

ANÁLISE CITOLÓGICA DO EFEITO DOS EXTRATOS AQUOSOS DE *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatoroseus* SOBRE OS CICLOS DE DESENVOLVIMENTO de *Aspergillus (=Emericella) nidulans*

Marcela Funaki dos Reis^{1,2}, Carmem Lúcia M. S. C. da Rocha²

RESUMO

Os cogumelos apresentam propriedade de modulação do ciclo celular por meio da ação de compostos bioativos. Para estudos do ciclo celular o fungo filamentososo *Aspergillus nidulans* é considerado um excelente modelo, pois apresenta características que facilitam sua manipulação. Tendo em vista o aumento no consumo de cogumelos e o crescente interesse nas suas propriedades nutracêuticas. Este trabalho teve por objetivo analisar a influência dos extratos aquosos dos cogumelos *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatoroseus* sobre os ciclos de desenvolvimento de *A. nidulans*. Para tanto, os tratamentos foram constituídos da aplicação dos extratos dos cogumelos em meio completo sólido e posterior inoculação das linhagens normais biA1methG1 e MSE, e mutantes para o desenvolvimento CLB3 e G422UV. Foram observados a conidiogênese e o ciclo sexual. Foi possível observar que os extratos de cogumelos retardam a conidiogênese a favor da aceleração do ciclo sexual, reforçando a necessidade do estudo do efeito destes cogumelos sobre os mecanismos de controle da proliferação e diferenciação celular, a fim de se determinar sua possível utilização na suplementação humana.

Palavras-chave: cogumelos; compostos bioativos; fungos filamentosos; conidiogênese; ciclo sexual.

ANALYSIS CYTOLOGICAL EFFECT OF AQUEOUS EXTRACTS FROM *Lentinula edodes* AND *Pleurotus ostreatoroseus* CYCLES ON DEVELOPMENT *Aspergillus (= Emericella) nidulans*

ABSTRACT

Mushrooms have a cell cycle modulation through the activity of bio-active compounds. The filamentous fungus *Aspergillus nidulans* is an excellent model for cell cycle studies since its characteristics are easy to handle. Owing to an increase in mushroom consumption and an increasing interest in their nutraceutical properties, the influence of water extracts of mushrooms *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatoroseus* on the development cycles of *A. nidulans* is analyzed. Treatments comprised the application of mushroom extracts in a totally solid medium and then the inoculation of normal strains biA1methG1 and MSE, and mutants for the development of CLB3 and G422UV. Conidiogenesis and the sexual cycle were observed. Mushroom extracts retard conidiogenesis for the benefit of an acceleration of the sexual cycle. In-depth studies on the effect of the mushrooms on the control mechanisms for cell proliferation and differentiation are mandatory so that their possible usage in human supplements could be determined.

Keywords: mushrooms; bioactive compounds; filamentous fungi; conidiogenesis, sexual cycle.

¹ Faculdade Integrado de Campo Mourão, Curso de Nutrição.

² Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-graduação em Biologia Comparada, Centro de Ciências Biológicas.

INTRODUÇÃO

Os cogumelos são alimentos apreciados por seu aroma, textura, valor nutricional e compostos bioativos potencialmente medicinais. Tais compostos como β -glucanas e antioxidantes conferem aos cogumelos as propriedades imunomodulatória (1), antiproliferativa (2), anticancerígena (3) e pró apoptótica (4). De acordo com estas propriedades é possível notar a influência dos cogumelos sobre a modulação do ciclo celular.

A forma mais popular de consumo de cogumelos é o extrato, porém para extração de diferentes compostos a partir da mesma amostra são utilizados solventes geralmente tóxicos e impróprios para o consumo. A extração aquosa utiliza água como solvente, sendo capaz de extrair compostos polares que apresentam propriedades medicinais, como observado para os cogumelos *Lentinula edodes*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus florida*, *Pleurotus eryngii* (5-7).

Aspergillus (= *Emericella*) *nidulans* é um fungo filamentosos considerado modelo para estudos de genética do desenvolvimento, sendo considerado um excelente sistema para o estudo da diferenciação celular (8). Sua utilização é indicada devido a haploidia, morfogênese bem definida e ciclo de vida curto (9) compreendendo 3 fases: a vegetativa, a conidiogênese (assexuada) e a sexual (10).

O ciclo de vida de *A. nidulans* tem início com a germinação do conídio e desenvolvimento de hifas vegetativas. Estas hifas adquirem competência e iniciam o ciclo assexuado chamado conidiogênese que culmina na formação de uma estrutura de reprodução especializada denominada conidióforo. O conidióforo é formado a partir da diferenciação de uma hifa para célula-pé, desenvolvimento da haste, e vesícula. Em seguida são formadas as métulas e as fiáides, e ao final surgem os conídios em cadeias (8). A entrada no ciclo sexual é marcada pelo desenvolvimento das Células de Hülle que protegem o primórdio do Cleistotécio. O Cleistotécio é uma estrutura de reprodução que abriga em seu interior grande quantidade de ascos, cada um com 8 ascósporos binucleados (11-13).

Os programas de desenvolvimento celular em *A. nidulans*, embora respondam a fatores externos, são coordenados

geneticamente por grupos de genes que regulam toda a cascata de eventos que leva a formação de cada uma das estruturas da colônia (14-15, 8). Por este motivo, a análise dos ciclos de desenvolvimento de *A. nidulans* constitui um excelente instrumento para avaliar a ação de substâncias inibidoras ou protetoras, sobre os mecanismos de controle da expressão gênica e preservação da homeostase (16).

Devido ao aumento do consumo dos cogumelos e poucos relatos sobre seu efeito no ciclo de desenvolvimento, este estudo teve como objetivo analisar a influência dos extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatoroseus* sobre os ciclos de desenvolvimento de *Aspergillus* (= *Emericella*) *nidulans*.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagens de *A. nidulans*

Para testar o efeito dos extratos aquosos dos cogumelos foram utilizadas as linhagens de *A. nidulans* normais para o desenvolvimento *biA1methG1* e MSE, e os mutantes CLB3 (mutante para crescimento, esporulação e ciclo sexual) e G422U (mutante para crescimento, esporulação e sistema de reparo por excisão de bases). Estas linhagens foram repicadas e mantidas por cinco dias em Meio Completo (MC) sólido, em estufa incubadora a temperatura de 37°C.

Cogumelos

Os cogumelos *Lentinula edodes* (Berkeley) Plegler e *Pleurotus ostreatoroseus* Singer foram fornecidos por um mercado em Maringá-PR.

Extratos Aquosos dos Cogumelos

Os basidiomas frescos foram liofilizados e 2,5g do pulverizado foram extraídos em 100 mL de água destilada por 2 horas, em repouso, à temperatura ambiente. Os extratos foram filtrados duas vezes, e em seguida em filtro Millipore com 20 μ m de tamanho de poro.

Meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi o Meio Completo (MC) sólido (11, 17-18).

Tratamento

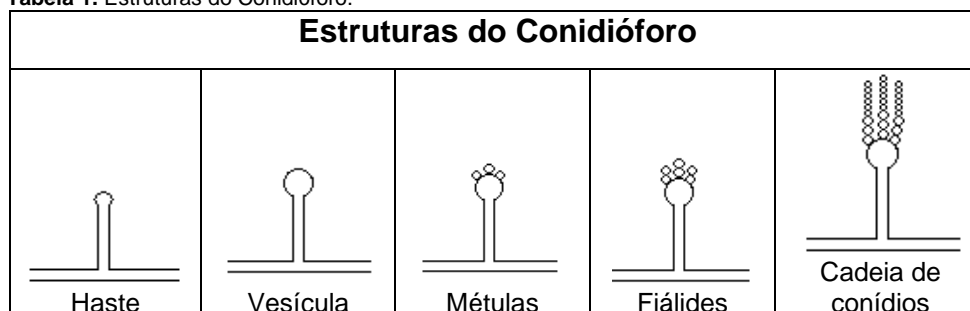
De acordo com ensaios preliminares (Dados não apresentados) foi estabelecida a concentração 0,24% (v/v) dos extratos aquosos de *L. edodes* (EAL) e *P. ostreatoroseus* (EAP) em meio MC sólido, já o controle (CO) foi considerado o tratamento sem presença de extratos no meio de cultura

Análise da Conidiogênese

Os conídios de *A. nidulans* foram coletados com alça e suspensos em 0,01% de Tween 80. A suspensão de conídios foi filtrada em lã de vidro e em seguida 600 conídios foram inoculados sobre a superfície do meio de cultura contendo meio MC sólido e

seus respectivos tratamentos. Sobre o meio de cultura inoculado foram aplicados recortes de 2cm² de membrana de diálise. Os tratamentos foram mantidos em estufa incubadora a temperatura de 37°C e as leituras realizadas de acordo com o tempo necessário para a conidiogênese completa. Assim, a inoculação seguida da incubação marcou o tempo zero de início da conidiogênese e os tempos definidos para leitura foram às 14, 15, 17, 19 e 21 horas após a inoculação. Para leitura a membrana de diálise de cada tratamento e cada tempo definido foi coletada e montada entre lâmina e lamínula e analisada em microscópio óptico. Foi observado o tempo necessário para formação de cada estrutura do conidióforo (Haste, Vesícula, Métulas, Fiálides e Cadeia de conídios) bem como possível interferência dos extratos de cogumelos sobre o programa genético de conidiogênese. Os resultados foram expressos na forma de figuras, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Estruturas do Conidióforo.



Análise do Ciclo Sexual

Os conídios de *A. nidulans* foram inoculados em meio MC sólido. Para induzir à entrada no ciclo sexual as placas foram vedadas propiciando um ambiente de carência de oxigênio. Os tratamentos com extratos de cogumelos e controle sem vedação e com vedação foram mantidos em estufa incubadora com temperatura a 37°C por 21 dias. Diariamente estes tratamentos foram analisados ao microscópio estereoscópico, onde foi observado o tempo (dias) necessário para indução do ciclo sexual por meio do desenvolvimento de Células de Hülle e Cleistotécios. O número de células de Hülle e Cleistotécios por 1mm² da colônia foi determinado por meio da contagem em microscópio estereoscópico, sendo representados como: - ausência, +: < 100, ++: 100-200, +++: 200-500, ++++: >500 (19). O tamanho dos Cleistotécios foi determinado por meio da coleta e análise do diâmetro em

lâmina micrométrica, sendo os resultados expressos como p:>100, m: 100-200 e g:<200µm (20).

Análise Estatística

Os resultados do ciclo sexual foram representados como médias e agrupados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando o programa SISVAR

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A conidiogênese foi observada após 14 horas de incubação (Tabela 2). Para a linhagem normal *biA1methG1* os tratamentos com os extratos aquosos dos cogumelos retardaram o desenvolvimentos das estruturas do conidióforo com atraso na formação das fiálides e na cadeia de conídios em relação ao

controle. Nas linhagens MSE, CLB3 e G422UV o desenvolvimento da conidiogênese nos controles foi mais lento que na linhagem *biA1methG1*. Foi observado atraso acentuado na conidiogênese dos tratamentos com ambos os cogumelos no desenvolvimento das metúlas, fíalides e cadeia de conídios nestas linhagens.

Apesar das linhagens apresentarem diferenças entre si com relação ao tempo de desenvolvimento de cada estrutura do conidióforo, foi possível observar que o tratamento com os extratos aquosos dos cogumelos atrasam a formação destas

estruturas. O período de desenvolvimento do conidióforo é marcadamente expresso por intensa atividade de metabolismo e divisão celular. Este atraso pode estar associado ao retardo na ativação de genes relacionados à formação das estruturas do conidióforo. Muitos cogumelos são capazes de modular as atividades do metabolismo e ciclo celular. Há relatos sobre a ação de cogumelos sobre a modulação do ciclo celular, como *Agaricus blazei* que atua sobre células tumorais por meio da permanência na fase G1 (21) ou por prolongamento da fase S do ciclo celular (22). Mas também é possível que a ação dos extratos de cogumelos ocorra em nível de expressão gênica, inibindo o desenvolvimento e progressão da conidiogênese de *A. nidulans*.

Tabela 2. Conidiogênese das linhagens *biA1methG1*, MSE, CLB3 e G422UV de *A. nidulans* em meio completo (CO) e tratados com extratos aquosos de *L. edodes* (EAL) e *P. ostreatoroseus* (EAP).

Linhagens	Tempo (horas)				
	14 horas	15 horas	17 horas	19 horas	21 horas
<i>biA1methG1</i> - CO					
<i>biA1methG1</i> - EAL					
<i>biA1methG1</i> - EAP					
MSE - CO					
MSE - EAL					
MSE - EAP					
CLB3 - CO					
CLB3 - EAL					
CLB3 - EAP					
G422UV - CO					
G422UV - EAL					
G422UV - EAP					

A análise da indução do ciclo sexual mostrou que cada linhagem responde de maneira diferente para cada tratamento

(Tabela 3), mas todas apresentaram desenvolvimento de conidióforos aos 3 dias de crescimento da colônia.

Tabela 3. Efeito de indução do ciclo sexual (dias) em linhagens de *A. nidulans* sob os tratamentos CO: Controle, COV: Controle vedado, EAL: Extrato aquoso de *L. edodes*, EALV: Extrato aquoso de *L. edodes* vedado, EAP: Extrato aquoso de *P. ostreatoroseus*, EAPV: Extrato aquoso de *P. ostreatoroseus* vedado. Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,005$).

Linhagens	Tratamento	Conidióforos	Células de Hülle	Cleistotécios
		Tempo (dias)		
biA1methG1	CO	3 ^a	-	-
	COV	3 ^a	10 ^b	21 ^c
	EAL	3 ^a	15 ^c	-
	EALV	3 ^a	15 ^c	21 ^c
	EAP	3 ^a	10 ^b	21 ^c
	EAPV	3 ^a	10 ^b	21 ^c
	MSE	CO	3 ^a	-
COV		3 ^a	10 ^b	17 ^b
EAL		3 ^a	-	-
EALV		3 ^a	10 ^b	21 ^c
EAP		3 ^a	14 ^c	21 ^c
EAPV		3 ^a	08 ^a	11 ^a
CLB3		CO	3 ^a	-
	COV	3 ^a	10 ^b	21 ^c
	EAL	3 ^a	-	-
	EALV	3 ^a	10 ^b	16 ^b
	EAP	3 ^a	-	-
	EAPV	3 ^a	10 ^b	21 ^c
	G422UV	CO	3 ^a	15 ^c
COV		3 ^a	10 ^b	17 ^b
EAL		3 ^a	10 ^b	21 ^c
EALV		3 ^a	16 ^c	21 ^c
EAP		3 ^a	15 ^c	17 ^b
EAPV		3 ^a	10 ^b	11 ^a

Em condições experimentais é possível a indução de desenvolvimento sexual por meio da vedação da placa contendo a cultura por propiciar um ambiente de carência de oxigênio. Nestas condições a conidiogênese cessa e tem-se início o ciclo sexual marcado pelo desenvolvimento das Células de Hülle que pode ocorrer em cerca de 40 horas (20) e o cleistotécios em média de 8 a 10 dias dependendo da linhagem (23). Neste estudo foi possível observar que para todas as linhagens o controle vedado desenvolveu Células de Hülle aos 10 dias de incubação, e houve variações no desenvolvimento de cleistotécios entre 17 a 21 dias. Quando comparado os tratamentos e condições foi notado que o melhor tratamento para indução do desenvolvimento de Células de Hülle e Cleistotécios foi o extrato de *P. ostreatoroseus* para as linhagens MSE e G422UV.

Com relação as estruturas do ciclo sexual (Tabela 4), foi possível observar que os extratos de *L. edodes* e *P. ostreatoroseus* proporcionaram aumento na quantidade de cleistotécios na linhagem *biA1methG1*, porém não houve diferenças quanto ao tamanho. Houve aumento na quantidade e tamanho dos Cleistotécios quando comparado ao controle para a linhagem MSE quando tratada com o extrato de *L. edodes*. A linhagem CLB3 foi responsiva ao tratamento com ambos os extratos apresentando aumento na quantidade de Cleistotécios quando comparado ao controle. E a linhagem G422UV foi a mais responsiva ao tratamento com *P. ostreatoroseus*.

O desenvolvimento sexual de *A. nidulans* é iniciado pela indução do fator psi, que inibe a conidiogênese, promovendo o desenvolvimento sexual. Este fator pertence a

uma família de componentes hidroxilados derivados de ácido graxo insaturado e ácido linoléico (20).

Tabela 4. Análise celular do ciclo sexual de linhagens *A. nidulans*. Legenda para número de Células de Hülle e cleistotécios: - ausência, +: < 100, ++: 100-200, +++: 200-500, ++++:>500. Legenda para diâmetro dos Cleistotécios (µm): p:>100, m: 100-200 e g:<200.

Linhagens	Condição	Conidióforos	Células de Hülle	Cleistotécios
biA1methG1	CO	++++	-	-
	COV	+	++++	+p
	EAL	++	++++	-
	EALV	+	++++	++p
	EAP	++	++++	-
	EAPV	+	++++	++p
MSE	CO	++++	-	-
	COV	+	++++	++m
	EAL	++++	-	-
	EALV	+	++++	+++pm
	EAP	+	++++	+++pm
	EAPV	+	++++	+++pm
CLB3	CO	+++	-	-
	COV	+	++++	++g
	EAL	+++	-	-
	EALV	++	++++	+++g
	EAP	+++	-	-
	EAPV	++	++++	+++g
G422UV	CO	+	+++++	+++pm
	COV	+	++++	++++pm
	EAL	+	++++	+++pm
	EALV	+	++++	+++pm
	EAP	+	++++	+++pm
	EAPV	+	++++	+++pmg

A indução da entrada no ciclo sexual apresentada foi devido a indução de um ambiente de carência de oxigênio nas placas, mas foi também influenciada pela presença dos extratos em algumas linhagens. Estes resultados podem ser explicados pela presença de diferentes fontes de carbono nos extratos de *L. edodes* e *P. ostreatoroseus* que podem agir como indutores do ciclo sexual em *A. nidulans* (24). É possível que os extratos dos cogumelos tenham fornecido fontes de carbono adicionais para induzir esse efeito. As análises com os extratos aquosos dos cogumelos *L. edodes* e *P. ostreatoroseus* sugerem a presença de compostos que retardam a conidiogênese a favor da aceleração na entrada no ciclo sexual.

Estes resultados são relevantes e reforçam a necessidade do estudo do efeito destes cogumelos sobre o controle do desenvolvimento do ciclo de vida deste fungo

Considerando que estes cogumelos são muito utilizados na alimentação, bem como na suplementação humana, conhecer os seus efeitos sobre o controle de diferenciação e proliferação celular podem levar a indicação destes nutracêuticos em medicina complementar para grande quantidade de distúrbios de saúde humana.

Marcela Funaki dos Reis, Carmem Lúcia M. S. C. da Rocha.

Endereço para correspondência: *Marcela Funaki dos Reis,*
Rodovia BR 158, KM 207
Campo Mourão - PR
87300-970

Telefone: (44) 3518-2500

E-mail: marcela.funaki@grupointegrado.br

Recebido em 15/03/2013

Revisado em 02/04/2013

Aceito em 19/07/2013

REFERÊNCIAS

- (1) BAO, H.; YOU, S.; Molecular characteristics of water-soluble extracts from *Hypsizygus marmoreus* and their *in vitro* growth inhibition of various cancer cell lines and immunomodulatory function in Raw 264.7 cells, **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.75, n. 5, p. 891-898, 2011.
- (2) YOO, K.D.; PARK, E.S.; LIM, Y.; KANG, S.I.; YOO, S.H.; WON, H.H.; KIM, Y.H.; YOO, I.D.; YOO, H.S.; HONG, J.T.; YUN, Y.P. Clitocybin A, a novel isoindolinone, from the mushroom *Clitocybe aurantiaca*, inhibits cell proliferation through G1 phase arrest by regulating the PI3K/Akt cascade in vascular smooth muscle cells. **Journal Pharmacological Sciences.**, v.118, n.2, p. 171-177, 2012.
- (3) LEE, C.C.; YANG, H.L.; WAY, T.D.; KUMAR, K.J.; JUAN, Y.C.; CHO, H.J.; CHO, H.J.; LIN, K.Y.; HSU, L.S.; CHEN, S.C.; HSEU, Y.C. Inhibition of cell growth and induction of apoptosis by *Antrodia camphorate* in HER-2/neu-over expressing breast cancer cells through the induction of ROS, depletion of HER-2/neu, and disruption of the PI3K/Akt signaling pathway, **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ecam/2012/702857/>>. Acesso em: 20 jan. 2012.
- (4) BHATTARAI, G.; LEE, Y.H.; LEE, N.H.; LEE, I.K.; YUN, B.S.; HWANG, P.H.; YI, H.K. Fomitoid-K from *Fomitopsis nigra* induces apoptosis of human oral squamous cell carcinomas (YD-10B) via mitochondrial signaling pathway, **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.35, n.10, p. 1711-1719, 2012.
- (5) FINIMUNDY, T.C.; GAMBATO, G.; FONTANA, R.; CAMASSOLA, M.; SALVADOR, M.; MOURA, S.; HESS, J. HENRIQUES, J.A.; DILLON, A.J.; ROESCH-ELY, M. Aqueous extracts of *Lentinula edodes* and *Pleurotus sajor-caju* exhibit high antioxidant capability and promising in vitro antitumor activity, **Nutrition Research**, v. 33, n. 76-80, 2012.
- (6) MAJI, P.K.; SEN, IK.; DEVI, K.S.; MAITI, T.K.; SIKDAR, S.R.; ISLAM, S.S. Structural elucidation of a biologically active heteroglycan isolated from a hybrid mushroom of *Pleurotus florida* and *Lentinula edodes*, **Carbohydrate Research**, v.7, n. 368, p. 22-28, 2012.
- (7) IKE, K.; KAMAHEYAMA, N.; ITO, A.; IMAI, S. Induction of a T-Helper 1 (Th1) immune response in mice by an extract from the *Pleurotus eryngii* (Eringi) mushroom, **Journal of Medicinal Food**, v.15, n. 12, p. 1124-1128, 2012.
- (8) OLIVEIRA, U.D., MARINS, J.F.; CHIUCHETTA, S.J. R. Avaliação do ciclo

celular de *Aspergillus nidulans* exposto ao extrato da planta *Copaifera officinalis* L, **Sabios**, v. 1, n. 2, p. 42-47, 2006.

(9) TIMBERLAKE, W.E.; CLUTTERBUCK, A.J. Genetic regulation of conidiation. In: MARTINELLI, S.D.; KINGHORN, J.R. (Org.). **Aspergillus: 50 years on**. New York: Elsevier, 1994. p. 383-327.

(10) ELLIOT, C.G. The cytology of *Aspergillus nidulans*. **Genetical Research**, v. 1, p. 462-76, 1960.

(11) PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MACDONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v. 5, p. 141-238, 1953.

(12) BENJAMIN, C. R. Ascocarps of *Aspergillus* and *Penicillium*, **Mycologia**, v. 47, p. 669-87, 1955.

(13) E YAGER, L.N. Early developmental events during asexual and sexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. In: BENNETT, J.W.; KLICH, M.A. (Org.). **Aspergillus: biological and industrial applications**. Massachusetts: Butterworth, 1992. p. 19-42.

(14) TIMBERLAKE, W.E. Developmental gene regulation in *Aspergillus nidulans*. **Developmental Biology**, v. 78, p. 497- 510, 1980.

(15) MILLER, B. L. The developmental genetics of asexual reproduction in *Aspergillus nidulans*. **Seminars on Developmental Biology**, v.1, p. 207-19, 1990.

(16) REIS, M. F. **Análise citológica e genética do efeito de extrato aquoso de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler e *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. no desenvolvimento de *Emericella (=Aspergillus) nidulans* (Eidam) Vuill.** 2009. 77f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.

(17) CLUTTERBUCK, A.J. *Aspergillus nidulans*. In: KING, R.C., ed. **Handbook of Genetics**. New York: Plenum Publishing, 1974. p. 447-510.

(18) ROCHA, C. L. M. S. C. R. **Caracterização citológica, genética e molecular de um mutante para a conidiogênese em *Aspergillus nidulans***. 1997. 203f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

(19) KIM, H.S.; HAN, K.Y.; KIM, K.J.; HAN, D.M.; JAHNG, K.Y.; CHAE, K.S. The veA gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*, **Fungal Genetics and Biology**, v. 37, p. 72-80, 2002.

(20) CHAMPE, S. P. NAGLE, D. L.; YAGLE, L. N. Sexual sporulation. In: MARTINELLI, S. D.; KINGHORN, J. L. (Org.). **Aspergillus: 50 years on**. New York: Elsevier, 1994, p. 429-454.

(21) JIN, C. Y.; MOON, D. H.; CHOI, Y. H.; LEE, J. D.; KIM, G. Y. Bcl-2 and caspase-3 are major regulators in *Agaricus blazei*-induced human leukemic U937 cell apoptosis through dephosphorylation of akt. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p. 1432-1437, 2007.

(22) KAWAMURA, M. e KASAI, H. Delayed cell progression and apoptosis induced by hemicellulase-treated *Agaricus blazei*. **Advance Access Publication**, v. 4, p. 83-94, 2007.

(23) BARACHO, I.R. **Contribuição ao estudo da sexualidade em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter**. 1969. 67 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade de Campinas, Campinas, 1969.

(24) HAN, K.P. Molecular genetics of *Emericella nidulans* sexual development, **Mycology**, n.37, v. 3, p. 171-182, 2009.