

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**EFEITO DE UM EXTRATO DE *GANODERMA LUCIDUM* (REISHI) NA  
MARCAÇÃO DE CONSTITUINTES SANGUÍNEOS COM TECNÉCIO-99M E  
NA SOBREVIVÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI*.**

**RAQUEL TERRA AGOSTINHO**

Natal, RN

2009

**RAQUEL TERRA AGOSTINHO**

**EFEITO DE UM EXTRATO DE *GANODERMA LUCIDUM* (REISHI) NA  
MARCAÇÃO DE CONSTITUINTES SANGUÍNEOS COM TECNÍCIO-99M E  
NA SOBREVIVÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI*.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Norte- UFRN, para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo programa de Pós- graduação em Ciências da Saúde.

**Orientador: PROF. DR. MÁRIO BERNARDO-FILHO**

Natal, RN

2009

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

A275 Agostinho, Raquel Terra.  
Efeito de um extrato de Ganoderma lucidum (Reishi) na  
marcação de constituintes sanguíneos com tecnécio-99M e na  
sobrevivência de Escherichia coli / Raquel Terra Agostinho .-  
2009.  
viii, 22f. : il.

Orientador: Mario Bernardo-Filho.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande  
do NorteJaneiro - UFRN.Pós-Graduação em Ciências da Saúde.  
Bibliografia: f. 21-22.

1. Escherichia coli - Teses. 2.Tecnécio - Teses. 3. Reishi -  
Teses. 4. Cogumelos - Teses. I. Bernardo-Filho, Mario. II.  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN. III. Título.

CDU 576.851.48

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

---

Assinatura

---

Data

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde

Profa. Dra. Técia Maria de Oliveira Maranhão

Natal, RN

2009

**RAQUEL TERRA AGOSTINHO**

**EFEITO DE UM EXTRATO DE GANODERMA LUCIDUM (REISHI) NA  
MARCAÇÃO DE CONSTITUINTES SANGUÍNEOS COM TECNECIO – 99M E  
NA SOBREVIVÊNCIA DE ESCHERICHIA COLI.**

PRESIDENTE DA BANCA: Prof. Dr. Mario Bernardo-Filho (UERJ)

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.

Prof. Dr.

SUPLENTES

Aprovado em / / \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho:

Aos meus pais que conseguiram ensinar-me que o limite entre o possível e o impossível é diretamente proporcional ao nosso nível de conhecimento!

A minha filha Gabriela que ensinou-me a ter paciência e aceitar as minhas limitações e me deu um incrível desejo de crescer como ser humano.

A Deus por estar acima de todas as manifestações.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Mario Bernardo-Filho pela disciplina, profissionalismo e ética, virtudes que foram a cada dia fui tendo a oportunidade de vivenciá-las. Através da observação e persistência tais qualidades contribuíram de forma expressiva para o meu desenvolvimento.

Ao Programa de Pós graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade de fazer parte de um processo que hoje me faz ser uma nova profissional. Com uma visão crítica da saúde e de todas as suas manifestações no indivíduo e no mundo.

Ao “nosso superior” que possui uma partícula dentro de mim e esta me faz sentir sempre que toda dificuldade é um novo desafio para um novo e eterno crescimento, obrigada meu Deus pela força que a cada dia me faz superar todos os obstáculos acreditando sempre que existe uma missão superior a tudo!

Aos amigos do Laboratório de Radiofarmácia Experimental do Departamento de Biofísica e Biometria e no Departamento de Histologia do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro por estarem sempre solícitos e pacientes diante de todas as minhas dificuldades. E em especial ao Sebastião David dos Santos Filho, que com muita paciência e sabedoria soube conduzir-me mostrando cada limite e erro, dando subsídios para que pudessem a cada dia superá-los.

À família pela persistência ao educar-me, dia a dia construindo um discernimento que me fez ter metas e objetivos. Cada “colo” me deu segurança, cada “empurrão” fez eu acreditar em mim, cada sorriso construiu a

minha auto estima e cada ato de solidariedade que acompanhei toda a minha vida em casa faz hoje eu ter amor ao próximo.

## SUMÁRIO

Sumário.....	viii
Lista de abreviações siglas e símbolos.....	ix
Resumo.....	x
1. Introdução.....	01
2. Revisão de literatura.....	03
3. Artigo anexado.....	06
3.1 Artigo publicado.....	07
4. Comentários, críticas e conclusões.....	08
5. Apêndice.....	11
6. Referências.....	12
7. Abstract.....	15

## LISTA DE ABREVIÇÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS.

BC	Blood Cell (célula sanguínea)
FI-C	fração insolúvel da célula
FS-P	fração solúvel da célula
FI-P	fração insolúvel do plasma
FS-P	fração solúvel do plasma
Mo	molibdênio
P	plasma
% ATI	porcentagem de radioatividade
rpm	rotações por minuto
SnCl <sub>2</sub>	cloreto estanoso
<sup>99m</sup> Tc	tecnécio-99m
Na <sup>99m</sup> TcO <sub>4</sub>	pertecnetato de sódio

## RESUMO

Avaliações clínicas têm sido possíveis com radiobiocomplexos marcados com tecnécio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ). Drogas naturais ou sintéticas são capazes de interferir na marcação de estruturas sanguíneas com  $^{99m}\text{Tc}$ , e também tem sido descrita a toxicidade de vários produtos naturais. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de um extrato de *Ganoderma lucidum* (Reishi) na marcação de constituintes sanguíneos com  $^{99m}\text{Tc}$  e na sobrevivência de *Escherichia coli*. Amostras de sangue de ratos *Wistar* foram tratadas com extrato de reishi. O procedimento de radiomarcagem foi realizado. Amostras de plasma (P), células sanguíneas (CS) e frações insolúvel (FI) e solúvel (FS) de P e CS foram separadas e a radioatividade foi contada para determinação das porcentagens de radioatividade (%ATI). Culturas de *Escherichia coli* AB1157 foram tratadas com cloreto estânico na presença e ausência do extrato de reishi. Amostras de sangue e culturas bacterianas tratadas com NaCl 0.9% foram usadas como controles. Dados indicaram que o extrato de reishi alterou significativamente ( $p < 0,05$ ) a %ATI de P, CS, FI-P, FS-P, FI-CS e FS-CS, bem como, aumentou a sobrevivência de culturas bacterianas tratadas com cloreto estânico. Nossos resultados sugerem que o extrato de Reishi poderia apresentar ação redox/quelante alterando a marcação de constituintes sanguíneos com  $^{99m}\text{Tc}$  e protegendo culturas bacterianas contra lesões oxidativas induzidas pelo cloreto estânico. O estudo teve caráter multidisciplinar com a participação das seguintes áreas do conhecimento: Biofísica, Radiobiologia, Botânica, Fitoterapia e Hematologia.

Palavras-chave: hemácias; plasma; proteínas, tecnécio-99m; radiobiocomplexos; ratos; *Ganoderma Lucidum*, *Reishi*.

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de produtos naturais é uma prática generalizada na medicina popular. A pesquisa acadêmica trouxe novos conhecimentos sobre as plantas e suas propriedades terapêuticas. O crescente aumento do interesse da comunidade acadêmica em estudar os medicamentos naturais tem contribuído para o uso cada vez mais freqüente e seguro de produtos naturais. Existem alguns estudos sobre o efeito de plantas medicinais na marcação de hemácias com tecnécio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ) (1, 2).

Este estudo teve como objetivo teórico e prático avaliar efeitos de um extrato de *Ganoderma lucidum* em dois modelos experimentais. Foram estudados os efeitos biológicos do *Ganoderma lucidum* na marcação de constituintes sangüíneos com o tecnécio-99m e em culturas bacterianas tratadas com  $\text{SnCl}_2$ .

O *Ganoderma Lucidum(reishi)* vem sendo cada vez mais utilizado nos processos terapêuticos no ocidente e no oriente. Seus efeitos farmacológicos incluem ativação sistema autoimune e manutenção da homeostase do organismo. É amplamente utilizado para prevenção(3). Autores sugerem a ação dessa “erva” como antiinflamatório, antitumoral, antiviral, antibactericida, antitrombótico e com atividade hipotensiva (4).

Nos procedimentos em medicina nuclear, o cloreto estanoso ( $\text{SnCl}_2$ ) é freqüentemente usado como um agente redutor na marcação de moléculas e células com  $^{99m}\text{Tc}$  para obtenção de imagens cintilográficas. Estudos com culturas bacterianas com diferentes capacidades do reparo de lesões no DNA revelaram que lesões causadas pelo  $\text{SnCl}_2$  acarretavam um efeito letal que parece ser mediado pela geração de radicais livres (5).

Pesquisas demonstram que o *Ganoderma lucidum* promove uma ação imunomoduladora no organismo. Observa-se que ocorre o aumento da ação de células autoimunes em pacientes com câncer que estão submetidos a quimioterapia e radioterapia. Ocorre também a prevenção de infecções secundárias, fortalecendo o organismo e mantendo uma melhor qualidade de vida do paciente (6).

O *Ganoderma lucidum* (reishi) é utilizado em medicina tradicional chinesa como "erva da imortalidade". Apresenta as seguintes funções: estimular a circulação sanguínea, fortalecer a imunidade e promover a longevidade. É utilizado como prevenção para doenças como câncer, acidente vascular cerebral e doenças cardíacas (6).

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Radiofarmácia Experimental do Departamento de Biofísica e Biometria, e no Departamento de Histologia do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Os experimentos foram possíveis através de convênio firmado entre a Universidade do Estado do Rio de Janeiro e a Universidade Federal do Rio Grande do Norte, sob a orientação do Professor Doutor Mario Bernardo Filho, e na vigência dos auxílios concedidos pela CAPES, FAPERJ e CNPq.

A pesquisa realizada resultou na publicação do artigo intitulado efeito do extrato de *Ganoderma lucidum* (reishi) na marcação de constituintes sanguíneos com tecnécio-99m e na sobrevivência de *Escherichia coli*. na revista Brazilian Archives of Biology and Technology, Qualis internacional C.

O controle do preparo do extrato de reishi foi realizado por espectrofotometria (ver apêndice).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A descoberta das radiações ionizantes e de elementos radioativos despertou de imediato o interesse de suas aplicações na Biologia e nas Ciências Médicas. Como a origem do fenômeno radioativo é nuclear, os núclídeos que emitem radiação são chamados mais apropriadamente de radionuclídeos. Alguns núclídeos existentes na natureza já são radioativos (naturais) enquanto outros podem ser produzidos pelo homem (artificiais) (8). Em medicina nuclear os radionuclídeos podem ser utilizados como fonte de radiação ou como traçador. No primeiro caso, o material biológico recebe apenas as radiações emitidas pelo radionuclídeo usado. No segundo, o próprio radioisótopo é incorporado no meio biológico que se deseja estudar (9,10,11).

Os radionuclídeos quando utilizados na área biomédica têm possibilitado a elucidação de inúmeros fenômenos que ocorrem nos seres vivos, inclusive no homem, onde os mesmos são administrados como radiofármacos (radiobiocomplexos). Esses são células ou moléculas marcadas com um radionuclídeo, amplamente utilizadas em medicina nuclear, para diagnóstico e para terapia de doenças (9,12,13). A utilização para diagnóstico em medicina nuclear é interessante pelo fato das doses administradas em diagnóstico acarretarem uma baixa exposição do paciente e produzirem imagens de excelentes qualidades (14).

O processo de marcação de células e moléculas com o radionuclídeo tecnécio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ) normalmente necessita da utilização de um agente redutor. A redução do radionuclídeo pode ser obtida através de diferentes agentes químicos, sendo que o cloreto estano (SnCl<sub>2</sub>) é o agente redutor

mais freqüentemente utilizado para esta finalidade. O  $\text{SnCl}_2$  permite obter uma eficiência de marcação do traçador radioativo superior a de outros agentes redutores, justificando sua preferência, não só na medicina nuclear, mas também na marcação de diversas estruturas de interesse biomédico (13, 15).

Estudos clínicos de diagnóstico em procedimentos estáticos e avaliações dinâmicas têm sido possíveis com os radiofármacos marcados com o  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , que é obtido como pertecnetato de sódio ( $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ ) por meio de um gerador  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ (8,16).

Estudos realizados demonstraram que na marcação de hemácias com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , o ânion pertecnetato atravessa o espaço intracelular por troca com os íons cloreto e/ou bicarbonato (18). Estes fatos indicam que o processo de marcação ocorre em nível intracelular. Somando-se a isso, o agente redutor,  $\text{SnCl}_2$ , também parece ser transportado para o interior da hemácia por um sistema de transporte específico, o canal de cálcio (19). Na marcação de hemácias com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  utilizando-se  $\text{SnCl}_2$ , o  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  também pode se ligar com as proteínas plasmáticas dependendo da concentração do agente redutor, do radiobiocomplexo utilizado e do tempo de incubação considerado, como pode ser observado pela técnica de precipitação com ácido tricloroacético (2). Ao administrar-se um radiofármaco a um paciente sempre uma fração do mesmo é encontrada ligada às proteínas plasmáticas (13, 20).

O uso de ervas medicinais vem crescendo muito no ocidente no tratamento da metástase, que é a maior causa do óbito nos pacientes com câncer (21). As ações do Reishi vêm sendo relatadas por mais de 2000 anos (22). Os seus componentes têm sido estudados como fortalecedores da imunidade e

apresentando efeito anti-tumoral, como demonstrado em ambos modelos *in vitro* e *in vivo* (3).

O *Ganoderma lucidum* apresentaria funções anti-angiogênica, anti-invasora e anti-metastática. Também tem sido utilizado no tratamento de enfermidades como HIV, nefritis, hipertensão arterial, desordens imunológicas, agregação plaquetária (21).

O *Ganoderma lucidum* ( apresenta efeito no tratamento da síndrome de Sjogren, onde ocorre a redução na formação da saliva devido a inibição de CD8<sup>+</sup> T comprometendo a imunidade celular. O estudo sugere que ocorre nesta síndrome a apoptose dos linfócitos T.(22).De acordo com a Medicina Tradicional Chinesa através do reishi pode haver a regulação da homeostase fortalecendo o sistema auto imune, reduzindo os efeitos colaterais na síndrome de Sjogren. O Ganoderma também tem sido utilizado no tratamento de artrite reumatóide, reduzindo os processos inflamatórios. (3; 6).

Estudos com culturas bacterianas com diferentes capacidades de reparo de lesões no DNA, mostraram que essas lesões causadas pelo SnCl<sub>2</sub> produziam um efeito letal que parece ser mediado pela geração de radicais livres (8). O efeito do SnCl<sub>2</sub> também dependeria da presença de mecanismo de restauração (7).

### **3. ARTIGO ANEXADO:**

#### **3.1 ARTIGO PUBLICADO**

- The Effect of an Extract From *Ganoderma Lucidum* (Reishi) on the Labeling of Blood Constituents with Technetium-99m and on the Survival of *Escherichia Coli*, publicado em 2008, no periódico “Brazilian Archives of Biology and Technology”, Qualis Internacional C.

### 3.1 ARTIGO PUBLICADO

#### **Separata**

Brazilian Archives of Biology and Technology

v. 51, special number, pp. 157-162, 2008.

**The Effect of an Extract From *Ganoderma Lucidum* (Reishi) on the Labeling of Blood Constituents with Technetium-99m and on the Survival of *Escherichia Coli*,**

Raquel Terra Agostinho, Sebastião David Santos-Filho,

Adenilson de Souza da Fonseca, Mario Bernardo-Filho, Sotiris Missailidis

## The Effect of an Extract From *Ganoderma Lucidum* (Reishi) on the Labeling of Blood Constituents with Technetium-99m and on the Survival of *Escherichia Coli*

Raquel Terra Agostinho<sup>1,2</sup>, Sebastião David Santos-Filho<sup>2</sup>, Adenilson de Souza da Fonseca<sup>2,3\*</sup>, Mario Bernardo-Filho<sup>2</sup> and Sotiris Missailidis<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Norte; Av. General Gustavo Cordeiro de Farias, s/n; 59010180; Natal - RN - Brasil. <sup>2</sup>Universidade do Rio de Janeiro; Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes; Departamento de Biofísica e Biometria; Av. 28 de Setembro, 87; 20551030; Rio de Janeiro - RJ - Brasil. <sup>3</sup>Centro Universitário Serra dos Órgãos; Centro de Ciências da Saúde; Av. Alberto Torres, 111; 25964004; Teresópolis - RJ - Brasil. <sup>4</sup>Department of Chemistry and Analytical Sciences; The Open University; Walton Hall; Milton Keynes; MK6 7AA; U.K

### ABSTRACT

This study evaluated effects of an aqueous extract of *Ganoderma lucidum* (reishi) on the labeling of blood constituents with technetium-99m (<sup>99m</sup>Tc) and on the survival of cultures of *Escherichia coli* treated with stannous chloride. Blood samples from Wistar rats were treated with reishi extract, radiolabeling procedure was performed, plasma (P), blood cells (BC) and insoluble (IF) and soluble (SF) fractions of P and BC were separated. The radioactivity was counted for the determination of the percentages of radioactivity (%ATI). Cultures of *Escherichia coli* AB1157 were treated with stannous chloride in the presence and absence of reishi extract. Blood samples and bacterial cultures treated with NaCl 0.9% were used as controls. Data indicated that reishi extract altered significantly ( $p < 0.05$ ) the %ATI of P, BC, IF-P, SF-P, IF-BC and SF-BC, as well as increased the survival of bacterial cultures treated with stannous chloride. Our results suggest that reishi extract could present a redox/chelating action, altering the labeling of blood constituents with <sup>99m</sup>Tc and protecting bacterial cultures against oxidative damage induced by stannous chloride.

**Keywords:** blood constituents, *Escherichia coli*, *Ganoderma lucidum*, stannous chloride, technetium-99m

### INTRODUCTION

*Ganoderma lucidum* (reishi) is a traditional chinese medicine product known to the layman as the "herb of immortality". It has been used as a health tonic to promote longevity for more than two thousand years. Reishi extract contains two major groups of bioactive polysaccharide and

triterpene components (Bao et al., 2002). These compounds in reishi have been studied due to their potential immunomodulating activity and anti-tumor effect, as demonstrated in both *in vitro* and *in vivo* models (Lin et al., 2004).

Pharmacological effects and physiological properties of reishi include immune enhancement, maintenance of homeostasis and regulation of

\* Author for correspondence

biorhythm, and prevention of and improvement against some diseases, including cancer, cerebral stroke and heart disease (Lin et al., 2004). Other authors have suggested antifungal, anti-inflammatory, antitumor, antiviral, antibacterial, hepatoprotective, antidiabetic, hypolipemic, antithrombotic and hypotensive activities for reishi (Ajith et al., 2007).

Red blood cells labeled with technetium-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ -RBC) are used in clinical nuclear medicine for diagnostic evaluations (Verdu et al., 2005; Olds et al., 2005). Thus, the labeling of RBC with  $^{99m}\text{Tc}$  has been also used as an assay to investigate the properties of different chemical agents (Fonseca et al., 2007). This radiolabeling depends on the presence of a reducing agent and stannous chloride has been widely utilized (Saha, 2004).

Although, the stannous ion has clinical utilization, some authors have suggested that stannous chloride appears to induce lesions in the deoxyribonucleic acid (DNA) by oxidative mechanisms related to free radical generation (El-Demerdash et al., 2005; Presta et al., 2007), which could result in cell inactivation or potentially tumorigenesis and protection against this effect would be of particular interest in nuclear medicine, where stannous chloride is used for the preparation of radiopharmaceuticals (Saha, 2004).

Thus, the aim of this work study was to verify the effects of an extract of reishi on the labeling of blood constituents with  $^{99m}\text{Tc}$  and on the survival of *Escherichia coli* cultures treated with stannous chloride.

## MATERIALS AND METHODS

### Extract preparation

*Ganoderma lucidum* (GL) (0,35 g) (SKL Herbal Científica Laboratório Farmacêutico Ltda., lot number 201221, validity November 2008). The extract of reishi was prepared with 0.35 g of a purified powder in 100 mL of 0.9% NaCl (saline). The preparation was homogenized in a vortex mixer and centrifuged (2000 rpm, 10 minutes). The supernatant was collected and considered to be 3.5 mg/mL.

### Spectrophotometric measurements

Spectrophotometric analysis (TV-VIS Spectrophotometer Beijing Purkinje General Instrument Co., Ltd, Beijing, People's Republic of China) of the extract at 3.5 mg/ml was carried out.

An absorption peak ( $0.56\pm 0.01$ ) was obtained at 255 nm and it was used as a marker of reproducibility preparation of this extract.

### Animals

*Wistar* rats (n= 12, 3-4 months,  $245\pm 35$ g) were kept under controlled environmental conditions ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ , 12h of light/dark cycle), water and *libitum* and normal diet. Heparinized whole blood was withdrawn by cardiac puncture from animals under anesthesia by sodium thiopental (40mg/kg). All the experimental procedures followed the Ethical Guidelines of the *Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro* with the protocol number CEA/115/2006.

### Labeling of blood constituents with $^{99m}\text{Tc}$

Blood samples (n = 8, for each extract concentration) of whole blood were incubated with reishi extract (0.0, 0.2, 0.4, 0.85, 1.75 and 3.5mg/mL, 1 hour). After that, a freshly prepared stannous chloride solution ( $\text{SnCl}_2$ , 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Sigma Chemical Co. St Louis, USA, 1 hour) was added. Then,  $^{99m}\text{Tc}$  (3.7 MBq, 10 minutes) was added. These samples were centrifuged (1500 rpm, 5 minutes) and plasma (P) and blood cells (BC) were separated. Aliquots of P and BC were also precipitated in trichloroacetic acid (5%) and soluble (SF) and insoluble (IF) fractions were obtained. Radioactivity (%ATI) in P, BC, IF-P, SF-P, IF-BC and SF-BC was determined in a well gamma counter (Clinigamma, gamma counter, Packard, Instrument Company, mod C5002, USA). The percentage of incorporated radioactivity (%ATI) was calculated as previously described (Bernardo Filho et al., 1983). The data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation of %ATI. The values were analyzed by one-way variance analysis (ANOVA) with a  $p < 0.05$  as significant level followed by Bonferroni post-test.

### Bacterial inactivation

*E. coli* AB1157, a wild-type strain, proficient in repairing DNA damage, was used in this work. From stock (in glycerol 50% v/v), an aliquot was grown in liquid LB (Luria and Burrous, 1957) medium at  $37^\circ\text{C}$  overnight up to stationary growth phase. An aliquot was taken from this culture and further incubated under the same conditions to reach exponential growth ( $10^8$  cells/mL). The cells were collected by centrifugation, washed twice in saline and suspended again in saline. After that, bacterial suspensions ( $10^8$  cells/mL) were treated

with stannous chloride (25 µg/mL) in the presence or absence of reishi extract (1.75 and 3.5 mg/mL) for 60 minutes. Aliquots from these treatments were diluted in saline, spread onto Petri dishes containing solidified LB medium (1.5% agar). Colonies formed after overnight incubation at 37 °C were counted and the survival fraction was calculated as described before (Almeida et al., 2007). Experiments were carried out in triplicate and the results presented are the average mean of three independent assays.

## RESULTS

Table 1 presents the %ATI of the plasma and blood cells from blood samples treated with reishi extract. These data suggest that reishi extract at the highest concentrations used (1.75 and 3.5 mg/mL) alters the distribution of radioactivity between plasma and cellular components.

**Table 1** - Effect of the treatment with reishi extract on the distribution of radioactivity between plasma and cellular compartments.

Ganoderma (mg/mL)	% ATI	
	P	BC
0.0	7.17±0.93	92.82±0.93
0.2	6.16±5.33	93.83±5.33
0.4	2.55±1.39	97.44±1.49
0.85	2.90±0.86	97.09±0.86
1.75	41.74±3.76 *	58.25±3.76 *
3.5	54.88±1.82 *	45.11±1.82 *

(\*)  $p < 0.05$  when compared with control.

Table 2 presents the %ATI of the insoluble and soluble fractions of plasma. Data suggest that reishi extract treatment at highest concentrations

(0.85, 1.75 and 3.5 mg/mL) also alters the fixation of radioactivity on plasma proteins.

**Table 2** - Effect of reishi extract on the fixation of radiactivity on plasma fractions.

b	% ATI	
	IF-P	SF-P
0.0	67.89±4.35	32.11±4.35
0.2	64.51±4.04	35.48±4.04
0.4	68.68±3.85	31.32±3.85
0.85	53.85±2.20 *	46.15±2.20 *
1.75	14.15±8.60 *	85.85±8.60 *
3.5	6.30±0.48 *	93.70±0.48 *

Insoluble fraction of the plasma (IF-P), soluble fraction of the plasma (SF-P). (\*)  $p < 0.05$  when compared with control.

Table 3 presents the %ATI of the insoluble and soluble fractions of blood cells. Data suggest that reishi extract treatment at the higher concentration (3.5 mg/mL) alters the fixation of radioactivity on cellular proteins.

Figure 1 shows the survival fractions of *E. coli* AB1157 cultures treated with SnCl<sub>2</sub> in the presence and absence of reishi extract, demonstrating that reishi offers protection from

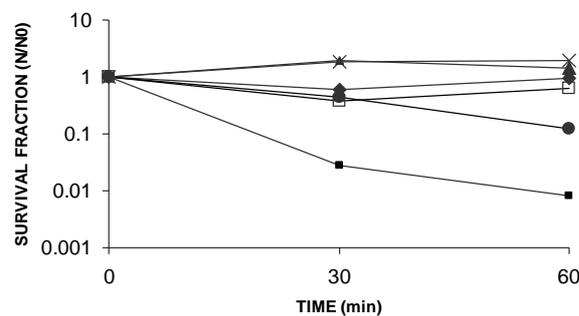
free radicals generated by stannous chloride.

Data in figure 1 suggest that the treatment with reishi extract would not present cytotoxic effects on *E. coli* AB1157 cell cultures, in the absence of stannous chloride, but would increase the survival of these cultures treated with stannous chloride, particularly at the higher dose.

**Table 3** - Effect of reishi extract on the fixation of radioactivity on blood cell fractions.

Ganoderma (mg/mL)	% ATI	
	IF-BC	SF-BC
0.0	89.85±2.81	10.15±2.81
0.2	89.27±7.74	10.73±7.74
0.4	93.03±1.73	6.97±1.73
0.85	89.97±4.34	10.03±4.34
1.75	74.19±10.40	25.81±10.40
3.5	26.30±0.53 *	73.70±0.53 *

Insoluble fraction of the blood cells (IF-BC), soluble fractions of the blood cells (SF-BC). (\*)  $p < 0.05$  when compared with control.



**Figure 1** - Survival fractions of *E. coli* AB1157 cultures treated with stannous chloride in the presence and absence of reishi extract. *E. coli* AB 1157 cultures were treated with stannous chloride ( $\text{SnCl}_2$ , 25  $\mu\text{g/mL}$ ) in presence and absence of reishi extract (17.5 and 35 mg/mL), aliquots were diluted in saline and spread onto Petri dishes. After overnight incubation (37 °C), colony forming units were counted to determine survival fractions. (◆) control; (■)  $\text{SnCl}_2$ ; (●)  $\text{SnCl}_2$ +1.75mg/mL reishi; (□)  $\text{SnCl}_2$ +3.5mg/mL reishi; (×) reishi extract 1.75mg/mL; (▲) reishi extract 3.5mg/mL.

## DISCUSSION

There is evidence that natural drugs could affect the radiolabeling of blood constituents, and these findings have been considered in the development of this procedure as an experimental model to verify the properties of these drugs (Benarroz et al., 2008; Frydman et al., 2008).

The analysis of tables 1, 2 and 3 indicates that there was an important alteration on the radiolabeling of the blood constituents from blood samples treated with reishi extract. It is interesting to note that although in the absence of reishi nearly 93% of ATI was in the cellular component, this shifted to almost equal distribution between on plasma and blood cells compartments at high reishi concentrations. Furthermore, there was a

shift in the labeling of soluble and insoluble fractions, where the %ATI in the insoluble fractions changed from nearly 70% to less than 7%, with a corresponding increase of labeling in the soluble fractions. The pattern was similar in the labeling of the cellular component, with a shift of the highest labeling (expressed as %ATI) from the insoluble towards the soluble fractions.

Previous studies have demonstrated that reishi extracts act on humoral immune response (Bao et al., 2002; Lin et al., 2005) and a polysaccharide isolated from reishi has been shown to increase the response to sheep RBC in mice (Lin et al., 2004). *In vitro*, reishi polysaccharides also increased lymphocyte proliferation (Cao et al., 2003). Radiolabeling data obtained in this study could be related to actions of reishi polysaccharides on

blood constituents. Another possibility is the redox/chelating action of the substances in reishi extract. In fact, some natural products could alter the labeling of blood constituents with  $^{99m}\text{Tc}$  by interfering on the reducing action of the  $\text{SnCl}_2$  (Benarroz et al., 2008).

To verify this hypothesis, effects of reishi extract on *E. coli* AB1157 treated with  $\text{SnCl}_2$  were evaluated (Figure 1). Our data suggest that the extract used could protect *E. coli* cells against the oxidative effect of  $\text{SnCl}_2$  and indicate that chemical compounds in reishi extract present redox/chelating activity. In addition, data obtained with bacterial cultures treated with reishi in the absence of stannous chloride indicate an absence of antibacterial action of the reishi extract used. Similar findings were obtained with an extract of cauliflower (Lima et al., 2002).

In conclusion, results obtained in this work suggest that reishi extract has redox/chelating properties, altering the labeling of blood constituents with  $^{99m}\text{Tc}$  and protecting bacterial cultures against oxidative damage induced by stannous chloride.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by *Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro* (FAPERJ), *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq), *Universidade do Estado do Rio de Janeiro* (UERJ) and The Open University (OU).

## RESUMO

Este estudo avaliou efeitos de um extrato de *Ganoderma lucidum* (reishi) na marcação de constituintes sanguíneos com tecnécio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ) e na sobrevivência de culturas de *Escherichia coli* tratadas com cloreto estano. Amostras de sangue de ratos *Wistar* foram tratadas com extrato de reishi, o procedimento de radiomarcagem foi realizado, plasma (P), células sanguíneas (CS) e frações insolúvel (FI) e solúvel (FS) de P e CS foram separadas e a radioatividade foi contada para determinação das porcentagens de radioatividade (%ATI). Culturas de *Escherichia coli* AB1157 foram tratadas com cloreto estano na presença e ausência do extrato de reishi.

Amostras de sangue e culturas bacterianas tratadas com NaCl 0.9% foram usadas como controles. Dados indicaram que o extrato de reishi alterou significativamente ( $p < 0,05$ ) a %ATI de P, CS, FI-P, FS-P, FI-CS e FS-CS, bem como, aumentou a sobrevivência de culturas bacterianas tratadas com cloreto estano. Nossos resultados sugerem que o extrato de reishi poderia apresentar ação redox/quelante alterando a marcação de constituintes sanguíneos com  $^{99m}\text{Tc}$  e protegendo culturas bacterianas contra lesões oxidativas induzidas pelo cloreto estano.

## REFERENCES

- Ajith, T. A. (2007), 2007 and Kainoor K. Janardhanan Indian Medicinal Mushrooms as a Source of Antioxidant and Antitumor Agents. *J Clin Biochem Nutr.*, **40**, 157-162.
- Almeida, M. C.; Soares, S. F.; Abreu, P. R.; Jesus, L. M.; Brito, L. C.; Bernardo-Filho, M. (2007), Protective effect of an aqueous extract of *Harpagophytum procumbens* upon *Escherichia coli* strains submitted to the lethal action of stannous chloride. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **53**, 923-927.
- Bao, X. F.; Wang, X. S.; Dong, Q.; Fang, J. N.; Li, X.Y. (2002), Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, **59**, 175-181.
- Benarroz, M. O.; Fonseca, A. S.; Rocha, G. S.; Frydman, J. N.; Rocha, V. C.; Pereira, M. O.; Bernardo-Filho, M. (2008), Cinnamomum zeylanicum extract on the radiolabelling of blood constituents and the morphometry of red blood cells: In vitro assay. *Appl Radiat Isot.*, **66**, 139-146.
- Bernardo-Filho, M.; Moura, I.; Boasquevisque, E. (1983),  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled red blood cells "in vitro". *Arq BiolTecnol.*, **26**, 455-461.
- Cao, L. Z.; Lin, Z. B. (2003), Comparison of the effects of polysaccharides from wood-cultured and bag-cultured *Ganoderma lucidum* on murine spleen lymphocyte proliferation in vitro. *Acta Pharm Sin.*, **38**, 92-97.
- El-Demerdash, F. M.; Yousef, M. I.; Zoheir, M. A. (2005), Stannous chloride induces alterations in enzyme activities, lipid peroxidation and histopathology in male rabbit: antioxidant role of vitamin C. *Food Chem Toxicol.*, **43**, 1743-1752.
- Fonseca, A. S.; Frydman, J. N.; Rocha, V. C.; Bernardo-Filho, M. (2007), Acetylsalicylic acid decreases the labeling of blood constituents with technetium-99m. *Acta Biol Hung.*, **58**, 187-198.

- Frydman, J. N. G.; Rocha, V. C.; Benarroz, M. O.; Rocha, G. S.; Pereira, M. O.; Fonseca, A. S.; Bernardo-Filho, M. (2008a), Assessment of effects of a *Cordia salicifolia* extract on the radiolabeling of blood constituents and on the morphology of red blood cells. *J Med Food*, *in press*.
- Lima, E. A.; Diré, G.; Mattos, D. M.; Freitas, R. S.; Gomes, M. L.; de Oliveira, M. B.; Faria, M. V.; Jales, R. L.; Bernardo-Filho, M. (2002), Effect of an extract of cauliflower (leaf) on the labeling of blood elements with technetium-99m and on the survival of *Escherichia coli* AB1157 submitted to the treatment with stannous chloride. *Food Chem Toxicol.*, **40**, 919-923.
- Lin, Z. B. (2005), Cellular and molecular mechanisms of immuno-modulation by *Ganoderma lucidum*. *J Pharmacol Sci.*, **99**, 144-153.
- Lin, Z. B.; Zhang, H. N. (2004), Anti-tumor and immunoregulatory activities of *Ganoderma lucidum* and its possible mechanisms. *Acta Pharmacol Sin.*, **25**, 1387-1395.
- Luria, S. E.; Burrous, J. W. (1957), Hybridization between *E. coli* and *Shigella*. *J Bacteriol.*, **74**, 461-476.
- Olds, G. D.; Cooper, G. S.; Chak, A.; Sivak, M. V. J.; Chitale, A. A.; Wong, R. C. (2005), The yield of bleeding scans in acute lower gastrointestinal hemorrhage. *J Clin Gastroenterol.*, **39**, 273-277.
- Presta, G. A.; Fonseca, A. S.; Bernardo-Filho, Mario. (2007), A *Chrysobalanus icaco* extract alters the plasmid topology and the effects of stannous chloride on the DNA of plasmids. *Rev Bras Farmacogn.*, **17**, 331-335
- Saha, G. B. (2004), Fundamentals of nuclear pharmacy. Springer Verlag, New York.
- Verdu, J.; Martinez, A.; Anton, M. A.; Munoz J. M.; Riera, M.; Jover, R.; Caballero, O. (2005), Increased thallium-201 uptake and Tc-99m red blood cell accumulation in hemangioma. *Clin Nucl Med.*, **30**, 25-26.

Received: August 26, 2008;  
Revised: September 11, 2008;  
Accepted: September 15, 2008.

#### **4 .COMENTÁRIOS, CRÍTICAS E CONCLUSÕES.**

A experiência como Professora do curso de pós graduação em Medicina Tradicional Chinesa - Rio de Janeiro durante 5 anos despertou o interesse da autora desse estudo na busca por uma maior qualificação profissional e experiência científica no curso de mestrado.

Com o objetivo de compreender de forma mais ampla os efeitos produzidos por produtos naturais iniciamos com os experimentos com o extrato *Ganoderma lucidum*, que é um extrato utilizado em Medicina Tradicional Chinesa.

Este trabalho teve como base inicial os estudos de biodistribuição do pertecnetato de sódio e a morfometria das hemácias expostas ao extrato estudado, posteriormente a metodologia foi alterada, para que sua execução pudesse ser em tempo hábil para estudos de marcação com tecnécio-99m e experimentos com cultura bacteriana, analisando a atuação do extrato, padronizando os seus elementos através da análise da espectrometria.

Com parte dos resultados obtidos com os estudos com o Reishi elaboramos um artigo, intitulado “*O efeito do extrato de Ganoderma lucidum na marcação dos constituintes sanguíneos com tecnécio- 99m e na sobrevivência de Escherichia coli*”, publicado na “Brazilian Archives of Biology and Technology”, Qualis Internacional C, o que abrange a metodologia utilizada para o desenvolvimento dessa etapa do projeto.

Ao concluirmos nosso estudo, verificamos que compostos químicos existentes nos extratos estudados são os responsáveis pelos efeitos produzidos e que caracterizam o mecanismo de ação da planta medicinal nos

diferentes níveis de organização estrutural, da molécula a célula e ao tecido biológico.

Estudos com radiofarmacos são de elevada importância para profissionais de saúde que utilizam os exames da medicina nuclear para tratamento e diagnóstico de diversas doenças como os médicos e os fisioterapeutas. O fisioterapeuta é profissional de nível superior que prescreve, ministra e supervisiona terapia física com o objetivo de presenciar, manter, desenvolver ou restaurar a integridade de um órgão, sistema ou função do corpo humano, através de terapias físicas e terapias cinéticas. Para um bom êxito do tratamento utilizado o fisioterapeuta necessita de exames complementares que forneçam informações precisas para diagnóstico e acompanhamento da evolução do tratamento de um paciente como os exames da medicina nuclear utilizados na avaliação por imagem.

Através deste estudo acreditamos haver contribuído para que os profissionais da área da saúde, e entre eles o fisioterapeuta, tenham novos parâmetros sobre os efeitos das plantas medicinais estudadas sobre o organismo humano, correspondendo as nossas expectativas.

Deseja-se também que as informações levantadas por esta pesquisa sirvam de ponto de partida para novos estudos sobre a avaliação de outros mecanismos de ação no organismo vivo, favorecendo modos de ação em pacientes que estejam utilizando produtos naturais e venham realizar exames de medicina nuclear.

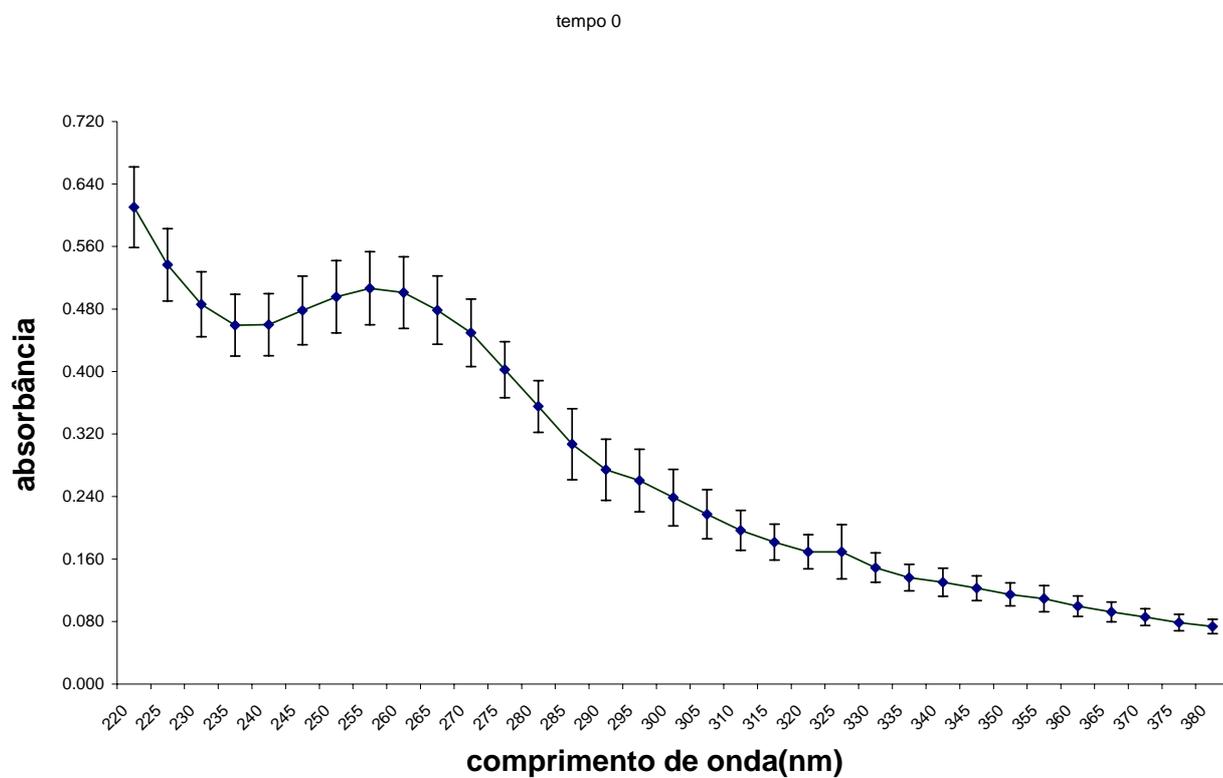
As plantas medicinais vêm sendo utilizadas em larga escala no ocidente. Os estudos são fundamentais para que ocorra maior credibilidade no mecanismo de ação e aplicabilidade na clínica. O *Ganoderma lucidum* (Reishi) é utilizado a

muitas décadas no oriente como fortalecedor da imunidade, porém os estudos sobre o seu mecanismo de ação só recentemente tem sido mais publicados.

A vivência como educadora estimulou a busca do conhecimento através do método científico. A experiência no Curso de Mestrado e a aquisição de novos conhecimentos poderão ser relevantes para ações em projetos futuros junto a grupos de pesquisa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro e na orientação de novos alunos nos programas de pós-graduação.

## APÊNDICE

Medidas espectrofotométricas:



Análise espectrofotométrica do extrato a 3.5 mg/ml foi realizada. Um pico de absorvância ( $0,56 \pm 0,01$ ) foi obtido a 255 nm e foi usado como um marcador da reprodutibilidade da preparação do extrato.

## REFERÊNCIAS

1. Rebello BM, Moreno SR, Godinho CR, Neves RF, Fonseca AS, Bernardo-Filho M, Medeiros AC. Effects of *Passiflora edulis flavicarpa* on the radiolabeling of blood constituents, morphology of red blood cells and on the biodistribution of sodium pertechnetate in rats..Applied Radiation Isotopes 2008; 66(12):1788-92.
2. Freitas RS, Moreno SR, Lima-Filho GL, Fonseca AS, Bernardo-Filho M. Effect of a commercial extract of *Paullinia cupana* (guaraná) on the binding of <sup>99m</sup>Tc-DMSA on blood constituents: An in vivo study. Applied Radiation and Isotopes 2007; 65:528-533.
3. Lin, Z. B.; Zhang, H. N. (2004), Anti-tumor and immunoregulatory activities of *Ganoderma lucidum* and its possible mechanisms. Acta Pharmacol Sin. 2004; 25: 1387-1395.
4. Ajith, T. A. and Kainoor K. Janardhanan Indian Medicinal Mushrooms as a Source of Antioxidant and Antitumor Agents. J Clin Biochem Nutr. 2007; 40: 157-162.
5. Bernardo-Filho M, Cunha MC, Valsa JO, Araújo AC, Silva FCP, Fonseca AS. Evaluation of potential genotoxicity of stannous choride: inactivation, filamentation and lysogenic induction of *Escherichia coli*. Food and Chemical Toxicology 1994; 32:477-479.
6. Dantas FJS, Moraes MO, Carvalho EF, Valsa JO, Bernardo-Filho M, Caldeira-de-Araújo A. Lethality induced by stannous chloride on *Escherichia coli* AB1157: Participation of reactive oxygen species. Food and Chemical Toxicology 1996; 34:959-962.

7. Zhuang SR, Chen SL, Tsai JH, Huang CC, Wu TC, Liu WS, Tsen HC, Lee HS, Huang MC, Shane GT, Yang CH, Shen YC, Yan YY, Wang CK. Effect of citronellol and Chinese medical herb complex on cellular immunity of cancer patients receiving chemotherapy / radiotherapy. *Phytother Res.* 2009.
8. Early PJ, Sodee DB. *Principles and Practice of Nuclear Medicine.* Mosby, London 1995.
9. Owunwanne A, Patel M, Sadek S. *The Handbook of Radiopharmaceuticals.* Chapman and Hall, London 1995.
10. Perkins A, Frier M. *Nuclear Medicine Pharmaceutical Research.* Taylor & Francis, London 1999.
11. Maiworm AI, Santos-Filho SD, Presta GA, Giani TS, Paoli S, Bernardo-Filho M. Evaluation of the in vitro effect of a *Lantana camara* extract on the labeling of blood constituents of rats with technetium-99m. *Acta Physiol Hung.* 2008; 95(1):87-95.
12. Bernardo-Filho M, Santos-Filho SD, Moura EG, Maiworm AI, Orlando MMC, Penas ME, Cardoso VN, Bernardo LC, Brito LC. Drug interaction with radiopharmaceuticals: a review. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2005; 48: 13-28.
13. Van de Wiele C, Lahorte C, Oyen W, Boerman O, Goethals I, Slegers G, Dierckx RA. Nuclear medicine imaging to predict response to radiotherapy: a review. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 2003; 55(1): 5-15.
14. Saha GB. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy.* Springer-Verlag, New York 2005.

15. Fukuzawa M, Yamaguchi R, Hide I, Chen Z, Hirai Y, Sugimoto A, Yasuhara T, Nakata Y. Possible involvement of long chain fatty acids in the spores of *Ganoderma lucidum* (Reishi Houshi) to its anti-tumor activity. Biol Pharm Bull. 2008 Oct;31(10):1933-7
16. Guedes AP, Cardoso VN, De Mattos JC, Dantas FJ, Matos VC, Silva JC, Bezerra RJ, Caldeira-de-Araujo A. Cytotoxic and genotoxic effects induced by stannous chloride associated to nuclear medicine kits. *Nuclear Medicine and Biology* 2006; 33:915-21.
17. Decristoforo C, Mather S.J. The influence of chelator on the pharmacokinetics of <sup>99m</sup>Tc-labelled peptides. *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine* 2002; 46: 195-205.
18. Ballinger JR. The influence of carrier on <sup>99m</sup>Tc radiopharmaceuticals. *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine* 2002; 46: 224-232.
19. Gutfilen B, Boasquevisque EM, Bernardo-Filho M. Calcium channel blockers: interference on red blood cells and plasma proteins labeling with Tc-<sup>99m</sup>. *Revista Espanhola de Medicina Nuclear* 1992; 11: 195-199.
20. Harbert JC, Eckelman WC, Neumann RD. *Nuclear Medicine Diagnosis and Therapy*. New York, Thieme 1996, p.195-265.
21. Chen NH, Liu JW, Zhong JJ. Ganoderic acid Me inhibis tumor invasion through down –regulating matrix metalloproteinases 2/9 gene expression.. *Pharmacol Sci.* 2008; 108(2): 212-6.
22. QI Ge, Hua Hong, GAO Yan, LIN Qin and YU Guang-yan. Effect of *Ganoderma lucidum* spores on sialoadenitis of nonobese diabetic mice. *Chin Med J* 2009;122(5):556-560.

## ABSTRACT

Clinical evaluations have been made possible with radiobiocomplexes marked with technetium-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ). Natural or synthetic drugs are able to interfere in the marking of blood structures with  $^{99m}\text{Tc}$ . Also, the toxicity of several natural products has been described. The aim of this study was evaluating the effect of an extract of *Ganoderma lucidum* (Reishi) in the marking of blood constituents with  $^{99m}\text{Tc}$  and in the survival of *Escherichia coli*. Blood samples from *Wistar* rats were treated with reishi extract. Radiomarking procedure was performed. Samples of plasma (P), blood cells (CS), and insoluble (FI) and soluble (FS) fractions of P and CS were separated and the radioactivity was counted to determine radioactivity percentages (%ATI). *Escherichia coli* AB1157 cultures were treated with stannous chloride in the presence and absence of the reishi extract. Blood samples and bacterial cultures treated with NaCl 0.9% were used as controls. Data indicated that the reishi extract has significantly altered ( $p < 0,05$ ) the %ATI of P, CS, FI-P, FS-P, FI-CS e FS-CS, as well as it has increased survival of bacterial cultures treated with stannous chloride. Our results suggest that the Reishi extract would be able to present a redox/ chelant action by altering blood constituent marking with  $^{99m}\text{Tc}$  and by protecting bacterial cultures against stannous chloride-induced oxidating lesions. The study had a multidisciplinary character, with the participation of the following areas of knowledge: Biophysics, Radiobiology, Botany, Phytotherapy, and Hematology.

Key words: red blood cells; plasma; proteins; technetium-99m; radiobiocomplexes; rats; *Ganoderma Lucidum*, Reishi.