



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARIANA CALDAS MINARI OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE POLISSACARÍDEO E
FRAÇÕES DE *AGARICUS brasiliensis* CONTRA O
HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1**

Londrina
2007

MARIANA CALDAS MINARI OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE POLISSACARÍDEO E
FRAÇÕES DE *AGARICUS brasiliensis* CONTRA O
HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Rosa Elisa Carvalho Linhares

Londrina
2007

MARIANA CALDAS MINARI OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE POLISSACARÍDEO E
FRAÇÕES DE *AGARICUS brasiliensis* CONTRA O
HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Rosa Elisa Carvalho Linhares
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Juliana Galera Castilho
Instituto Pasteur

Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 05 de março de 2007.

DEDICATÓRIA

*À DEUS por iluminar sempre
o meu caminho e enchê-lo
de anjos.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer todas as pessoas que tornaram possível a realização deste trabalho, em especial:

À minha orientadora, Professora Rosa Elisa Carvalho Linhares pelo constante incentivo, com toda sua energia positiva, e confiança durante a execução deste trabalho.

Ao Professor Carlos Nozawa, agradeço pela sua paciência, seus ensinamentos e companheirismo.

À todos os professores do Programa de Pós-graduação em Microbiologia pelo conhecimento transmitido.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, em especial a Valdelice e Jussêvania pelo apoio na organização do laboratório.

Aos colegas de Laboratório, Flávio, Alessandra, Bárbara, Vinícius, Daniel, Kristie, Lígia e Fabrício por compartilharam os momentos alegres e difíceis do laboratório.

Aos meus pais e irmãos pelo apoio e amor durante todos os momentos.

Ao Alex pelo seu amor e todo seu carinho.

Mariana Minari

OLIVEIRA, Mariana Caldas M. **Atividade antiviral de polissacarídeo e frações de *Agaricus Brasiliensis* contra o herpesvírus bovino Tipo 1.** 2007. 47f.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

Os produtos naturais constituem uma fonte inesgotável de substâncias com atividades farmacológicas promissoras, incluindo ação antiviral. Neste trabalho, foi avaliado o potencial antiviral do polissacarídeo (PLS) e frações de *Agaricus brasiliensis* na replicação do herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) em células HEp-2. Foi demonstrado que o PLS e as frações (F1-F4) não possuem nenhum efeito citotóxico até a concentração de 2000 µg/ml. A atividade antiviral destes compostos foi analisada pelo tratamento das células antes, durante e depois da infecção viral através de ensaio de redução de plaque. As frações tiveram pouco efeito na replicação de BHV-1, porém, PLS suprimiu significativamente a replicação em 67,9% com uma concentração inibitória (IC₅₀) de 160 µg/mL quando adicionado no tempo 0 hora. O PLS também inibiu o número de células fluorescentes em 61%, quando adicionado ao mesmo tempo em que o vírus e na concentração de 400 µg/ml. Sugerimos então que PLS inibe a replicação viral interferindo nos estágios iniciais da penetração. Estudos adicionais devem ser realizados a fim de se determinar os prováveis mecanismos de ação desta substância.

Palavras-chave: *Agaricus brasiliensis*. Agentes antivirais. Microbiologia veterinária. Vírus do herpes em animais.

OLIVEIRA, Mariana Caldas M. **Atividade antiviral de polissacarídeo e frações de *Agaricus Brasiliensis* contra o herpesvírus bovino Tipo 1.** 2007. 47f.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

Natural products are an inexhaustible source of compounds with promising pharmacological activities, including antiviral action. In the present study, the potential antiviral of a polysaccharide (PLS) and fractions from *Agaricus brasiliensis* were investigated in the replication of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) in HEp-2 cell cultures. It was shown that PLS and the fractions (F1-F4) had no cytotoxic effect in HEp-2 cell cultures up to the concentration of 2000 µg/ml. The antiviral activity of these compounds was assayed by the treatment of the cells before, during and after virus infection and evaluated by plaque reduction assay. The fractions had little effect in the replication of BHV-1, however, PLS suppressed the replication significantly with an inhibitory concentration (IC₅₀) value of 160 µg/ml. PLS also inhibited the number of fluorescent cells in 61%, at 400 µg/ml. Although the mechanism has yet to be defined, our work suggested that PLS inhibits viral replication by interfering with the early events of viral penetration. Additional studies are required to better understanding of PLS mechanism of action.

Keywords: *Agaricus brasiliensis*. Antiviral agents. Veterinary Microbiology. Herpes virus in animals.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 HERPES VÍRUS BOVINO TIPO 1	10
2.2 ANTIVIRAIS SINTÉTICOS	13
2.3 ANTIVIRAIS NATURAIS.....	16
2.3.1 BASIDEOMICETOS.....	17
3 OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVO GERAL.....	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
REFERÊNCIAS	25
ARTIGO – ANTIVIRAL PROPERTY OF A POLYSACCHARIDE AND FRACTIONS FROM THE <i>AGARICUS BRASILIENSIS</i> FOR BOVINE HERPESVIRUS TYPE 1	31

1 INTRODUÇÃO

Os vírus estão envolvidos em uma grande variedade de doenças agudas, crônicas e degenerativas, sendo responsáveis por mais de 60% das doenças causadas ao homem. A luta contra as infecções virais é difícil, pois a replicação viral é um processo intracelular, estando intimamente relacionada ao metabolismo das células infectadas.

As pandemias do vírus da gripe e do vírus da imunodeficiência humana (HIV) demonstram a enorme consequência das infecções não controladas. Porém, estas doenças representam só uma pequena parte do problema. Da população ocidental sexualmente ativa, 25-35% estão infectados com herpes genital, e nos EUA, 30% da apresentam verrugas genitais. Há 350 milhões de portadores do vírus da hepatite de B (VHB) no mundo e 2% da população do mundo são infectados com o vírus da hepatite C (VHC). A expectativa é que neste século as doenças virais venham a aumentar (JONES, 1998).

As viroses são responsáveis por alta taxa de morbidade e mortalidade no mundo, e o aumento crescente da resistência dos vírus aos antivirais tem sido um fator agravante no tratamento destas infecções. A falta de vacinas ou terapias para muitas infecções justificam a necessidade de desenvolvimento de novas drogas antivirais. Existe um vasto potencial neste campo de pesquisa no Brasil, visando o aproveitamento de produtos naturais com valor curativo e que há muito tempo são utilizados pela medicina popular como medicamentos antibacterianos, antifúngicos, antiinflamatórios, antitumorais e que agora podem ser testados quanto ao seu potencial como antiviral.

A busca de novos agentes farmacologicamente ativos, através da triagem de fontes naturais, tem levado à descoberta de muitos fármacos úteis clinicamente para o tratamento de várias doenças humanas (CRAGG *et al.*, 1997). Representando uma fonte inesgotável de compostos com grande diversidade de estruturas químicas, os produtos naturais apresentam algumas atividades farmacológicas, dentre elas a antiviral, e oferecem novas opções de potenciais agentes terapêuticos (HARVEY, 1999). A partir destes produtos podem ser retiradas substâncias ativas, cuja produção na forma sintética seria muito dispendiosa, ou ainda, podem ser extraídos compostos básicos que com modificações estruturais,

tornam-se mais eficazes e menos tóxicos, ou então, podem ser utilizados como protótipos para fármacos sintéticos, que possuam atividades farmacológicas semelhantes às originais (NIELSEN, 2002).

O desenvolvimento e a utilização de fármacos antivirais a partir de produtos naturais, que sejam capazes de prevenir uma infecção ou de combatê-la, têm despertado o interesse das indústrias farmacêuticas. Entretanto, apesar das inúmeras pesquisas realizadas nos últimos 50 anos, a disponibilidade de drogas antivirais permanece insuficiente, devido principalmente, às suas restrições de uso, dentre as quais podem ser citados o reduzido espectro de atividade, a utilidade terapêutica limitada e os vários graus de toxicidade (STROHL, 2002). Inúmeros esforços têm sido feitos para avaliar a atividade antiviral de produtos naturais, com a finalidade de isolar e caracterizar novos compostos, os quais poderiam inibir a replicação viral ou servir como modelo de novas moléculas (DE CLERCQ, 2002; 2004). Além disso, a descoberta de novos compostos antivirais se faz necessária, principalmente, para o tratamento de doenças responsáveis por alta morbidade e mortalidade, tais como aquelas causadas pelos vírus HIV, vírus influenza, vírus VHB, vírus VHC, vírus causadores de febres hemorrágicas e herpesvírus (VISALLI, 2003).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HERPES VÍRUS BOVINO TIPO 1

A família *Herpesviridae* é grande, diversa e inclui três subfamílias designadas de *Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae*, e *Gamaherpesvirinae*. O genoma consiste de DNA linear com 100 a 250 kb e está localizado em um core central protegido por um capsídeo icosaédrico. Entre o envelope lipídico e o capsídeo, há uma camada denominada de tegumento composta por várias proteínas (Fig. 1), (ROIZMAN; PELLETT, 2001).

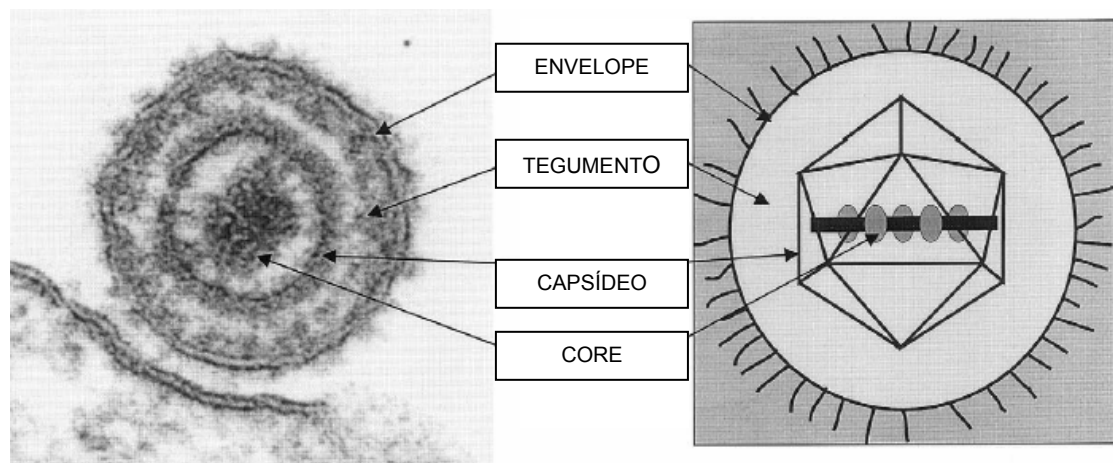


Figura 1 – Morfologia dos herpesvírus (METTENLEITER, 2003).

A maioria dos alfaherpesvírus pode infectar múltiplas linhagens celulares *in vitro* e *in vivo* incluindo células epiteliais que representam o local primário da replicação viral. Entretanto, alfaherpesvírus também exibem um importante neurotropismo. Penetram nos nervos periféricos, concomitante ou subsequente à multiplicação nas células epiteliais. As exigências para entrada em neurônios são aparentemente semelhantes à infecção de células em culturas. Após a ligação dos vírus extracelulares a célula alvo (adsorção), a entrada (penetração) é mediada por fusão do envelope e a membrana celular, em pH neutro (SPEAR, 1993).

Os capsídeos intracitoplásmáticos são transportados por microtúbulos até os poros nucleares, onde seu DNA é liberado. Os eventos intranucleares da infecção de herpesvírus incluem a transcrição através de RNA polimerase celular, a replicação do seu genoma através de enzimas codificadas pelos vírus como a DNA polimerase, primase e helicase, tradução e a montagem com empacotamento do DNA replicado em novos capsídeos (ROIZMAN; KNIPE, 2001).

Os capsídeos com DNA deixam o núcleo por brotamento através da membrana nuclear interna onde adquirem o envelope primário. Até o momento duas hipóteses para a aquisição do envelope são discutidas. O vírus adquire o envelope com as glicoproteínas na membrana nuclear sendo transportado por vesículas exocíticas até a membrana citoplasmática onde é liberado por exocitose. Na segunda hipótese o nucleocapsídeo é desenvolvido ao atravessar a membrana nuclear externa, e o envelope é adquirido em membranas de Golgi ou membrana celular (MIRANDA, 2002).

Os herpesvírus possuem características biológicas comuns, como a alta incidência de infecções assintomáticas e o estabelecimento de infecções latentes que podem ser reativadas causando novos episódios da doença. Os herpesvírus humanos exibem estas características assim como também apresentam diversidade biológica e patogênica. As três subfamílias incluem: os alfa herpesvírus, exemplos herpes vírus simplex tipo 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2), e o vírus varicela-zoster (VZV); beta herpesvírus, citomegalovírus (CMV) e herpesvírus humano 6 e 7; e gama herpesvírus, exemplos vírus Epstein-Barr (EBV) e herpesvírus humano 8 (HHV-8). HSV-1 e HSV-2 são responsáveis geralmente por lesões mucocutâneas localizadas, mas também podem causar meningites e encefalites. O VZV causa doença sistêmica com lesões de pele durante infecção primária (catapora) e herpes-zoster. Todos os três vírus estabelecem infecções latentes em neurônios e podem ser reativados. Os beta herpesvírus causam infecções principalmente assintomáticas em indivíduos imunocompetentes e podem estabelecer infecções latentes em vários tipos de células, inclusive leucócitos. O EBV é a causa principal de mononucleose infecciosa e está associado com várias malignidades, inclusive o linfoma de Burkitt, doença de Hodgkin, outros linfomas, e carcinoma nasofaríngeo. HHV-8 está associado com sarcoma de Kaposi, doença multicêntrica de Castleman, e linfoma de efusão primária (SPEAR; LONGNECKER, 2003).

O Herpesvírus bovino 1 (BHV-1) pertence à subfamília *Alphaherpesvirinae* e compartilha várias propriedades biológicas com HSV-1 e HSV-2. A infecção com BHV-1 pode causar conjuntivites, pneumonia, desordens genitais (vulvovaginite nas fêmeas e balanopostite nos machos), abortos, e uma infecção no trato respiratório denominado de rinotraqueíte (TIKOO, 1995). A rinotraqueíte pode levar à imunossupressão do gado infectado, acarretando conseqüentemente infecções bacterianas secundárias como pneumonias associadas com *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, e *Haemophilus somnus* (BOWLAND; SHEWEN, 2000). Em animais adultos podem apresentar-se na forma subclínica ou causar redução da produção de leite, porém, resulta freqüentemente em fertilidade reduzida. O BHV-1 causa problemas mais severos em animais jovens inclusive em animais recém-nascidos (VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2006).

Como todos os alfa herpesvírus, o BHV-1 permanece em estado de latência, alojando-se nos gânglios nervosos, principalmente no trigêmeo e sacral, podendo ser reativado em situações estressantes como no parto, transporte do gado, vacinações ou com a administração prolongada de corticóides (ACKERMANN *et al.*, 1982).

As enfermidades causadas pelo BHV-1 provocam sérios prejuízos à pecuária nacional, especialmente em bovinos de exploração leiteira, onde há queda da produção de leite e diminuição no índice de fertilidade. Há também restrições ao comércio internacional de animais vivos e de seus produtos como sêmen e embriões (LEMAIRE *et al.*, 1994).

O BHV-1 é excretado pelas secreções respiratórias, oculares, genitais e sêmen de bovinos infectados. A transmissão ocorre principalmente por contato direto através de aerossóis, monta natural, inseminação artificial ou por contato indireto através de fômites (LEMAIRE *et al.*, 1994).

A vacinação de bovinos minimiza as manifestações clínicas da doença, porém, as vacinas disponíveis atualmente não impedem a latência do BHV-1 e não eliminam o vírus já instalado. Um animal infectado pelo BHV-1, mesmo vacinado, poderá reativar e eliminar o vírus (LEMAIRE *et al.*, 1994).

A infecção com BHV-1 custa à pecuária pelo menos U\$500 milhões por ano nos Estados Unidos. Embora vacinas com vírus atenuado estejam disponíveis, há a possibilidade deste estabelecer infecções latentes, podendo,

durante a reativação, sofrer mudança para a forma patogênica, causando doença em animais jovens e abortos em vacas (BOWLAND; SHEWEN, 2000).

2.2 ANTIVIRAIS SINTÉTICOS

As doenças virais eram intratáveis há 40 anos atrás e a verdadeira origem do desenvolvimento das drogas antivirais é marcada a partir de 1950. O primeiro composto antiviral usado foi a tiosemicarbazona, um antimicrobiano usado para tratamento da tuberculose, com atividade contra o vírus vacinia. A partir de 1960, a metisazona, derivado da tiosemicarbazona, passou a ser usada na profilaxia e tratamento da varíola em humanos (JONES, 1998).

A infecção pelo vírus herpes simples (HSV) teve um papel histórico extremamente importante no desenvolvimento de quimioterapia antiviral, pois foi uma das primeiras infecções que puderam ser tratadas com compostos antivirais. O primeiro destes foi o análogo de nucleosídeo 5-iodo-2-deoxiuridina (idoxiuridina; IDU), seguido por outros como o arabinosídeo adenosina (Ara-A) e trifluorotimidina (TFT) (FIELD *et al.*, 2006). Estes compostos apresentavam baixa toxicidade seletiva e foram designados coletivamente como "primeira geração" de nucleosídeos (Fig 2). Junto com o análogo de pirofosfato (foscarnet, PFA), a eficácia de todos estes compostos foi validada em cultura de células e em modelos de infecção animal antes do uso em humanos.

O Aciclovir (ACV) foi um dos primeiros antivirais da "segunda geração" de análogos de nucleosídeo a apresentar alta toxicidade seletiva para os herpesvírus e segurança notável para administração oral. A eficácia do ACV foi estabelecida em uma variedade de modelos de infecção para várias síndromes causadas pelo HSV (FIELD *et al.*, 2006).

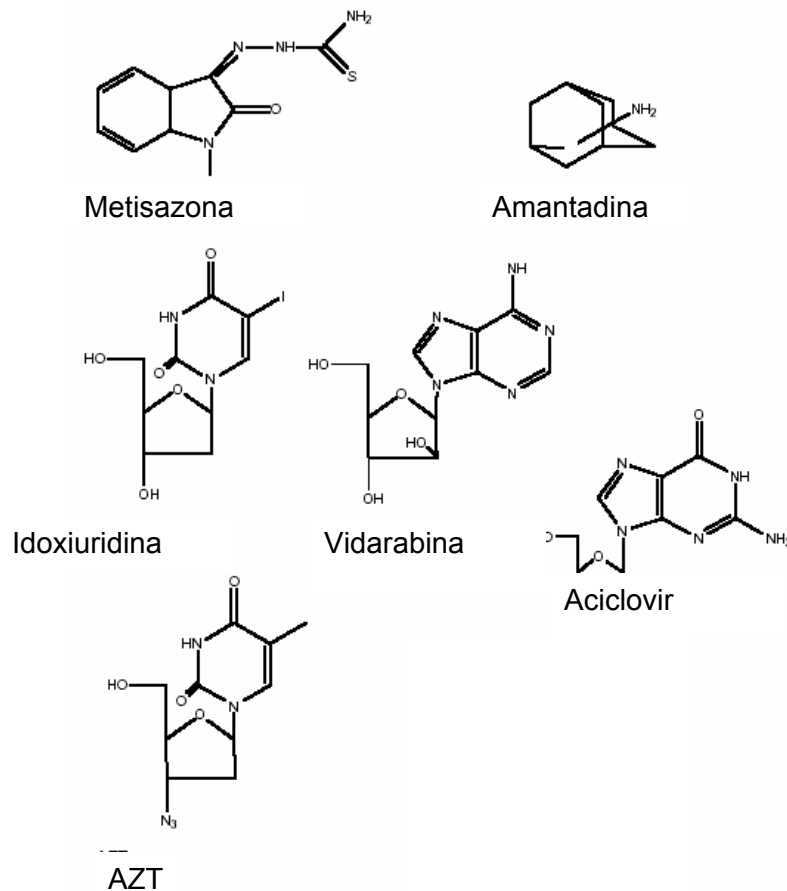


Figura 2 – Exemplo dos primeiros antivirais

Com o conceito de terapia antiviral firmemente estabelecido, nos anos oitenta o foco de pesquisa se rendeu a outros vírus como HIV, vírus de hepatite e vírus respiratórios; assim os herpesvírus deixaram de ser dominantes nesse campo, embora muitos outros compostos tenham sido desenvolvidos. Estes incluem outros análogos de nucleosídeos, por exemplo brivudina; penciclovir (PCV); o análogo da deoxicidina monofosfato (cidofovir); pró-drogas de nucleosídeos como o valaciclovir e famciclovir. Todos estes compostos tem como alvo a DNA polimerase dos herpesvírus (DE CLERCQ, 2005). Novos alvos de drogas estão sendo explorados, dentre estes as enzimas ribonucleotídeo redutase, proteases, e também potentes inibidores da helicase/ primase (FIELD *et al.*, 2006).

Na década passada, somente cinco drogas foram autorizadas para o tratamento de infecções virais. Desde então, o maior conhecimento dos ciclos de replicação viral, incitado em particular pela necessidade de combater o HIV, resultou

na descoberta e validação de vários alvos para intervenção terapêutica, (Quadro 1), (DE CLERCK, 2002).

ALVOS	VÍRUS	COMPOSTOS APROVADOS	COMPOSTOS EM DESENVOLVIMENTO
Inibição da adsorção	HIV, HSV, CMV, RSV e outros vírus envelopados		Polissulfatos, polisulfonatos, policarboxilatos, polioxometalatos, zintevir, albuminas carregadas negativamente
Inibição da fusão vírus-célula	HIV, RSV e outros paramixovírus		HIV: AMD3100, TAK779 e derivados do T20
Inibidores da DNA polimerase viral	Herpesvírus (HSV-1, -2, VSV, CMV, EBV, HHV-6,-7,-8)	Aciclovir, valaciclovir, ganciclovir, valganciclovir, penciclovir famciclovir, brivudin, foscarnet	Análogo de nucleosídeo furopirimidina bicíclica, A5021, ciclohexanilguanina
Inibidores da transcriptase reversa	HIV	NRTIs: zidovudina, didanosina, zalcitabina, stavudina, lamivudina, Abacavir NNRTIs: nevirapina, delavirdina, efavirenz	Emtricitabina, amdoxovir Emivirina, UC781, DPC083, TMC125 (R165335)
Fosfanato de análogos de nucleosídeo acíclico	Vírus DNA (polioma-, papiloma-, herpes-, adeno- e poxvíruses), HIV, HBV	CMV: cidofovir HIV: tenofovir	HBV: adefovir
Inibidores do processo de síntese de RNA	HIV, HCV		HIV: atazanavir, mozenavir, tipranavir Rínovírus humano: AG7088
Inibidores de proteases	HIV, herpesvírus, rínovírus, HCV	HIV: saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir	HIV: atazanavir, mozenavir, tipranavir Rínovírus humano: AG7088
Inibidores da neuraminidase	Influenza A e B	Zanamivir, oseltamivir	RWJ270201
Inibidores da monofosfato desidrogenase	HCV e RSV	Ribavirina	Acido micofenólico, EICAR, VX497

Quadro 1 – Antivirais aprovados e em desenvolvimento e seus respectivos alvos (DE CLERCK, 2002)

Entre as 40 drogas antivirais que foram autorizadas formalmente para uso clínico, 20 são usadas no tratamento do HIV. As outras são indicadas para o tratamento das infecções por herpesvírus (por exemplo, vírus herpes simples, vírus varicela-zoster e o citomegalovírus), vírus da hepatite B, vírus da hepatite de C ou vírus da gripe (DE CLERCK, 2005).

Os recentes esforços têm focado o desenvolvimento de terapias antivirais para vírus que já se mostraram sensíveis e também para infecções que, no momento, nenhuma droga antiviral foi formalmente aprovada (ex. vírus do papiloma humano, adenovírus, herpesvírus humano 6, poxvírus, coronavírus e vírus da febre hemorrágica) (DE CLERCK, 2005).

2.3 ANTIVIRAIIS NATURAIS

Uma grande diversidade de compostos químicos está presente na natureza entre os fungos, fauna e flora marinha, bactérias e plantas. Desde muito tempo, as plantas medicinais são utilizadas para o tratamento de doenças infecciosas, e na maioria dos casos sem um conhecimento científico. Entretanto, há um interesse em se comprovar cientificamente a ação dos compostos derivados das plantas medicinais (VERMANI; GARG, 2002).

O primeiro trabalho com extratos de plantas foi realizado em 1952 na Inglaterra, onde se testou a eficácia de 228 extratos de plantas contra o vírus influenza A, sendo que destas 12 foram ativas (CHANTRILL *et al.*, 1952).

Em 1965, Kucera *et al.* demonstraram a ação inibitória do extrato aquoso de *Melissa officinalis* sobre os vírus da doença de Newcastle, vaccinia e herpes simplex, inoculados em cultura de células e ovos embrionados. Os autores sugeriram que a ação do extrato era devido à presença de taninos. Muitas outras substâncias como os alcalóides, proteínas, saponinas, flavonóides também já foram encontradas em extratos de plantas e apresentaram potencial antiviral (JASSIM; NAJI, 2003).

Hoof *et al.* (1984) estudando plantas medicinais africanas demonstraram a atividade antiviral de uma série de flavonas obtidas do extrato de

Euphorbia grantii. Este extrato apresentou um pronunciado efeito inibidor sobre os picornavírus e o vírus da estomatite vesicular.

Vários fitoquímicos ativos contra herpesvírus têm sido descritos, dentre eles um peptídeo isolado de *Melia azedarach* chamado meliacina, que apresentou atividade antiviral contra vírus envelopados inibindo a replicação de HSV-1 e HSV-2 quando adicionado antes ou depois da infecção, porém não apresentou atividade virucida (VILLAMIL *et al.*, 1995).

O trabalho mais amplo realizado no Brasil foi de Simões *et al.* (1999), que avaliaram a atividade antiviral de 54 plantas medicinais do sul do Brasil contra cinco tipos de vírus (HSV-1, HSV-2, poliovírus tipo 2, adenovírus tipo 2 e VSV). Cerca de 55% das plantas testadas apresentaram atividade contra um ou mais vírus.

Khan *et al.* (2005) avaliaram a atividade antiviral de 3 plantas medicinais (*Hemidesmus indicus*, *Paederia foetida*, *Shorea robusta*) de Bangladesh contra 38 linhagens de HSV, sendo 18 linhagens resistentes ao aciclovir e 20 linhagens sensíveis. A atividade antiviral foi efetiva tanto para as linhagens sensíveis como para as resistentes. O mecanismo de ação foi atribuído a forte inibição da ligação do HSV aos receptores celulares.

2.3.1 Basidiomicetos

O reino dos fungos, com mais de um milhão e meio de espécies, algumas delas microscópicas, é ainda quase desconhecido pela ciência. Apesar do pouco conhecimento que se tem sobre os fungos, reconhece-se que entre eles há muitos que já se tornaram imprescindíveis para a saúde humana, uma vez que contribuem de forma decisiva para a preservação da diversidade biológica do nosso planeta (SHIBATA; DEMIATA, 2003).

A estimativa do número de fungos na Terra varia de 500.000 a 9.9 milhões de espécies, destas somente 80.060 são conhecidas. O número de cogumelos é calculado em 140.000, e talvez só 10% são conhecidos. Entretanto, das 14.000 espécies, aproximadamente 50% são comestíveis e aproximadamente 700 possuem propriedades farmacológicas significantes (WASSER, 2002).

De acordo com Chang e Miles (1992) o termo “cogumelo” quer dizer: “um macrofungo com distinto corpo de frutificação grande o bastante para ser visto a olho nu e ser escolhido à mão”. O número de fungos filamentosos que se inserem nesta definição está em torno de pelo menos 14.000 e talvez alcancem os 22.000 (HAWKSWORTH, 2001). Os cogumelos são um grupo especial de fungos macroscópicos que não possuem clorofila e requerem um substrato para sua absorção. Produzem enzimas que degradam complexos orgânicos e assim absorvem as substâncias solúveis. Do ponto de vista taxonômico, muitos basidiomicetos e algumas espécies de ascomicetos pertencem ao grupo dos cogumelos (CHANG; MILES, 1989).

Aproximadamente 60% dos fungos descritos estão nos trópicos. A maioria dos cogumelos também está nos trópicos, especialmente as espécies que formam ectomicorrizas com árvores nativas. Calcula-se que nas áreas tropicais, 22-55% (em alguns casos até 73%) das espécies de cogumelo ainda não foram descritas. (HAWKSWORTH, 2001).

A prática de usar cogumelos na medicina tradicional chinesa data desde a antiguidade e está registrada em antigos manuscritos. O aumento na pesquisa científica e médica nos últimos anos e a crescente publicação nesta área, especialmente no Japão, na Coréia e na China, e mais recentemente no EUA, está confirmando a eficácia medicinal e identificando novas moléculas bioativas (SMITH *et al.*, 2002).

Em muitos países, especialmente no oriente, os extratos são reconhecidos como tendo grandes benefícios medicinais. Os cogumelos comestíveis que apresentam propriedades medicinais ou funcionais incluem espécies do gênero *Lentinus*, *Hericium*, *Grifola*, *Flammulina*, *Pleurotus* e *Tremella* (CARBONERO *et al.*, 2006). Das espécies conhecidas, as mais populares são *Agaricus bisporus* (cogumelo branco), *Lentinus edodes* (Shitake ou cogumelo japonês), *Pleurotus species* (cogumelo ostra), *Volvariella volvacea* (cogumelo palha), *Flammulina velutipes* (cogumelo de inverno) e *Auricularia polytricha* (cogumelo orelha de judeu), (WALDE *et al.*, 2006).

O consumo de cogumelos no Brasil ainda é muito pequeno em relação ao dos povos europeu e asiático. Entretanto, nos últimos anos, a procura por cogumelos comestíveis vem aumentando e ganhando destaque, em virtude do seu sabor refinado, valor nutritivo e, ainda, pelo potencial medicinal. Dentre as espécies

cultivadas, destaca-se o *Agaricus brasiliensis* que, devido ao fato de ser relacionado como um produto com propriedades medicinais, tem despertado grande interesse por parte das comunidades médica e científica (SHIBATA; DEMIATA, 2003).

Os avanços na tecnologia química têm permitido o isolamento e a purificação de alguns compostos, especialmente os polissacarídeos que possuem forte atividade imunomoduladora e antitumoral (CARBONERO *et al*, 2006). Outros compostos incluem as lectinas, os polissacaropeptídeos, enzimas e pequenas moléculas que podem ter atividade antitumoral, antiproliferativa, imunomodulatória, hipoglicêmica e hipolipêmica (WANG *et al.*, 2000).

Os polissacarídeos e seus derivados sulfatados têm atraído a atenção devido a sua diversa atividade biológica. Vários polissacarídeos solúveis em água com atividade antitumoral são obtidos do micélio ou esclerótida do fungo, e são substâncias caracterizadas como moduladoras da resposta biológica (TAO *et al* 2006).

Alguns polissacarídeos solúveis apresentam pouca bioatividade, enquanto que os seus derivados sulfatados apresentam alta atividade antitumoral e/ou antiviral. Tanto os polissacarídeos naturais como os sulfatados artificialmente têm mostrado atividade *in vitro* contra vírus envelopados como o HIV-1. As interações iônicas dos polissacarídeos sulfatados com as proteínas são responsáveis por essa atividade, um exemplo dessa interação são os polissacarídeos sulfatados que se ligam fortemente aos vírions de HIV e inibem sua associação com os receptores CD4 dos linfócitos T (TAO *et al.*, 2006).

Os polissacarídeos representam uma classe de macromoléculas estruturalmente diversa, são polímeros de monossacarídeos ligados por ligações glicosídicas. É notável que, comparado com outros biopolímeros como proteínas e ácidos nucleicos, os polissacarídeos possuem a maior capacidade de “carregar” informações biológicas, pois têm grande potencial de variabilidade estrutural. Os nucleotídeos dos ácidos nucleicos e os aminoácidos das proteínas podem se interconectar de uma só maneira, enquanto que, as unidades de monossacarídeos dos polissacarídeos podem se interconectar em vários pontos para formar uma ampla variedade de estruturas ramificadas. Este enorme potencial de variabilidade estrutural confere a flexibilidade necessária para regular as várias interações de células dos organismos mais desenvolvidos (CARBONERO *et al* 2006; SHARON; LIS 1993).

Os polissacarídeos bioativos isolados do corpo de frutificação e do micélio são β -D glucanas solúveis em água com cadeias de heterossacarídeos de xilose, manose, galactose e ácido urônico ou β -D glucanas complexadas a proteínas (MIZUNO, 1999).

Os efeitos antivirais descritos para o extrato dos cogumelos como também para os compostos isolados, podem ser devido à inibição direta de enzimas virais, da síntese de ácido nucléico ou adsorção e penetração nas células de mamíferos. Estes efeitos antivirais são exibidos principalmente por pequenas moléculas. Os efeitos antivirais indiretos são resultados da imunoestimulação pelos polissacarídeos ou outras moléculas complexas (BRANDT; PIRAINO, 2000).

Devido a todo potencial descrito, os cogumelos representam uma fonte inexplorada e poderosa para o desenvolvimento de novas drogas farmacêuticas (WASSER, 2002). O quadro 2 descreve diversos basidiomicetos que apresentam propriedades antivirais.

AUTOR	BASIDIOMICETO	FRAÇÃO COMPOSTO	ATIVIDADE DESCRITA
COLLINS <i>et al.</i> , 1997	<i>Coriolus versicolor</i>	Polissacaropeptídeo	Inibe a interação da gp 120 do HIV com o receptor CD4, a transcriptase reversa, e as glicohidrolases responsáveis pela glicolisação viral.
ICHIMURA <i>et al.</i> , 1998	<i>Fuscoporia obliqua</i>	Lignina (extrato aquoso)	Inibe a protease do HIV - 1.
EO <i>et al.</i> , 2000	<i>Ganoderma lucidum</i>	Proteína ligada a polissacarídeo	Inibe a ligação e penetração dos vírus HSV-1 e 2 em células Vero.
PIRAINO & BRANDT <i>et al.</i> , 1999	<i>Rozites caperata</i>	Proteína RC-183	antiviral para vírus varicela-zoster, influenza A e vírus sincicial respiratório
WANG & NG, 2001	<i>Flammulina velutipes</i>	Proteína velutina	Inibe a transcriptase reversa do HIV-1 e β -glicuronidase e glicosidase.
LEE <i>et al.</i> , 2002	<i>Antrodia camphorata</i>	Polissacarídeo	Efeito antiviral para o vírus da hepatite B
NGAI & NG, 2003	<i>Lentinus edodes</i>	Proteína Lentina	Inibe a transcriptase reversa do HIV 1.
WANG & NG, 2004	<i>Tricholoma giganteum</i>	Enzima lacase isolada do corpo de frutificação	Inibe a transcriptase reversa do HIV-1.
LIU <i>et al.</i> , 2004	<i>Ganoderma lucidum</i>	Proteoglicana extraída do micélio	Inibe o efeito citopático do HSV -1 e 2.
ZHANG <i>et al.</i> , 2004	<i>Pleurotus tuber-regium</i>	β -glucans e derivados sulfatados	Atividade antiviral contra HSV-1 e HSV-2.

Quadro 2 – Propriedades medicinais dos Basidiomicetos

2.3.1.1 *Agaricus brasiliensis*

Agaricus brasiliensis (anteriormente *A. blazei*), conhecido popularmente como cogumelo do sol é um basideomiceto originado do Brasil, natural nas regiões da Mata Atlântica do sul do Estado de São Paulo, Município de Piedade e em 1975 foi levado para o Japão onde passou a ser cultivado e estudado o seu potencial terapêutico. O cogumelo vem sendo cultivado, comercialmente no Brasil, desde a década de 90 e a maior produção encontra-se no estado de São Paulo, onde o cultivo principal é feito nas épocas de primavera e verão (BRAGA *et al.*, 1998). Estudos sobre a população nativa desta região mostraram que eles apresentavam baixa incidência de uma variedade de doenças, inclusive câncer, doenças bacteriana e viral, além de uma alta taxa de longevidade. Este fato foi correlacionado com o consumo constante do *A. brasiliensis* na dieta normal. Durante os anos oitenta e noventa, foi demonstrado que *A. brasiliensis* possui atividade estimulante do sistema imune, ativando os mecanismos de defesa naturais do corpo para lutar contra uma variedade de agentes infecciosos e câncer. A atividade imunoestimuladora e antitumoral foi investigada em diferentes modelos de laboratório e das 17 frações do polissacarídeo obtidos do corpo de frutificação, 7 apresentaram atividade antitumoral (WASSER, 2002).

Segundo Mizuno *et al.*, (1990), o basidiocarpo de *A. brasiliensis* apresenta 40-45% de proteínas, 38-45% de carboidratos, 6-8% de fibras, 5-7% de minerais, e 3-4% de gorduras (ácidos graxos), valores baseados em relação à matéria seca. Contém ainda as vitaminas B1, B2 e niacina e teores elevados de potássio e cálcio. Além das propriedades nutricionais, *A. brasiliensis* é utilizado para prevenção do câncer ou como um adjuvante no tratamento com drogas quimioterápicas, após a remoção de um tumor maligno (TAKATU *et al.*, 2001). Segundo Eguchi *et al.*, (1999), o extrato aquoso de basidiocarpo de *A. brasiliensis* pode ser um alimento útil para o tratamento preventivo e curativo de disfunções renais.

Atualmente, é utilizado na alimentação em diferentes partes do mundo, e são comumente empregados no tratamento de doenças como estresse, diabete, problemas gástricos e osteoporose. Possuem compostos ativos com potencial anticarcinogênico, antiinflamatório, imunossupressor e antimicrobiano

(SORIMACHI *et al.*, 2001). Os efeitos terapêuticos têm sido atribuídos aos polissacarídeos com ligação β -1,3 glucana ou a um complexo β -1,3 glucana-proteína, entretanto a sua composição química e propriedades medicinais não estão completamente elucidadas (figura 3) (MACHADO *et al.*, 2005).

Em relação a efeitos antimicrobianos por parte de *A. brasiliensis*, poucos relatos foram feitos. Investigando a atividade antiviral do *A. brasiliensis*. OSAKI *et al.*, (1994) encontraram atividade antibacteriana nos extratos clorofórmicos e metanólicos do basidiocarpo de *A. brasiliensis*. A substância isolada foi ativa contra *Salmonella typhimurium* e foi identificada como ácido octadecadienóico.

Sorimachi *et al.*, (2001) mostraram que frações do extrato aquoso micelial, inibiram completamente as alterações morfológicas induzidas pelo vírus da encefalite eqüina do oeste (WEE) em células Vero. Nesse estudo também foi comprovado que algumas preparações obtidas do corpo de frutificação dessa espécie foram capazes de inibir moderadamente a replicação do poliovírus.

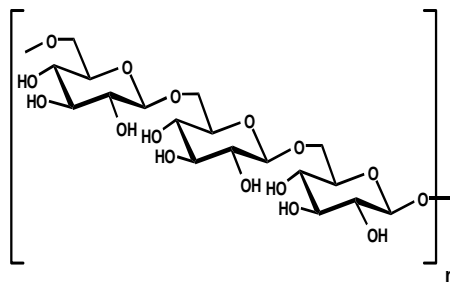


Figura 3 – Estrutura da β -glucana (1 \rightarrow 6)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiviral do polissacarídeo e frações do *Agaricus brasiliensis* contra herpesvírus bovino tipo-1.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade do polissacarídeo e frações F1, F2, F3, e F4 em culturas de células HEp-2.
- Avaliar a atividade antiviral do polissacarídeo e das frações utilizando o ensaio de redução de plaque, em vários tempos de infecção, e reação de imunofluorescência.

REFERÊNCIAS

ACKERMANN M., PETERHANS E., WYLER R., (1982). DNA of Bovine Herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. *American Journal of Veterinary Research*, v. 43, p. 36-40.

BOWLAND S.L., SHEWEN P.E., (2000). Bovine respiratory disease: commercial vaccines currently available in Canada. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 41, p. 33–48.

BRAGA GC, EIRA AFL, CELSO GP., (1998). *Manual de cultivo de Agaricus blazei Murriel “cogumelo do sol”*. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 44p.

BRANDT C.R, PIRAINO F., (2000). Mushroom antivirals. *Recent Research Developments in Antimicrobial Agents & Chemotherapy* , v. 4, p.11–26.

CARBONERO E.R., GRACHER A.H. P., SMIDERLE F.R., ROSADO F.R., SASSAKI G.L., GORIN P.A.J., IACOMINI M., (2006). A β -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. *Carbohydrate Polymers*, v. 66, p. 252-257.

CHANG S.T, MILES P.G., (1989). Part I—*Mushroom science. Edible mushroom and their cultivation*. Boca-Raton, USA: CRC Press.

CHANG S.T, MILES P.G., (1992). Mushroom biology – a new discipline. *Mycologist*, v. 6, p. 64–65.

CHANTRILL B.H., COULTHARD C.E., DICKINSON L., INKLEY, G.W., MORRIS W. AND PYLE A.H., (1952) The action of plant extracts on a bacteriophage of *Pseudomonas pyocyanea* and on influenza A virus. *Journal of General Microbiology*, v 6, p.74–84.

COLLINS R.A., NG T. B., (1997). Polysaccharopeptide from *Coriolus versicolor* has potential for use against human immunodeficiency virus type 1 infection. *Life Sciences*, v. 60 (25), p. 383-387.

CRAGG G. M.; NEWMAN D. J.; SNADER K. M., (1997). Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*, v. 60, p. 52-60.

DE CLERCK E., (2002). Strategies in the design of antiviral drugs. *Nature Reviews, Drug discovery*, v. 1, p. 13-25.

DE CLERCK E., (2005). Recent highlights in the development of new antiviral drugs. *Current Opinion in Microbiology*, v. 8, p. 552–560.

DE CLERCQ E., (2004). Antiviral drugs in current clinical use. *Journal of Clinical Virology*, v. 30, p. 115-133.

EGUCHI F, WATANABE Y, KIKUKAWA T, YOSHIMOTO H, ABE C, HIGAKI M (1999). Renoprotective effects of hot water extract of *Agaricus blazei* fruiting bodies in experimental renal injury assessed by DOCA-NaCl hemiphenrectomized rats. *Journal of Traditional Medicines*, v. 16(1), p. 24-31.

EO S.K, KIM Y.S, LEE C.K, HAN S.S., (2000). Possible mode of antiviral activity of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* on herpes simplex viruses. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 72, p. 475–481.

FIELD J. H, BISWAS S, MOHAMMAD T. I., (2006). Herpesvirus latency and therapy - From a veterinary perspective. *Antiviral Research*, v. 71, p. 127–133.

HARVEY A. L., (1999). Medicines from nature: are natural products still relevant to drugs discovery? *Trends In Pharmacological Sciences*, v. 20, p. 196-198.

HAWKSWORTH D.L., (2001). Mushrooms: the extent of the unexplored potential. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v. 3, p.333–340.

HOOF L.V.; BERGHE , D.A.V.; HATFIELD, G.M.; VLIETINCK , A.J (1984). Plant antiviral agents. V. 3-methoxyflavones as potent inhibitors of viral induced block of cell synthesis. *Planta Medica.*, v. 50, p.513-517.

ICHIMURA T., WATANABE O., MARUYAMA S., (1998). Inhibition of HIV-1 protease by water soluble lignin-like substance from an edible mushroom, *Fuscoporia obliqua*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, v. 62 (3), p. 575-577.

JASSIM S.A.A., NAJI M.A., (2003). Novel antiviral agents from plants. *Journal of Applied Microbiology*, v. 95, p. 412–427.

JONES P. S., (1998). Strategies for antiviral drug discovery. *Antiviral Chemistry Chemotherapy*, v. 9, p. 283-302.

KHAN M.T.H., THOMPSON K.D., ATHER A., (2005). Antiviral activities of three Bangladeshi medicinal plant extracts against herpes simplex viruses. *Minerva Biotechnology*, v.17 p.193-99.

KUCERA L.S.; COHEN R.A.; HERRMANN JUNIOR, E.C., (1965). Antiviral activities of extracts of the lemon balm plant. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.130, p.474-481.

LEE H., HUANG R.L., CHEN C.T., CHEN H.C., HSU W.C., LU M.K., (2002). *Antrodia camphorata* polysaccharides exhibit anti-hepatitis B virus effects. *FEMS Microbiology Letters*, v. 209, p. 63-67.

LEMAIRE M., PASTORET P.P., THIRY E., (1994). Le contrôle de l'infection par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. *Annales de Médecine Vétérinaire*, v.138, p. 167-180.

LIU J., YANG F, YE L., YANG X, TIMANI K.A., ZHENG Y, WANG Y. (2004). Possible mode of action of antiherpetic activities of a proteoglycan isolated from the mycelia of *Ganoderma lucidum* in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 95, p. 265–272.

MACHADO M.P., RODRIGUES FILHO E, TEREZAN A.P., RIBEIRO L.R. MANTOVANI M.S., (2005). Cytotoxicity, genotoxicity and antimutagenicity of hexane extracts of *Agaricus blazei* determined in vitro by the comet assay and CHO/HGPRT gene mutation assay. *Toxicology in Vitro*, v.19, p. 533–539.

METTENLEITER T.C., (2003). Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. *Virus Research*, v. 92, p. 197-206.

MIRANDA M.M.F.S., (2002). Viroses Dermotrópicas, p. 75-98. In: SANTOS, N.S.O., ROMANOS, M.T.V., WIGG, M.D. (eds). *Introdução à Virologia Humana*. 3º ed Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

MIZUNO T., (1999). The extraction and development of antitumouractive polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v. 1, p. 9–29.

MIZUNO T, HAGIWARA, T., NAKAMURA, ITO, H, SHINIURS, K. SUMIYA, T., AAKURA, A., (1990). "Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from 'Himematsutnke,' the fruiting body of *Agaricus blazei* Murrill. *Agricultural & Biological Chemistry*, v. 54(11), p. 2889-2896.

NGAI P.H.K., NG T.B., (2003). Lentin, a novel and potent antifungal protein from shitake mushroom with inhibitory effects on activity of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase and proliferation of leukemia cells. *Life Sciences*, v. 73 , p. 3363–3374.

NIELSEN J., (2002). Combinatorial synthesis of natural products. *Current Opinion in Chemical Biology*, v.6, p. 297-305.

OSAKI Y., KATO T., YAMAMOTO K., OKUBO J., MIYASAKI T., (1994). Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of the basidiomycete *Agaricus blazei*. *Yakugaku Zasshi Journal of the Pharmaceutical society of Japan*, v. 114(5), p. 342-350.

PIRAINO F., BRANDT C.R., (1999). Isolation and partial characterization of an antiviral, RC-183, from the edible mushroom *Rozites caperata*. *Antiviral Research*, v. 43, p. 67–78.

ROIZMAN, B., KNIPE, D., (2001). Herpes simplex viruses and their replication. *In*: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Virology*, 4th edition. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, p. 2399-2459.

ROIZMAN B., PELLETT P., (2001). The family herpesviridae: a brief introduction. *In*: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Virology*, 4th edition. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, p. 2381- 2397.

SHARON N., LIS H., (1993). Carbohydrates in cell recognition. *Scientific American*, v.1, p. 82-89.

SHIBATA C.K. R, DEMIATA I.M., (2003). Cultivo e análise da composição química do cogumelo do sol. Publ. *UEPG Ciências Biológicas e da saúde*, Ponta Grossa, v. 9 (2), p. 21-32.

SIMÕES C.M.O., FALKENBER, M., MENTZ L.A., SCHENKEL E.P., AMOROS, M., (1999). Antiviral activity of South Brazilian medicinal plant extract. *Phytomedicine*, v.6, 205–214.

SMITH J.E., ROWAN N.J., SULLIVAN R. (2002). Medicinal mushrooms: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. *Biotechnology Letters*, v. 24, p. 1845–1938.

SORIMACHI K, IKEHARA Y, MAEZATO G, OKUBO A, YAMAZAKI S, AKIMOTO K, NIWA A. (2001). Inhibition by *Agaricus blazei Murrill* fractions of cytopathic effect induced by western equine encephalitis (WEE) virus on Vero cells in vitro. *Bioscience Biotechnology Biochemical*, v. 65 (7), p. 1645-1647.

SPEAR P.G., LONGNECKER R., (2003). Herpesvirus Entry: an Update. *Journal of Virology*, v. 77, p. 10179–10185.

SPEAR P., (1993). Entry of alphaherpesviruses into cells. *Seminars in Virology*, v. 4, p. 167- 180.

STROHL W. R., (2002). The role of natural products in a modern drug discovery program. *Drug Discovery Today*, v. 5, n. 2, p. 39-41.

TAKAKU T, KIMURA Y, OKUDA H. (2001). Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei Murrill* and its mechanism of action. *Journal of Nutrition*, v. 131 (5), p.1409 1413.

TAO Y., ZHANGA L., AND CHEUNG P.C. K., (2006). Physicochemical properties and antitumor activities of water-soluble native and sulfated hyperbranched mushroom polysaccharides. *Carbohydrate Research*, v. 341 p. 2261–2269.

TIKOO, S.K., M. CAMPOS, BABIUK A.L.A., (1995). Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control. *Advances in Virus Research*, v. 45, p.191–223.

VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK (2006). Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1. *Veterinary Microbiology*, v. 113, p. 275–282.

VERMANI, K., GARG, S., (2002). Herbal medicines for sexually transmitted diseases and AIDS. *Journal of Ethnopharmacology*, v.80 (1), p.49–66.

VILLAMIL , S.M.; ALCHE, L.E.; COTO, C.E. (1995). Inhibition of herpes virus type 1 multiplication by meliacine, a peptide of plant origin. *Antiviral Chemistry Chemotherapy*, v.6, p.239-244.

VISALLI R. J.; ZEIJL M. V., (2003). DNA encapsidation as a target for anti-herpesvirus drug therapy. *Antiviral Research*, v. 59, p. 73-87.

WALDE S.G. A., VELUB V., JYOTHIRMAYI T., MATH R.G.B, (2006). Effects of pretreatments and drying methods on dehydration of mushroom. *Journal of Food Engineering*, v. 74, p. 108–115.

WANG H. X., NG T.B., (2000). Isolation of a Novel Ubiquitin-like Protein from *Pleurotus ostreatus* Mushroom with Anti-Human Immunodeficiency Virus, Translation-Inhibitory, and Ribonuclease Activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications* v. 276, p. 587–593.

WANG H., NG T.B., (2001). Isolation and characterization of velutin, a novel low-molecular-weight ribosome-inactivating protein from winter mushroom (*Flammulina velutipes*) fruiting bodies. *Life Sciences*, v. 68, p. 2151–2158.

WANG H., NG T.B., (2004). Purification of a novel low-molecular-mass laccase with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the mushroom *Tricholoma giganteum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 315, p. 450–454.

WASSER S.P., (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 60, p.258-274.

ZHANG M., CHEUNG P.C.K., OOI V.E.C. ZHANG L., (2004). Evaluation of sulfated fungal β -glucans from the sclerotium of *Pleurotus tuber-regium* as a potential water-soluble anti-viral agent. *Carbohydrate Research*, v. 339, p. 2297–2301.

Antiviral property of a polysaccharide and fractions from the *Agaricus brasiliensis* for Bovine Herpesvirus type 1.

Minari, M.C¹, Lauretti, F¹, Soares, A.C²., Ricardo, N.M.P.S².; Santos, A. C. S.;

Nozawa C¹, Linhares, R.E.C¹ *.

¹Departamento de Microbiologia. CCB/UEL. Caixa Postal 6001. CEP 86051-970.

Londrina-PR, Brasil.

²Laboratório de Polímeros do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da

UFC, Fortaleza-CE, Brasil.

* To whom correspondence should be addressed.

Departamento de Microbiologia. CCB/UEL.

Caixa Postal 6001

CEP 86051-970

Londrina-PR. Brasil.

Phone: 55-43-3371:4617

e-mail: relin@uel.br

Abstract

Natural products are an inexhaustible source of compounds with promising pharmacological activities, including antiviral action. In the present study, the potential antiviral of a polysaccharide (PLS) and fractions from *Agaricus brasiliensis* were investigated in the replication of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) in HEp-2 cell cultures. It was shown that PLS and the fractions (F1-F4) had no cytotoxic effect in HEp-2 cell cultures up to the concentration of 2000 µg/ml. The antiviral activity of these compounds was assayed by the treatment of the cells before, during and after virus infection and evaluated by plaque reduction assay. The fractions had little effect in the replication of BHV-1, however, PLS suppressed the replication significantly with an inhibitory concentration (IC₅₀) value of 160 µg/ml. PLS also inhibited the number of fluorescent cells in 61%, at 400 µg/ml. Although the mechanism has yet to be defined, our work suggested that PLS inhibits viral replication by interfering with the early events of viral penetration. Additional studies are required to better understanding of PLS mechanism of action.

1. Introduction

The lack of effective therapies and/or vaccines for several viral infections and the emergence of drug resistant strains have stimulated the development of new antiviral drugs (García et al., 1999; Ruffa et al., 2002). Natural products have proven to be an important source of both new pharmaceuticals and compounds that can be modified for improved efficacy (Piraino and Brandt, 1999).

Among the fungi, molds have been a significant source of antimicrobial and immunomodulatory compounds. Higher fungi have been tested for antibacterial activity but only recently it has been demonstrated that some mushrooms also possess antiviral activity. For example, the polysaccharide from basidiomycete *Ganoderma lucidum* has antiviral activity against herpes simplex viruses (Eo et al., 2000). An extract of the edible Japanese mushroom *Lentinus edodes* has been found to inhibit the replication of herpes simplex virus (HSV), western equine encephalitis virus, poliovirus, measles virus, mumps virus, and human immunodeficiency virus (Tochikura et al., 1988; Suzuki et al., 1990 Sorimachi et al., 1990; Sarkar et al., 1993). Thus, screening of other mushroom species may lead to the identification of additional antiviral drugs.

Agaricus brasiliensis (formely *Agaricus blazei*) a species native in Brazil, popularly known as 'mushroom of the sun' and 'Himematsutake' in Japan, is thought to present possible medicinal values in folk medicine. Infusion of the dried fruiting bodies of this mushroom has been popularly consumed both as a stimulant and as an auxiliary treatment of various diseases, including cancer (Takaku et al., 2001). Sorimachi et al. (2001) showed that ethanolic fractions obtained from an aqueous extract of *A. blazei* mycelium inhibited completely the cytopathic effect of the western equine encephalomyelitis virus (WEEV).

Bovine herpesvirus 1 (BHV-1) belongs to the *Alphaherpesvirinae* subfamily and shares a number of biological properties with HSV-1 and HSV-2. BHV-1 infection can result in conjunctivitis, upper respiratory infection, pneumonia, genital disorders and abortions (Tikoo et al., 1995). BHV-1 infection costs the cattle industry at least US\$500 million per year in the United States. Although vaccines are available, they can cause disease in young calves and abortions in cows (Jones, 2003).

As few reports exist investigating antiviral activity of *A. brasiliensis*, the aim of the present study is to evaluate the antiviral potential of the PLS and fractions of *A. brasiliensis* against HBV-1.

2. Materials and methods

2.1. Polysaccharide and fractions of *A. brasiliensis*

The isolated polysaccharide (PLS) and fractions F1, F2, F3, F4 was provided by Laboratório de Polímeros do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC) Brazil (Gonzaga, et al., 2005).

The PLS and fractions were dissolved in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), filter-sterilized and kept at 4 °C for a maximum of 72 h.

2. 2. Cells and virus

HEp-2 cells (human larynx carcinoma, ATCC, CCL-23) were grown at 37 °C with Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine

serum (Gibco BRL),, 2 mM glutamine (Sigma, Chem. Co. USA), Penicillin (100 IU/ml), Streptomycin (100 µg/ml) (Sigma, Chem. Co.) and Amphotericin B (2.5 µg/ml) (Bristol Myers-Squibb). The bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) was supplied by Prof. A. Alfieri, DMVP-UEL, Brazil. The virus was propagated in HEp-2 cells, stored at -80 °C and titers were determined by plaque assay.

2. 3. Cytotoxicity assay

For cytotoxicity assay HEp-2 cell were seeded in 96-well plates at a density of 10^5 cells/ml. Twenty-four hours cultures were incubated with various concentrations (15-2000 µg/ml) of PLS and fractions F1-F4 for 48 h. Cell viability was determined by MTT Kit [dimethylthiazol diphenyl tetrazolium bromide (Sigma, Chem. Co., USA)] according to manufacture's recommendation.

The cytotoxicity was calculated as the 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) that is the concentration of substances needed to inhibit the viable cells up to 50% by regression analysis.

2.4. Plaque reduction assay

Semi-confluent HEp-2 cell monolayer grown in 24-well plates treated with PLS or fractions and infected were overlaid with nutrient agarose (DMEM containing 1.5% agarose). Cultures were incubated for 48 h fixed with 10% formalin and stained with 0.5% violet crystal. The antiviral activity was defined as the percentage of plaque reduction as follows:

% Plaque reduction = $[1 - (\text{Number of plaque in test} / \text{Number of plaque in control}) \times 100]$.

The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) was defined as the concentration of substances required to reduce virus titer by 50% by regression analysis. The selectivity index (SI) was calculated by the ratio $CC50 / IC_{50}$.

2.4.1. Incubation of cell monolayer with PLS before infection

PLS was incubated with semi-confluent HEP-2 cells at the concentrations of 50, 100, 200 or 400 $\mu\text{g/ml}$ for 1h and 2 h at 37 °C under 5% CO_2 . After removal of the unbound PLS, cultures were infected with 50–100 pfu/ml of BHV-1. After 1 h incubation the inoculum excess was removed and plaque assay carried.

2.4.2. Incubation of cell monolayer with PLS and fractions during infection

PLS and the fractions F1, F2, F3 e F4 (50 $\mu\text{g/ml}$ to 400 $\mu\text{g/ml}$) and 50 -100 pfu/ml of BHV-1 were added at the same time (0 h) to confluent cell cultures and analysed by plaque assay.

2.4.3. Incubation of cell monolayer with PLS after infection

The cell monolayer was infected with 50–100 pfu/ml of BHV- 1. After 1 h incubation the cell monolayer was washed with PBS and then incubated with PLS at concentrations of 50 $\mu\text{g /ml}$ to 400 $\mu\text{g/ml}$ for 1 h and 2 h. After incubation cell monolayer was washed and analysed by plaque assay.

2.4.4. Virucidal assay

The virucidal assay was performed for PLS. BHV-1 (10^6 pfu/ml) was diluted with equal volumes of DMEM containing 50, 100, 200 or 400 μ g/ml of the PLS and incubated for 1 h at 37 °C. After, the cells were infected for 1 h and PLS plus virus were removed, the cell monolayer washed and plaque assay was performed.

2.4.5. Virus adsorption assay

The virus adsorption assay was performed for PLS according to Zhu, et al. (2004) with some modifications. HEp-2 cells were grown in 24-well plates and incubated at 37°C for 2 days in 5% CO₂. After the formation of the cell monolayer, the cells were infected with BHV-1 in the presence or absence of concentrations of the PLS, previously mentioned. After a viral adsorption period of 1 h at 4°C, the cells were washed with PBS to remove the non-adsorbed virus and the plaque assay was performed.

2.8. Indirect immunofluorescence assay (IFA)

HEp-2 cells grown on glass coverslips were infected with BHV-1 at a MOI of 1 and PLS (50 μ g /ml to 400 μ g/ml) was added at 0 h and incubated for 24 h. Cells were harvested, washed and fixed with acetone (-20°C) for 20 min, this was followed by immunofluorescence staining using polyclonal bovine anti-BHV-1 antibodies (DMVP/UEL) and rabbit anti-bovine IgG FITC conjugate (Sigma Chem. Co., USA). The cells were examined under UV light (Leica DM4500 B) and 100 cells/cover slip were scored.

2.9. Statistical analysis

The statistical significance of the difference between mean values was determined by Student's t-test at significance level of $P \leq 0.05$. The experiments were carried out in triplicate.

3. Results

The viability of HEp-2 cells was not affected with PLS and fractions even up to the concentration of 2000 $\mu\text{g/ml}$.

HEp-2 cell monolayer was treated with PLS before, during and after virus infection and the results demonstrated a viral inhibition concentration dependent with higher percentage of inhibition, at time 0h.

The figure 1 shows that when PLS was added at the concentration of 400 $\mu\text{g/ml}$, two hours and one hour prior infection (-2h and -1h) the inhibition of virus replication, was 9.4% and 3.4%, respectively. At the same concentration at the time zero (0h) the inhibition was 67.9%. However, when PLS was added 1h and 2h post-infection the inhibition was 42.9% and 28.6%, respectively.

The treatment with PLS at the concentrations of 200 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ and 50 $\mu\text{g/ml}$ resulted in viral inhibition of 58.5%, 36.5% and 30.1% respectively, at the time zero. When the PLS was added before or after infection there was a decrease in viral inhibition (Fig. 1).

At the time 0h, fractions F1-F4 also inhibited BHV-1 replication, however, at lower level. The treatment with fractions at concentrations of 200 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ and 50 $\mu\text{g/ml}$ resulted in viral inhibition from 22 % to 43%.

The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) and the respective selectivity index (SI), at time 0 h and at highest concentration (400 $\mu\text{g/ml}$), for PLS and fractions are shown in

Table 1. The IC₅₀ value was calculated by regression analyses of the dose-response curve generated from the data.

The results of PLS showed that the compound had no direct action on the virus or in the adsorption step.

The effect of PLS in the BHV-1 replication assayed by IFA is shown in figure 2. It was observed that at the PLS concentrations of 400 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml and 50 µg/ml the inhibition of fluorescent cells (FC) was 61%, 53,5%, 38,8%, 29,0% respectively. The results demonstrated a viral inhibition concentration dependent similar to the found for the plaque assay.

4. Discussion

Current chemotherapeutic antiviral drugs have been characterized as having in many cases limited clinical efficacy, suboptimal pharmacokinetics and toxic side effects (Patick and Potts, 1998). In response to this, it is necessary to identify and develop new antiviral agents with different targets from the standard therapy.

A number of polysaccharide with antiviral activity have been described. Polysaccharides isolated from *Antrodia camphorata* have anti-HBV activity (LEE et al 2002). A protein bound polysaccharide (APBP) isolated from the mushroom *Ganoderma lucidum* was found to decrease significantly the surviving viral titer of both HSV-1 and HSV-2 at concentration of 1500 µg/ml (EO et al., 2000).

Several sulphated polysaccharides, such as heparin, dextran sulphate, pentosan polysulphate, mannan sulphate, sulphated cyclodextrins, carrageenans, xylofuranan sulphate, and ribofuranan sulphate have been shown to inhibit the replication of various enveloped viruses, including HSV, human cytomegalovirus (HCMV), and HIV

(Baba et al., 1988; Schols et al., 1990; Damonte et al., 1994; Witvrouw et al., 1994; Zacharopoulos et al., 1997).

Polysaccharides belong to a structurally diverse class of macromolecules, polymers of monosaccharide residues joined to each other by glycosidic linkages. It is noteworthy that, in comparison with other biopolymers such as proteins and nucleic acids, polysaccharides offer the highest capacity for carrying biological information because they have the greatest potential for structural variability. This enormous potential variability in polysaccharide structure gives the necessary flexibility to the precise regulatory mechanisms of various cell-cell interactions in higher organisms (Sharon and Lis, 1993). The antiviral activities of polysaccharides are linked to the anionic features of the molecules and that they inhibit the early stages of viral infection such as attachment and penetration (Marchetti et al., 1994).

The results reported here are in agreement with the previous studies on the antiviral activity of polysaccharides, such as carrageenan that inhibited a step in the HSV cycle following the viral internalization but preceding the onset of the late viral protein synthesis (Gonzalez et al., 1997). Some anionic sulphate polysaccharides isolated from the algae, such as the rhamnan sulphate from *Monostroma latissimum* and the fucose sulphate from *Sargassum horneri*, were found to inhibit the HSV-1 replication even when added at 2 h post-infection after some virus-specific proteins had been synthesized (Lee et al., 1999; Hoshino et al., 1999).

However, an alternatively mode of action has been reported for dextran sulphate and heparin where the mechanism of antiviral action of this type of compounds has been attributed to an interaction with the virus attachment to host cells (Baba et al., 1988)

In conclusion, we demonstrated that PLS and fractions possessed antiviral activity

against BHV-1. The effective antiviral concentrations of PLS are far from the cytotoxicity threshold, and, consequently, this natural product presents a good selectivity index and, therefore, reflect the possibility of development as antiviral agent. The antiviral activity of PLS may be due to the effect on the penetration of BHV-1, however, the exact steps affected remains to be elucidated.

5. References

Baba, M., Snoeck, R., Pauwels, R., De Clercq, E., 1988. Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus and human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother.* 32, 1742–5.

Damonte E., Neyts J., Pujol C.A., Snoeck R. ; Andrei G. ; Ikeda S. ; Witbrouw M. ; Reymen D. ; Haines H. ; Matulewicz M. C. ; Cerezo A. ; Coto C. E. ; De Clercq E., 1994. Antiviral activity of a sulphated polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigita*. *Biochem Pharmacol.* 12, 2187–92.

Eo S.K., Kim Y.S, Lee C.K, Han S.S., 2000. Possible mode of antiviral activity of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* on herpes simplex viruses. *J. Ethnopharmacol.* 72, 475–481.

García G., Cavallaro L., Broussalis A., Ferraro G., Martino V., Campos R., 1999. Biological and chemical characterization of the fraction with antiherpetic activity from *Achyrocline flaccida*. *Planta Med.* 65, 343–346.

Gonzaga, M.L.C.; Ricardo, N.M.P.S.; Heatley, F.; Soares, S.A., (2005). Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei Murill*. *Carbohydr. Polym.* 60, 43-49.

.

Gonzalez, M.E, Alarcon B., Carraasco L.,1987. Polysaccharides as antiviral agents: antiviral activity of carrageenan. *Antimicrob Agents Chemother.* 31, 1388–93.

Hoshino, T., Hayashi, T., Hayashi, K., Hamada, J., Lee, J.B., Sankawa, U., 1998. An antivirally active sulphated polysaccharide from *Sargassum horneri*. *Biol Pharm Bull.* 21, 730–4.

Jones, C., (2003). Herpes Simplex Virus Type 1 and Bovine Herpesvirus 1 Latency

Clin. Microbiol. Rev. 16, 79–95.

Lee, J.B., Hayashi, K., Hayashi, T., Sankawa, U., Maeda, M., 1999. Antiviral activities against HSV-1, HCMV and HIV-1 of Rhamnan sulfate from *Monostroma latissimum*. *Planta Med.* 65, 439–41.

Marchetti, M., Pisani, S., Pietropaolo, V., Seganti, L., Nicoletti, R., Orsi, N., (1994). Inhibition of herpes simplex virus infection by negatively charged and neutral carbohydrate polymers. *J. Chemother.* 7, 90–96.

Patick, A.K., Potts, K.E., 1998. Protease inhibitors as antiviral agents. *Clinical Microbiology Reviews.* 11, 614–627.

Piraino, F., Brandt, C.R., 1999. Isolation and partial characterization of an antiviral, RC-183, from the edible mushroom *Rozites caperata*. *Antiviral Res.* 43, 67–78.

Ruffa, M.J., Perusina, M., Alfonso, V., Wagne,r M.L., Suriano, M., Vicente, C., Campos R., Cavallaro, L., 2002. Antiviral activity of *Petiveria alliacea* against the bovine viral diarrhoea virus. *Chemotherapy.* 48, 144–147.

Sarkar, S., Koga, J., Whitley, R.J., Chatterjee, S., 1993. Antiviral effect of the extract of culture medium of *Lentinus edodes* mycelia on the replication of herpes simplex virus type 1. *Antiviral Res.* 20, 293–303.

Sharon, N., Lis H., (1993). Carbohydrates in cell recognition. *Scientific American.* 1, 82-89.

Sorimachi, K., Ikehara, Y., Maezato, G., Okubo, A., Yamazaki, S., Akimoto, K., Niwa, A., 2001. Inhibition by *Agaricus blazei* Murrill fractions of cytophatic effect induced by western equine encephalitis (WEE) virus on Vero cells in vitro. *Biosci. Biotech. Bioch.* 65, 1645-1647.

Sorimachi, K., Akir, N., Yamazaki, S., Toda, S., Yasumura, Y., 1990. Antiviral activity of water-solubilized lignin derivatives in vitro. *Agricultural and Biological Chemistry*. 54, 1337–1339.

Suzuki, H., Kenji, I., Osamu, Y., 1990. Structural characterization of the immunoactive and antiviral water-solubilized lignin in an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM). *Agric. Biol. Chem.* 54, 479–487.

Takaku, T., Kimura, Y., Okuda, H., 2001. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. *J. Nutr.* 131, 1409-1413.

Tikoo, S.K., M. Campos, Babiuk A.L.A., 1995. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control. *Adv. Virus Res.* 45, 191–223.

Tochikura, T.S., Nakashima, H., Ohashi, Y., Yamamoto, N., 1988. Inhibition (in vitro) of replication and of the cytopathic effect of human immunodeficiency virus by an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Med. Microbiol. Immunol.* 177, 235–244.

Witvrouw, M., Desmyter, J., De Clercq E., 1994. Polysulfates as inhibitors of HIV and other enveloped viruses. *Antivir Chem Chemother.* 5, 345–59.

Zacharopoulos, V.R., Phillips, D.M., 1997. Vaginal formulations of carrageenan protect mice from herpes simplex virus infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 4, 465–8.

Zhu, W., Chiu, L.C.M. Ooi, V.E.C.; Chan, P.K.S. Ang, JR^a.P.O., 2004. Antiviral property and mode of action of a sulphated polyssaccharide from *Sargassum patens* against herpes simplex virus type 2. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 24, 81-85.

Figure 1

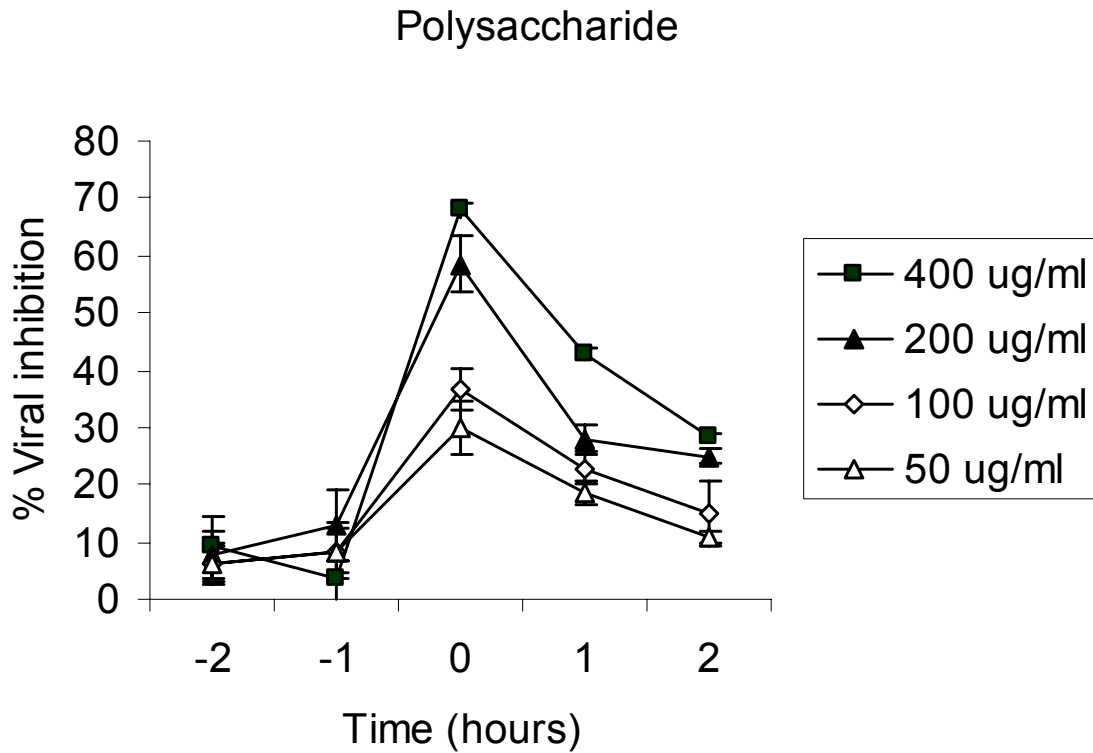


Fig. 1. The effect of polysaccharide (PLS) from *Agaricus brasiliensis* in the replication of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) monitored by plaque assay in HEP-2 cell cultures. The drug was used at the indicated concentrations being added before (-2h and -1h), during (0 h) and after (1h and 2h) the infection. Percent of virus inhibition is indicated with the respective standard deviations.

Figure 2

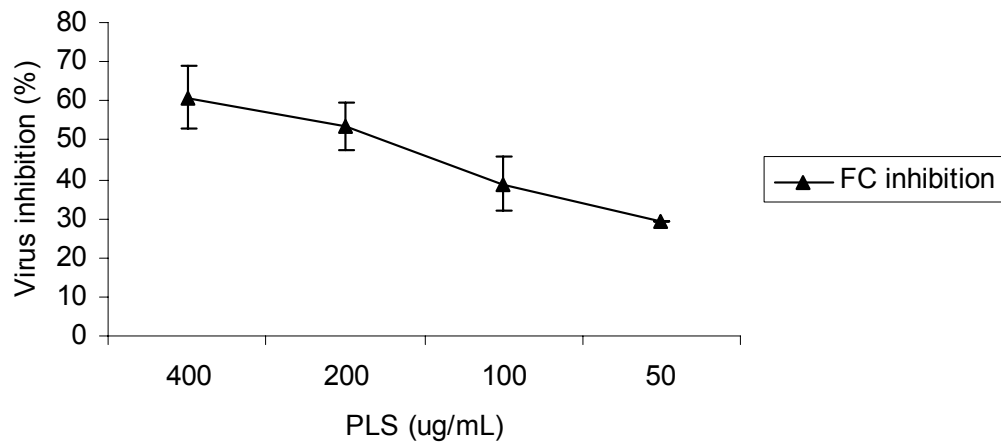


Fig. 2. The effect of polysaccharide (PLS) in bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) infected HEp-2 cells monitored by indirect immunofluorescence assay (IFA). The values represent the inhibition of the number of fluorescent cells (FC) in comparison to control nontreated cells, with the respective standard deviations.

Table 1

Antiviral activity of polysaccharide (PLS) and fractions (F1-F4) isolated from *Agaricus brasiliensis* during infection (time 0 h) with bovine herpesvirus type 1 (BHV-1).

Substances	CC ₅₀ ^a (µg/ml)	Viral inhibition (%)	IC ₅₀ ^b (µg/ml)	SI ^c
PLS	>2000	67,9	160	>12,5
F1	>2000	44,9	544	> 3,6
F2	>2000	42,4	486	> 4,1
F3	>2000	45,0	496	> 4,0
F4	>2000	36,8	1217	> 1,6

^a CC₅₀ is the concentration of the 50% cytotoxic effect.

^b IC₅₀ is the concentration of the sample required to inhibit 50%

^c Selectivity index (SI) = CC₅₀/IC₅₀.