja *online*.<sup>51</sup>

A ANEID, Produtos Farmacêuticos, Lda em parceria com a MRL desenvolveu vários ensaios clínicos, alguns em Portugal, com os produtos da gama MRL. Nas farmácias em Portugal, a ANEID comercializa produtos com *Coriolus* MRL (90 comprimidos de 500 mg /biomassa de *Coriolus versicolor* e 250 gr pó/biomassa de *Coriolus versicolor*).<sup>52</sup>

## 6. CONCLUSÃO

Os cogumelos medicinais integram compostos benéficos para a saúde e podem ajudar na prevenção e tratamento de várias doenças, tendo-lhe sido reconhecidas várias atividades como a atividade antitumoral, imunomoduladora, cardioprotetora, hepatoprotetora e neuroprotetora.

Embora o conhecimento dos benefícios dos cogumelos já seja secular e já se tenham realizado vários estudos *in vitro* e *in vivo* que demonstrem a sua atividade, o seu mecanismo de ação, as doses, vias de administração e toxicidade, são muitas vezes limitados e pouco claros. A atividade antitumoral e imunomoduladora são as atividades mais exploradas até ao momento.

Dos cogumelos referidos ao longo do trabalho monográfico, o *Coriolus versicolor* é um dos cogumelos que apresenta um número maior de estudos desenvolvidos, incluindo vários ensaios clínicos. Contrariamente, no *Hericium erinaceus* a investigação é ainda escassa. Assim, ainda há muito trabalho por concretizar, sendo necessária mais investigação científica, que possa até levar ao desenvolvimento de novos fármacos à base de extratos de cogumelos.

Em Portugal, os produtos disponíveis com cogumelos são comercializados como suplementos alimentares. O recurso a produtos de origem natural, onde se incluem suplementos à base de cogumelos, com capacidade para reforçar o sistema imunológico e para prevenir e tratar doenças, como o cancro, é uma realidade. Assim, compete ao Farmacêutico como profissional de saúde, dotado de conhecimentos e competências, fazer um aconselhamento adequado aos utentes na aquisição e utilização destes produtos, ponderando os benefícios e os riscos para o utente.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. CAÑIGUERAL, Salvador - Las monografías de calidad seguridad y eficacia en el uso racional de los preparados a base de plantas medicinales. **Revista de Fitoterapia** **2006**; **(SI)**. 6:December 2006 (2006) 2–5.
2. CUNHA, A. Proença Da; SILVA, Alda Pereira Da; ROQUE, Odete Rodrigues - **Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia**. 3. ed.
3. **Medicamentos à Base de Plantas** - [Em linha] [Consult. 25 jun. 2016]. Disponível em WWW:<URL:http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MEDICAMENTOS\_USO\_HUMANO/AUTORIZACAO\_DE\_INTRODUCAO\_NO\_MERCADO/MEDICAMENTOS\_A\_BASE\_DE\_PLANTAS>
4. Decreto-Lei n.º 118/2015 - **Diário da República**, I.ª série. 120:2015) 4–9.
5. JO FEENEY, Mary; MILLER, Amy Myrdal; ROUPAS, Peter - Mushrooms-Biologically Distinct and Nutritionally Unique: Exploring a «Third Food Kingdom». **Nutrition today**. 49:6 (2014) 301–307.
6. WILLARD, Terry - **Medicinal Mushrooms**. 4th. ed. [S.l.] : Elsevier, 2013.
7. LINDEQUIST, Ulrike; NIEDERMEYER, Timo H. J.; JU, Wolf-dieter - The Pharmacological Potential of Mushrooms. 2:3 (2005) 285–299.
8. CALLAGHAN, Yvonne C. O. *et al.* - Anti-Inflammatory Effects of Wild Irish Mushroom Extracts in RAW264.7 Mouse Macrophage Cells. 00:0 (2014) 1–6.
9. PATEL, Seema; GOYAL, Arun - Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics : a review. (2012) 1–15.
10. CUI, Jian; CHISTI, Yusuf - Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: Physiological activity, uses, and production. **Biotechnology Advances**. 21:2 (2003) 109–122.
11. CHU, Kevin K. W.; HO, Susan S. S.; CHOW, Albert H. L. - *Coriolus versicolor*: a medicinal mushroom with promising immunotherapeutic values. **Journal of clinical pharmacology**. 42:9 (2002) 976–84.
12. FRITZ, Heidi *et al.* - Polysaccharide K and *Coriolus versicolor* extracts for lung cancer: a systematic review. **Integr Cancer Ther**. 14:3 (2015) 201–211.

13. CHENG, King-Fai; LEUNG, Ping-Chung - General review of polysaccharopeptides ( PSP ) from *C. versicolor* : Pharmacological and clinical studies. **Cancer Therapy**. 6:2008) 117–130.
14. BARROS, Ana B.; FERRA, Jorge; FERNANDES, Tito - **A safety assessment of supplement** [Em linha], atual. 2016. Disponível em WWW:<URL:http://dx.doi.org/10.3402/fnr.v60.29953>
15. TSANG, Kenneth W. *et al.* - Coriolus versicolor polysaccharide peptide slows progression of advanced non-small cell lung cancer. **Respiratory Medicine**. 97:6 (2003) 618–624.
16. BREAKSPEAR, Jean Monro - Estudo pioneiro desenvolvido no Hospital Breakspear com Suplementação com Coriolus versicolor em doentes com Síndrome de Fadiga Crónica(SFC). **Mycology News (Versão Portuguese)**. (2006). 1:2 1–6.
17. COUTO, J. Silva; SALGUEIRO, L.; SILVA, D. Pereira - Evaluation of the Efficacy of Coriolus Versicolor \* Supplementation in HPV Lesions ( LSIL ). **14<sup>o</sup>World Congress of Cervical Pathology and Colposcopy-IFCPC**. (2011).
18. CHERNEV, Prof Todor - Coriolus-MRL supplementation in patients infected with low-risk and high- risk HPV subtypes - Bulgarian experience. **3 rd Congress of Gynecologists and Obstetricians of Macedonia**. (2012). 2002.
19. TORKELSON, Carolyn *et al.* - Phase I Clinical Trial of Trametes versicolor in Women with Breast Cancer. **ISRN oncology**. 2012:(2012) 251632.
20. SLIVA, Daniel - Ganoderma lucidum in cancer research. **Leukemia Research**. 30:7 (2006) 767–768.
21. SHAO, Y. *et al.* - Structure Identification and Anti-Cancer Pharmacological Prediction of Triterpenes from Ganoderma lucidum. **Molecules**. 21:5 (2016).
22. SU, Chun Han *et al.* - Comparative characterization of physicochemical properties and bioactivities of polysaccharides from selected medicinal mushrooms. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 1 (2016) 1–9.
23. LOGANATHAN, Jagadish *et al.* - The mushroom Ganoderma lucidum suppresses breast-to-lung cancer metastasis through the inhibition of pro-invasive genes. **International Journal of Oncology**. 45:6 (2014) 2009–2015.

24. SUN, Li Xin *et al.* - Protection against lung cancer patient plasma-induced lymphocyte suppression by ganoderma lucidum polysaccharides. **Cellular Physiology and Biochemistry**. 33:2 (2014) 289–299.
25. CHEN, Xiao *et al.* - Monitoring of immune responses to a herbal immuno-modulator in patients with advanced colorectal cancer. **International Immunopharmacology**. 6:3 (2006) 499–508.
26. OKA, Shiro *et al.* - A water-soluble extract from culture medium of ganoderma lucidum mycelia suppresses the development of colorectal adenomas. **Hiroshima Journal of Medical Sciences**. ISSN 00182052. 59:1 (2010) 1–6.
27. ILLANA-ESTEBAN, Carlos - El hongo maitake (*Grifola frondosa*) y su potencial terapéutico. **Revista Iberoamericana de Micología**. 25:January (2008) 141–144.
28. MAYELL, M. - Maitake extracts and their therapeutic potential - A review. **Alternative Medicine Review**. ISSN 10895159. 6:1 (2001) 48–60.
29. ULBRICHT, Catherine *et al.* - Maitake mushroom (*Grifola frondosa*): Systematic review by the natural standard research collaboration. **Journal of the Society for Integrative Oncology**. 7:2 (2009) 66–72.
30. OKAMURA, Masato - Distribution of Ascorbic Acid Analogs Associated Glycosides in Mushrooms. **J. Nutr. Sci. Vitaminol**. 40 (1994) 81–94.
31. WU, Shu-Jing *et al.* - Immunomodulatory activities of medicinal mushroom *Grifola frondosa* extract and its bioactive constituent. **The American journal of Chinese medicine**. 41:1 (2013) 131–44.
32. MAO, G. H. *et al.* - Antitumor and immunomodulatory activity of a water-soluble polysaccharide from *Grifola frondosa*. **Carbohydr Polym**. 134:(2015) 406–412.
33. DENG, Gary *et al.* - A phase I/II trial of a polysaccharide extract from *Grifola frondosa* (Maitake mushroom) in breast cancer patients: Immunological effects. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**. 135:9 (2009) 1215–1221.
34. NOMURA, Masaaki *et al.* - Inotodiol, a lanostane triterpenoid, from *Inonotus obliquus* inhibits cell proliferation through caspase-3-dependent apoptosis. **Anticancer Research**. ISSN 02507005. 28:5 A (2008) 2691–2696.
35. SONG, Fu Qiang *et al.* - Progress on understanding the anticancer mechanisms of

medicinal mushroom: *Inonotus obliquus*. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. 14:3 (2013) 1571–1578.

36. LEE, Hyun Sook; KIM, Eun Ji; KIM, Sun Hyo - Ethanol extract of *Innotus obliquus* (chaga mushroom) induces G1 cell cycle arrest in HT-29 human colon cancer cells. **Nutrition Research and Practice**. 9:2 (2015) 111–116.

37. YOUN, Myung Ja *et al.* - Potential anticancer properties of the water extract of *Inontus obliquus* by induction of apoptosis in melanoma B16-F10 cells. **Journal of Ethnopharmacology**. 121:2 (2009) 221–228.

38. LEE, Sung Hak; HWANG, Sun; YUN, Jong Won - Antitumor Activity of Water Extract of a Mushroom, *Inonotus obliquus*, against HT-29 Human Colon Cancer Cells. **Phytotherapy Research**. 23:(2009) 1784–1789.

39. KHAN, Md Asaduzzaman *et al.* - *Heridium erinaceus*: An edible mushroom with medicinal values. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**. 10:1(2013) 1–6.

40. LIU, Jian Hui *et al.* - Anti-*Helicobacter pylori* activity of bioactive components isolated from *Heridium erinaceus*. **Journal of Ethnopharmacology**. 183:2016) 54–58.

41. FRIEDMAN, Mendel - Chemistry, Nutrition, and Health-Promoting Properties of *Heridium erinaceus* (Lion's Mane) Mushroom Fruiting Bodies and Mycelia and Their Bioactive Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 63:32 (2015) 7108–7123.

42. LEE, Jong Seok *et al.* - Study of macrophage activation and structural characteristics of purified polysaccharides from the fruiting body of *Heridium erinaceus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. 19:9 (2009) 951–959.

43. LEE, Jong Seok; HONG, Eock Kee - *Heridium erinaceus* enhances doxorubicin-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. **Cancer Letters**. 297:2 (2010) 144–154.

44. KIM, Sung Phil *et al.* - Mechanism of *Heridium erinaceus* (*Yamabushitake*) mushroom-induced apoptosis of U937 human monocytic leukemia cells. **Food & function**. 2:6 (2011) 348–356.

45. KIM, Sung Phil *et al.* - Composition and mechanism of antitumor effects of *Heridium erinaceus* mushroom extracts in tumor-bearing mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 59:18 (2011) 9861–9869.

46. JO, Woo Sik; HOSSAIN, Md Akil; PARK, Seung Chun - Toxicological profiles of poisonous, edible, and medicinal mushrooms. **Mycobiology**. 42:3 (2014) 215–220.
47. MAN-FUNG YUEN, PHILIP IP, WAI-KUEN NG, Ching-Lung Lai - Hepatotoxicity due to a formulation of *Ganoderma lucidum* (lingzhi). **Journal of Hepatology**. 41:4 (2004) 686–687.
48. WANMUANG, Harirak *et al.* - Fatal fulminant hepatitis associated with *Ganoderma lucidum* (Lingzhi) mushroom powder. **Journal of the Medical Association of Thailand**. 90:1 (2007) 179–181.
49. WANACHIWANAWIN, Darawan *et al.* - *Ganoderma lucidum*: A cause of pseudoparasitosis. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**. 37:6 (2006) 1099–1102.
50. **Mycology Research Laboratories** - [Em linha] [Consult. 28 mai. 2016]. Disponível em WWW:<URL:<http://www.mycologyresearch.com/>>
51. **East West Herbs** - [Em linha] [Consult. 7 jun. 2016]. Disponível em WWW:<URL:<http://ewhonline.com/pt/>>
52. **ANEID, Produtos Farmacêuticos, Lda** - [Em linha] [Consult. 28 mai. 2016]. Disponível em WWW:<URL:<http://www.aneid.pt/>>