



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VINÍCIUS PIRES RINCÃO

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE POLISSACARÍDEOS
ISOLADOS DE *LENTINULA EDODES* E *AGARICUS
BRASILIENIS*, E SEUS DERIVADOS, NA REPLICAÇÃO DO
HERPESVÍRUS E POLIOVÍRUS**

VINÍCIUS PIRES RINCÃO

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE POLISSACARÍDEOS
ISOLADOS DE *LENTINULA EDODES* E *AGARICUS
BRASILIENIS*, E SEUS DERIVADOS, NA REPLICAÇÃO DO
HERPESVÍRUS E POLIOVÍRUS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Rosa Elisa Carvalho Linhares

Londrina
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

R579a Rincão, Vinícius Pires.
Atividade antiviral de polissacarídeos isolados de *Lentinula edodes* e *Agaricus brasiliensis*, e seus derivados, na replicação do herpesvírus e poliovírus / Vinícius Pires Rincão. – Londrina, 2012.
79 f. : il.

Orientador: Rosa Elisa Carvalho Linhares.
Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2012.
Inclui bibliografia.

1. Vírus do herpes – Teses. 2. Poliovírus – Teses. 3. Agentes antivirais – Teses. 4. Polissacarídeos – Teses. 5. Replicação viral – Teses. 6. Microbiologia – Teses. I. Linhares, Rosa Elisa Carvalho. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579

VINÍCIUS PIRES RINCÃO

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE POLISSACARÍDEOS ISOLADOS DE
LENTINULA EDODES E *AGARICUS BRASILIENIS*, E SEUS
DERIVADOS, NA REPLICAÇÃO DO HERPESVÍRUS E POLIOVÍRUS**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina, sob orientação da Profa. Dra. Rosa Elisa Carvalho Linhares

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Nozawa
UEL – Londrina – PR

Prof^a. Dr. Emerson José Venâncio
UEL – Londrina – PR

Prof^a Dr. Mario Sergio Mantovani
UEL – Londrina – PR

Prof^a Dr^a. Sueli Fumie Yamada Ogatta
UEL – Londrina – PR

Prof^a Dr^a. Rosa Elisa Carvalho Linhares
UEL – Londrina – PR

Londrina, 24 de agosto de 2012

DEDICO

A minha esposa Patrícia que sempre esteve ao meu lado incentivando-me e a minha filha, minha vida, Olívia, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A minha esposa Patrícia e minha filha Olívia, a quem amo mais que tudo, por estarem sempre comigo, compreendendo os momentos em que não pude estar presente e por sempre me incentivarem. Obrigado!

Aos meus pais, Vilson e Clair, pois sem eles eu não teria chegado até aqui. E aos meus irmãos, Michelle e Matheus, por estarem sempre presente me dando força. Obrigado!

Aos meus sogros, Elcio e Sônia, pela ajuda durante todos estes anos. Obrigado!

Aos professores Carlos e Elisa por quase dez anos de orientações, puxões de orelha e uma grande amizade que levarei por toda minha vida. Muito obrigado!

À Profa. Dra Rosa Elisa Carvalho Linhares, pela orientação, ensinamentos e paciência durante todos estes anos. Obrigado!

Ao Prof. Carlos Nozawa, pelos ensinamentos e debates que muito me ajudaram. Obrigado!

Aos amigos do laboratório de virologia Flávio, Fabrício, Krístie, Lilian, Ana Letícia, Ana Paula, Jucevânia, Alessandra, Gustavo, Barbara, Daniel, Ricardo, Airton, Erika, Daniele, Mariana, Sergio, Priscila, Lígia, Nayara, Samantha, Weslei, Carla, Camila, e me perdoem quem esqueci, foram tantos companheiros e amigos, obrigado pela ajuda e pelos momentos compartilhados em laboratório.

A Lígia Carla Faccin Galhardi, Nayara Lopes, Samantha Fernandes Espada, pela ajuda nos experimentos, em especial na realização do PCR.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, por garantir o suporte técnico, especialmente a Valdenice.

Aos docentes e à coordenação do programa de pós-graduação em microbiologia, pelas orientações e conhecimentos compartilhados.

Agradeço a Fundação Araucária, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da UEL pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para que este trabalho pudesse acontecer. Muito obrigado!

RINCÃO, Vinícius Pires. **Atividade antiviral de polissacarídeos modificados na replicação do herpesvírus e poliovírus**. 79 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina.

RESUMO

Os vírus constituem um grupo de patógenos intracelulares com mecanismos de replicação diversificados. Essa diversidade de mecanismos biológicos confere aos vírus, muitas vezes, a capacidade de evasão da resposta imune. Para muitos desses patógenos, para os quais ainda não existem vacinas eficazes, a única forma de controle é a terapia antiviral. Somando-se a isso o aparecimento repentino de novos vírus altamente infecciosos tornou a pesquisa por novas moléculas antivirais uma prática de grande importância. Produtos de origem natural, principalmente derivados de plantas e fungos, representam uma fonte de compostos antivirais com pouca toxicidade e ampla diversidade de atividades biológicas. Dentre estes, os polissacarídeos e seus derivados tem propriedades bioativas de interesse clínico como imunomoduladora, anticarcinogênica, antibacteriana, antiviral entre outras. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade de polissacarídeos isolados dos basidiomicetos *Lentinula edodes* (LeP) e *Agaricus brasiliensis*, bem como de seus derivados sulfatados (PSLe e PSAb) e carboximetilados (PCAb), e sua atividade antiviral na replicação do herpes simplex vírus 1 (HSV-1), herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) e poliovírus 1 (PV-1). Avaliação da citotoxicidade em células HEP-2 foi realizada pelo ensaio do MTT. A atividade antiviral foi avaliada pela adição dos polissacarídeos em diferentes tempos de infecção, pela atividade virucida e pelos ensaios de inibição da adsorção e penetração, monitorados pelo ensaio de plaque. A inibição da replicação viral foi monitorada também pelo ensaio de imunofluorescência (IF), pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e pela determinação do tamanho do plaque. Os resultados mostraram baixa toxicidade dos polissacarídeos para as células HEP-2. Em relação a atividade antiviral os melhores resultados foram obtidos para os polissacarídeos sulfatados que inibiram a replicação de HSV-1, BoHV-1 e PV principalmente no tempo 0h de infecção. A atividade antiviral avaliada pela IF apresentou inibições que corroboram as apresentadas pelo ensaio de plaque. A PCR mostrou inibição da síntese de DNA do HSV-1 pelo PSLe. Não foi observada inibição de ácido nucléico de poliovírus, pelo PSLe e PSAb. A avaliação do tamanho do plaque para a PSLe na replicação do HSV-1, BoHV-1 e PV-1, bem como para o PSAb na replicação do PV-1, resultou em uma diminuição da área do plaque em comparação ao controle de vírus. Não foi observada atividade virucida e inibição da penetração viral pelos polissacarídeos testados. PSAb inibiu significativamente a adsorção do PV-1. O PCAb não foi efetivo em nenhum dos experimentos antivirais realizados, mesmo nas concentrações mais elevadas. Esses resultados sugerem que PSLe inibe a replicação do HSV-1, BoHV-1 e PV-1 nos estágios iniciais, assim como o LeP para BoHV-1 e PV-1 e o PSAb para o PV-1. Podemos sugerir também que o PSAb e o PSLe inibem a dispersão viral entre as células. É possível verificar que os polissacarídeos sulfatados apresentaram maior atividade antiviral e que a carboximetilação diminuiu esta atividade.

Palavras-chave: Vírus do herpes. Poliovirus. Agentes antivirais.

RINCÃO, Vinícius Pires. **Antiviral activity of modified polysaccharides in herpesvirus and poliovirus replication.** 79 f. Thesis (PhD in Microbiology) - Universidade Estadual de Londrina.

ABSTRACT

Viruses are a group of intracellular pathogens with diverse replication mechanisms. This diversity of biological mechanisms confers to these entities, often, the ability to evade our immune response. For many of these pathogens, for which there are no effective vaccines, the only way of controlling is to antiviral therapy. Adding to this the sudden appearance of new highly infectious virus became the search for new antiviral molecules a practice of great importance. Natural products, mainly derived from plants and fungi, are a source of antiviral compounds with low toxicity and wide range of biological activities. Among these, polysaccharides and their derivatives has presented several bioactive properties of clinical interest as immunomodulatory, anticarcinogenic, antibacterial, antiviral and others. Thus, the aim of this study was to evaluate the cytotoxicity of polysaccharides isolated of the basidiomycete *Lentinula edodes* (LeP) and *Agaricus brasiliensis*, as well as their sulfated derivatives (PSLe and PSAb) and carboxymethylated (PCAb), and its antiviral activity in the replication of herpes simplex virus 1 (HSV-1), bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) and a poliovirus (PV-1). Evaluation of cytotoxicity in HEp-2 cells was performed by the MTT assay. Antiviral activity was evaluated by adding the polysaccharide at different times of infection, by virucidal activity and by inhibition of adsorption and penetration assays monitored by plaque assay. Inhibition of viral replication was also monitored by immunofluorescence assay (IF), by polymerase chain reaction (PCR) and by determining the size of the plaque. The results showed low toxicity of polysaccharides to the HEp-2 cells. With respect to antiviral activity, the best results were obtained for the sulfated polysaccharides that inhibited the replication of HSV-1, BoHV-1, and PV-1 mainly in time 0 h of infection. The antiviral activity evaluated by IF showed inhibitions that corroborate those presented by plaque assay. The PCR performed for the addition of PSLe in HSV-1 replication resulted in partial inhibition of DNA synthesis. There was no inhibition of nucleic acid of poliovirus by PSLe and PSAb. The evaluation of the plaque size for PSLe in HSV-1, BoHV-1 and PV-1 replication, and for PSAb in PV-1 replication, resulted in a decrease in plaque area in comparison to control viruses. There was no virucidal activity and inhibition of viral penetration by the polysaccharide tested. PSAb significantly inhibited the adsorption of the PV-1. The PCAb did not show any inhibition of viral experiments carried out, even at high concentrations. These results suggest that PSLe inhibits the replication of HSV-1, BoHV-1 and PV-1 in the early stages as well as the LeP for BoHV-1 and PV-1 and the PSAb to PV-1. We also suggest that the PSAb and PSLe inhibit viral spread between cells. It is possible observe that the sulfated polysaccharides have greater antiviral activity and that this activity decreases by carboxymethylation. However, further studies are needed to determine the exact action mechanism.

Keywords: Herpes virus. Poliovirus. Antiviral agents.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Casos de poliomielite registrados e estimados* entre os anos de 1985 e 2010 em todo o mundo.....	10
Figura 2 – Estrutura química dos primeiros antivirais	13
Figura 3 – Corpo de frutificação do <i>L. edodes</i>	19
Figura 4 – Corpo de frutificação do <i>A. brasiliensis</i>	21
Figura 5 – Estrutura de um pentassacarídeo de heparina, um polissacarídeo sulfatado.....	23
Figura 6 – Molécula de quitosana antes e após o processo de carboximetilação.....	24
Figura 7 – Sítios de replicação primária do poliovírus e dispersão anormal do vírus para o sistema nervoso central	26
Figura 8 – Lesões labiais (A e B) e de gengiva (C) decorrentes da infecção recorrente do HSV	29

LISTA DE ABREVIATURAS

BoHV	herpes vírus bovino
FIV	vírus da imunodeficiência felina
HBV	vírus da hepatite B
HCV	vírus da hepatite C
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HSV	herpes simplex vírus
IBR	rinotraqueíte infecciosa bovina
LeP	polissacarídeo de <i>Lentinula edodes</i>
PCAb	polissacarídeo carboximetilado de <i>Agaricus brasiliensis</i>
PSAb	polissacarídeo sulfatado de <i>Agaricus brasiliensis</i>
PSLe	polissacarídeo sulfatado de <i>Lentinula edodes</i>
PV	poliovírus
RSV	vírus respiratório sincicial
SARS	síndrome respiratória aguda grave
VSV	vírus da estomatite vesicular
VZV	varicela-zoster vírus
WEE	vírus da encefalite eqüina do oeste
WHO	Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

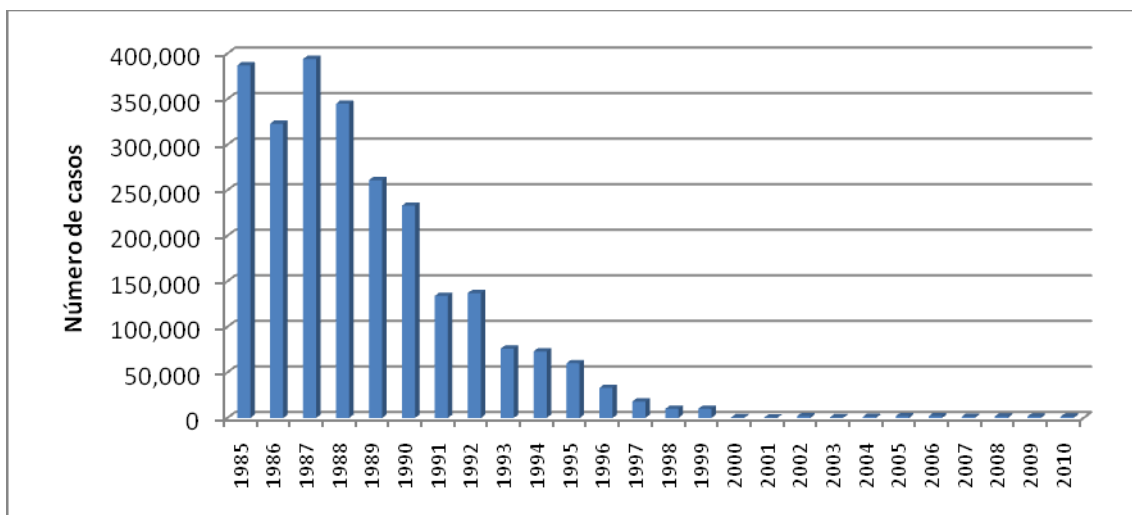
1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	12
2.1	OBJETIVO GERAL	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1	ANTIVIRAIS	13
3.2	ATIVIDADE ANTIVIRAL DE PRODUTOS NATURAIS	15
3.3	LENTINULA EDODES	19
3.4	AGARICUS BRASILIENSIS	20
3.5	POLISSACARÍDEOS	22
3.5.1	Polissacarídeos Sulfatados e Carboximetilados	23
3.6	POLIOVÍRUS	24
3.7	HERPESVÍRUS HUMANO	27
3.8	HERPESVÍRUS BOVINO	29
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
	POLYSACCHARIDE AND EXTRACTS FROM LENTINULA EDODES: STRUCTURAL FEATURES AND ANTIVIRAL ACTIVITY.	44
	ANTIVIRAL ACTIVITY OF A LENTINULA EDODES SULFATED POLYSACCHARIDE IN HERPESVIRUS REPLICATION	50
	ATIVIDADE ANTIVIRAL DE POLISSACARÍDEOS ISOLADOS DE LENTINULA EDODES E AGARICUS BRASILIENSIS NA REPLICAÇÃO DE POLIOVÍRUS 1	65

1 INTRODUÇÃO

O vírus da varíola surgiu a mais de 5000 anos atrás (ESPOSITO; FENNER, 2001; JEROME, 2005) e foi responsável por milhares de mortes durante séculos, até que um programa da Organização Mundial da Saúde promoveu a vacinação em massa da população e culminou em sua erradicação, anunciada em maio de 1980, sendo o último caso registrado em 26 de outubro de 1977 (HENDERSON, 1987). Pandemias, como as causadas pelo vírus influenza e pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), e a emergência de novos agentes infecciosos virais como o causador da síndrome respiratória aguda grave (SARS) (LI et al., 2005a) mostram que a falta de medidas preventivas e terapêuticas para as infecções virais pode resultar em graves consequências (JONES, 1998).

A medicina conta com poucas alternativas para o controle das infecções virais, sendo a vacinação a mais efetiva entre elas (ARVIN; GREENBERG, 2006), pois proporciona uma eficiente e duradoura resposta imune. A erradicação da varíola e o controle da poliomielite (Figura 1), por exemplo, foram realizados tendo como ferramentas as vacinas.

Figura 1 – Casos de poliomielite registrados e estimados* entre os anos de 1985 e 2010 em todo o mundo.



*Casos antes de 2000 são em grande parte compostos de estimativas porque a vigilância das doenças não era suficientemente sensível para fornecer um número preciso de casos. Fonte: compilação realizada pelo Earth Policy Institute, com relatórios da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2007 e 2011).

A vacinação, embora ideal, é uma ferramenta restrita e nem sempre eficaz, e para muitos vírus este tipo de intervenção ainda não existe. Vírus estes como HIV, cujas últimas estimativas da Organização Mundial da Saúde apontam para 34 milhões de pessoas infectadas, ou o vírus da hepatite C que, estima-se, infecta mais de 170 milhões de pessoas

(LAUER; WALKER, 2001; ZUO et al., 2007; KONG et al., 2007), possuem mecanismos de escape da resposta imune, que é a base para uma vacinação eficaz.

A grande incidência de viroses que atingem a população humana mundial, suas características de resistência a resposta imune, bem como a emergência de novas cepas virais, deixam claro que estudos visando o controle de tais doenças, e a eliminação destes agentes infecciosos, constituem uma importante fonte de pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos (BRADY; BERNSTEIN, 2004; GRECO et al., 2007; BILLAUD et al., 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antiviral de polissacarídeos isolados dos basidiomicetos *Lentinula edodes* e *Agaricus brasiliensis*, e seus derivados sulfatados e carboximetilados, na replicação do herpes simplex vírus 1, herpesvírus bovino 1 e poliovírus 1 *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

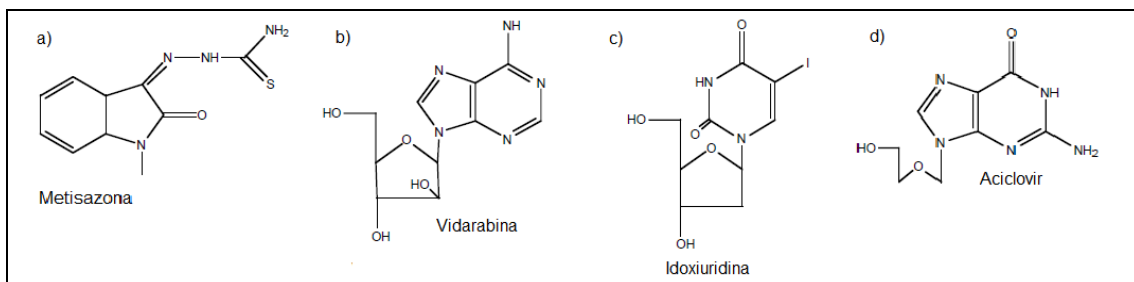
- Avaliar a toxicidade do polissacarídeo natural (LeP) e seu derivado sulfatado (PSLe) de *Lentinula edodes* e dos polissacarídeos sulfatado (PSAb) e carboximetilado (PCAb) de *Agaricus brasiliensis* em células HEp-2 pelo ensaio do MTT.
- Avaliar a atividade antiviral do LeP, PSLe, PSAb e do PCAb em diferentes tempos de adição nas infecções do HSV-1, BoHV-1 e PV-1.
- Avaliar a atividade antiviral do LeP, PSLe, PSAb e do PCAb por reação de imunofluorescência.
- Avaliar os polissacarídeos quanto a sua atividade direta na partícula viral.
- Avaliar a inibição da síntese do genoma viral pelo LeP, PSLe, PSAb e PCAb.
- Avaliar a inibição da dispersão viral pelo LeP, PSLe, PSAb e do PCAb.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ANTIVIRAIS

Há mais de 60 anos os virologistas travam uma luta incessante com um único objetivo: desenvolver fármacos que possam parar a replicação viral sem danificar as células do hospedeiro. No início, o pouco conhecimento sobre as bases moleculares da célula, bem como um parco entendimento sobre a replicação viral nas suas diversas formas levaram a descrença em uma substância seletiva para a replicação viral (JONES, 1998). Apesar do controle da infecção viral parecer improvável diversos compostos foram avaliados para este fim, culminando com a utilização da tiosemicarbazona, primeiro, na década de 50, no tratamento das infecções causadas pelo vírus vaccínia (HAMRE et al., 1950; BROWNLEE; HAMRE, 1951; THOMPSON et al., 1951), e mais tarde, década de 60, seu derivado a metisazona (Figura 2a), na profilaxia e tratamento da varíola (JONES, 1998).

Figura 2 – Estrutura química dos primeiros antivirais.



Adaptado de Jones (1998)

A terapia antiviral se desenvolveu lentamente no início. Mesmo após uma década de pesquisas nenhum composto com real seletividade havia sido identificado, até que em meados da década de 60 a idoxiuridina (Figura 2c), um análogo de nucleosídeo, foi utilizado apresentando seletividade no tratamento da infecção por herpes simplex vírus (HSV) (KAUFMAN; HEIDELBERGER, 1964). Apesar da tão desejada seletividade e de sua eficiência no tratamento e controle das viroses muitas substâncias apresentavam um problema quando administradas como fármacos de aplicação sistêmica: alta toxicidade. A pesquisa com substâncias antivirais esbarrou então em outra barreira, a necessidade do desenvolvimento de fármacos com pouca toxicidade sistêmica e alta seletividade viral. Dois fatores que, na maioria das vezes, são contrários. A 9-beta-D-arabinofuranosiladenina (ARA-A), conhecida como vidarabina (Figura 2b), mostrou pouca toxicidade sistêmica, mas sua eficiência é baixa

em comparação a outros fármacos utilizados no tratamento do HSV e varicela-zoster vírus (VZV) (SCHABEL, 1968; BUCHANAN; HESS, 1985; JONES, 1998; FIELD et al, 2006), pois a forma trifosfatada da molécula pode ser gerada em qualquer célula, infectada ou não. No final da década de 1970, foi desenvolvida a acicloguanosina (ou aciclovir, nome adotado pela United States Adopted Names) (Figura 2d), este análogo de nucleosídeo apresentou uma alta seletividade para o tratamento de herpesvirus, pois, possui maior afinidade com a timidina quinase viral do que com a celular (JONES, 1998; JEROME, 2005). Entretanto, sua toxicidade sistêmica é alta quando utilizado por um tempo prolongado, causando principalmente nefrotoxicidade (FLEISCHER; JOHNSON, 2010), e em alguns casos neurotoxicidade (EMST; FRANEY, 1998; CHEVRET et al., 2006).

Por sua possível seletividade por enzimas virais os análogos de nucleosídeo foram o alvo das pesquisas com antivirais até o final da década de 1980. Com o avanço tecnológico e um maior conhecimento da biologia molecular e do ciclo replicativo dos vírus, novos possíveis alvos para a terapia antiviral foram descobertos (JONES, 1998).

A década de 1980 marcou também a emergência de doenças virais como o HIV, com elevada importância epidemiológica, o que levou a um grande investimento em pesquisas com antivirais, mas voltados para uma gama restrita de patógenos (WIGG, 2002)

Embora a importância das viroses na saúde humana em todo o mundo seja clara, poucos são os antivirais disponíveis para seu tratamento e a maioria deles destinados ao controle de poucos vírus, como do HIV, vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), vírus influenza, HSV, VZV e citomegalovirus (DE CLERCQ, 2004; DE CLERCQ, 2005; DE CLERCQ; FIELD, 2006).

Outro fator importante é que o processo de desenvolvimento de novos antivirais é longo e complexo, iniciando-se com pesquisas *in vitro*, com modelos animais e depois pacientes voluntários, com um índice de sucesso baixo. Apenas 20% dos projetos para novos fármacos chegam a um candidato para uso clínico e desses apenas 10% acabam sendo registrados (PAUWELS, 2006).

Muitos dos compostos testados e já utilizados contra vírus possuem alguma toxicidade (EMST; FRANEY, 1998; DE CLERCQ, 2001; WAUGH et al., 2002; CALMY et al., 2009). A emergência de doenças virais, como a SARS, descrita em 2003 (LI et al., 2005a), bem como cepas resistentes a quimioterapia atual, como por exemplo, herpesvírus, HBV e HIV (RICHMAN, 2006), corroboram a importância da realização de pesquisas com novas fontes de moléculas bioativas, como compostos de origem natural, para o tratamento das infecções virais.

3.2 ATIVIDADE ANTIVIRAL DE PRODUTOS NATURAIS

A toxicidade de muitos compostos antivirais é uma das principais barreiras para a realização de um tratamento efetivo, pois, implica em sua utilização por períodos relativamente curtos. Uma alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos antivirais são os produtos de origem natural, os quais possuem uma baixa toxicidade. Há milhares de anos produtos derivados de fontes naturais são utilizados, na medicina popular, no tratamento de várias doenças inclusive as infecciosas (BALBACH, 1992; COSTA, 1992). Sua ampla diversidade estrutural e atividade biológica, além de serem reconhecidas pela indústria farmacêutica (STROHL, 2000), caracterizam os produtos naturais como fonte de moléculas ou modelos para o desenvolvimento de fármacos (NIELSEN, 2002). Apesar de se caracterizarem como excelente fonte para biomoléculas com propriedades terapêuticas, inclusive para o tratamento de doenças infecciosas (CLARDY; WALSH, 2004), uma ínfima parte de toda biodiversidade foi analisada com este fim até o momento (HARVEY, 1999; COS et al., 2006).

Embora os produtos de origem natural tenham sido analisados apenas em parte, diversos trabalhos têm avaliado e comprovado sua atividade antiviral. A maioria utilizou como fonte plantas utilizadas na medicina popular (RUFFA et al., 2004).

Preparações de extratos derivados destes produtos constituem o primeiro ponto de observação para atividades biológicas, pois, reproduzem sua utilização popular como infusões. Diversos trabalhos mostraram a atividade antiviral de plantas e fungos pela avaliação de extratos aquosos e alcoólicos (Tabela 1) para diversos vírus como HSV, BoHV e HIV.

Essa inibição viral inicial pressupõe a existência de moléculas específicas, dissolvidas nos extratos, que estariam exercendo a atividade antiviral sozinhas ou em sinergismo. Através de métodos bioquímicos específicos é possível isolar diversas frações e identificar seus principais componentes.

Tabela 1 – Lista de extratos de plantas e fungos com atividade antiviral

Origem	Atividade antiviral para	Tipo de extrato	Fonte
<i>Fuscoporia obliqua</i>	Vírus da imunodeficiência humana (HIV) tipo 1	Aquoso	Ichimura et al., 1998
<i>Phyllanthus orbicularis</i>	herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) e Herpes simplex vírus tipo 2 (HSV-2)	Aquoso	Barrio & Parra, 2000
<i>Agaricus brasiliensis</i>	vírus da encefalite equina do oeste	Aquoso	Sorimachi et al., 2001
<i>Tuberaria lignosa e Sanguisorba minor magnolii</i>	HIV	Aquoso	Bedoya et al., 2001
<i>Hypericum connatum</i>	vírus da imunodeficiência felina (FIV)	Metanólico	Schmitt et al., 2001
27 ervas medicinais da China	vírus respiratório sincicial (RSV)	Aquoso	Ma et al., 2002
7 plantas medicinais da Indonésia	herpes simplex vírus tipo 1 (HSV-1) e poliovírus (PV)	Metanólico	Devehat et al., 2002
<i>Spirulina maxima</i>	HSV-1, HSV-2, vírus da pseudo-raiva, citomegalovírus humano e adenovírus	Aquoso	Corona et al., 2002
<i>Youngia japonica</i>	RSV	Etanólico	Ooi et al., 2004
15 plantas medicinais da Argentina	HSV-1, HSV-2, vírus bovino da diarreia viral e vírus influenza A	Metanólico	Ruffa et al., 2004
<i>Sambucus nigra, Urtica dioica e Parietaria diffusa</i>	FIV	Aquoso	Uncini Manganelli et al., 2005
5 plantas medicinais da Etiópia	HSV-1, vírus coxsackie B3 e vírus influenza A	Metanólico	Gebre-Mariam et al., 2006
<i>Guazuma ulmifolia e Stryphnodendron adstringens</i>	PV-1 e BoHV-1	Aquoso	Felipe et al., 2006
<i>Geranium sanguineum</i>	vírus influenza A	Metanólico	Sokmen et al., 2005
<i>Fructus Ligustri Lucidi</i>	HCV	Aquoso	Kong et al., 2007
<i>Rhodiola kirilowii</i>	HCV	Etanólico	Zuo et al., 2007
<i>Agaricus brasiliensis</i>	PV-1	Aquoso e etanólico	Faccin et al., 2007
<i>Lentinula edodes</i>	BoHV-1 e PV-1	Aquoso e etanólico	Rincão et al., 2012

Os compostos isolados destes extratos e que apresentaram atividade antiviral são variados tendo representantes como fenóis, proteínas, polissacarídeos entre outras (Tabela 2). O mecanismo de ação destas moléculas também é variado, agindo em diferentes estágios da replicação viral como adsorção (CHATTOPADHYAY et al., 2007), penetração (GU et al., 2007), síntese de proteínas e ácidos nucleicos, ou na partícula já formada inativando-a (EKBLAD et al., 2010), ou impedindo sua dispersão (SADDI, et al., 2007), ou ainda como imunomoduladores (BRANDT; PIRAINO, 2000).

Tabela 2 – Lista de compostos extraídos de plantas e fungos com atividade antiviral

Origem	Atividade antiviral para	Tipo de molécula	Fonte
<i>Rozites caperata</i>	HSV-1, HSV-2, VZV, vírus da influenza A e RSV	proteína	Piraino & Brandt, 1999
<i>Grifola frondosa</i>	HSV-1	proteína	Gu et al., 2007
<i>Phyllanthus urinaria</i>	HSV-1 e HSV-2	tanino	Yang et al., 2007
<i>Terminalia arjuna</i>	HSV-2	tanino	Cheng et al., 2002
<i>Porphyridium</i> sp., <i>P. aeruginosum</i> e <i>Rhodella reticulata</i>	vírus da leucemia de murinos e vírus do sarcoma de murinos	polissacarídeos	Talyshinsky et al., 2002
<i>Sargassum patens</i>	HSV-1	polissacarídeos	Zhu et al., 2006
<i>Antrodia camphorata</i>	HBV	polissacarídeos	Lee et al., 2002
<i>Pleurotus tuber-regium</i>	HSV-1 e HSV-2	polissacarídeos	Zhang et al., 2004
<i>Coriolos versicolor</i>	HIV-1	polissacaropeptídeo	Collins & Ng, 1997
<i>Ganoderma lucidum</i>	HSV-1 e HSV-2	polissacaroproteínas	Eo et al., 2000
<i>Ganoderma lucidum</i>	HSV-1 e HSV-2	proteoglicana	Liu et al., 2004
<i>Cedrela tubiflora</i>	HSV-2 e o vírus da estomatite vesicular (VSV)	polissacarídeo	Craig et al., 2001
<i>Stylogne cauliflora</i>	HCV	oligofenóis	Hegde et al., 2003
<i>Inonotus hispidus</i>	vírus da influenza tipos A e B	fenóis	Awadh Ali et al., 2003
<i>Geranium sanguineum</i>	vírus influenza A	polifenóis	Sokmen et al., 2005
<i>Hypsizigus marmoreus</i>	vírus Epstein-Barr	esteróis	Akihisa et al., 2005
<i>Ganoderma pfeifferi</i>	HSV-1 e influenza do tipo A	triterpenos	Mothana et al., 2003
<i>Artemisia arborescens</i>	HSV-1 e HSV-2	óleo essencial	Saddi, et al., 2007
<i>Schefflera heptaphylla</i>	RSV	ácido cafeoilquínico	Li et al., 2005b
<i>Heteropteris aphrodisiaca</i>	PV-1 e o BoHV-1	nitro composto alifático	Melo et al., 2008
<i>Agaricus brasiliensis</i>	PV-1	polissacarídeos	Faccin et al., 2007
<i>Agaricus brasiliensis</i>	BoHV-1	polissacarídeos	Minari et al., 2011
<i>Lentinula edodes</i>	BoHV-1 e PV-1	polissacarídeos	Rincão et al., 2012

A maioria dos trabalhos que avaliou a atividade antiviral de produtos naturais se concentra em extratos e moléculas isoladas de organismos de origem vegetal, principalmente plantas medicinais e algas, e fúngica, principalmente de fungos macroscópicos, miceliais e com corpo de frutificação (GU et al., 2007).

Os fungos, em especial aqueles que apresentam uma estrutura macroscópica de reprodução, o corpo de frutificação, tem despertado o interesse dos pesquisadores para as propriedades farmacológicas de moléculas isoladas de seu micélio ou corpo de frutificação, principalmente polissacarídeos, por possuírem baixa toxicidade e atividade antitumoral (WANG; ZHANG, 2009). Além destas, outras propriedades bioativas já foram mostradas como atividade antibiótica, antifúngica, antiviral, antitumoral, imunomoduladora, antialérgica, anti-inflamatória entre outras (KANENO et al., 2004; LINDEQUIST et al., 2005), o que, somando-se ao longo histórico de utilização de cogumelos na medicina popular de vários países asiáticos corroboram sua importância como fonte de novos fármacos.

Os cogumelos possuem uma história bem estabelecida como fonte alimentar e medicinal. Por suas propriedades são apreciados em muitos países, principalmente em terapias orientais tradicionais de alguns países asiáticos. Mesmo na medicina moderna são utilizados compostos bioativos derivados de cogumelos. Nos últimos cinquenta anos vários estudos mostraram o potencial de extratos e compostos isolados de cogumelos para o tratamento e prevenção do câncer (LINDEQUIST et al., 2005; GU; BELURY, 2005; ELLERTSEN et al., 2006; MIYAJI et al., 2006, ZONG et al., 2012). As propriedades anticarcinogênicas de muitos compostos podem evidenciar um potencial antiviral, pois, estão geralmente, relacionadas a atividade regulatória ou inibitória de síntese de ácidos nucleicos e, portanto, poderiam agir diretamente inibindo a ação de polimerases e assim bloqueando replicação do genoma viral, ou poderiam ainda apresentar uma atividade indireta como imunomoduladores.

Estima-se que existam aproximadamente 140.000 espécies de cogumelos no mundo, dos quais somente 10% seriam conhecidos, e apenas 5% já foram estudados. Mesmo assim, são poucos os exemplos destes fungos cujas atividades biológicas foram avaliadas (LINDEQUIST et al., 2005). Os fungos são, portanto, uma excelente fonte para pesquisas com novos antivirais, pois, apesar da pequena porcentagem estudada da diversidade dos fungos, muitos trabalhos têm avaliado e mostrado a atividade antiviral de extratos e compostos isolados destes organismos.

A pesquisa com antivirais obtidos de fungos tem mostrado que esta propriedade pode estar presente em várias moléculas diferentes como polissacaropeptídeos (COLLINS; NG, 1997; EO et al., 2000; SORIMACHI et al., 2001), polissacarídeos (ICHIMURA et al., 1998; LEE et al., 2002; FACCIN et al., 2007; CARDOZO et al., 2011; RINCÃO et al., 2012), proteínas (PIRAINO; BRANDT, 1999; GU et al., 2007), triterpenos (MOTHANA et al., 2003), fenóis (AWADH ALI et al., 2003), esteróis (AKIHISA et al., 2005). Esta diversidade de compostos possibilita a atividade antiviral contra uma gama enorme de vírus tais como HIV-1, HSV-1 e 2, VZV, vírus da influenza A e B, RSV, vírus da encefalite equina do oeste (WEE), PV-1, BoHV-1, HBV, vírus Epstein-Barr entre outros.

Os membros da divisão Basidiomycota são fungos macroscópicos formadores de cogumelos. Dentre todos os exemplos de fungos com atividade antiviral citados, grande parte são basidiomicetos. Muitas espécies deste grupo tornaram-se objeto de grande interesse, devido a seu valor nutricional e propriedades farmacológicas (GUTERREZ et al., 2004). Entre estas, os basidiomicetos *Agaricus brasiliensis* e *Lentinula edodes* possuem

interessantes propriedades nutricionais e farmacológicas já comprovadas que os tornam fontes potenciais de compostos antivirais.

3.3 *LENTINULA EDODES*

O basidiomiceto *Lentinula edodes* (BERKELEY) PEGLER [= *Lentinus edodes* (BERKELEY) SINGER] (Figura 3), é um cogumelo comestível, popularmente conhecido por shiitake (SINGER, 1961). Por todas as suas propriedades nutritivas e medicinais, esse cogumelo é o segundo mais cultivado e popular do mundo (CHANG, 1996; SUGUI et al., 2003).

Figura 3 – Corpo de frutificação do *L. edodes*



foto adaptada de Wasser (2010)

Sua composição varia entre 85 a 95% de água (PRZYBYLOWICZ; DONOGHUE, 1990), e quando desidratado, aproximadamente 58-60% da massa é de carboidratos, 20-23% de proteínas, 9-10% de fibras, 3-4% de lipídios, 4,7% íons K, P, Na, Ca e Fe, além das vitaminas niacina, B2, B1 e a provitamina D2, a mais abundante (MIZUNO, 1995; SASAKI, 1997; WASSER, 2010).

A importância terapêutica de *L. edodes* é conhecida desde a dinastia Ming (1368-1644) através do relato de que o shiitake aumentava a vigor e energia e era efetivo no tratamento de hemorragias cerebrais (ITO, 1978). Muitos compostos com propriedades bioativas importantes como proteínas, lipídeos, carboidratos, fibras, minerais, vitaminas e ergosterol já foram isolados do Shiitake (TERASHITA et al., 1990).

Estes compostos representam de fato, apenas 5 a 15% de todo o fungo, e alguns são alvos de muitos estudos atuais, como por exemplo, o polissacarídeo lentinan que

foi isolado pela primeira vez por Chihara et al. (1970), e mostrou elevada atividade imunopotenciadora e antimetastásica (SUZUKI et al., 1994; KUPFAHL et al. 2006), antitumoral (ZHANG et al., 2005; MARUYAMA et al., 2006), antibacteriana, antifúngica, antiviral e antidiabética (JONG; BIRMINGHAM, 1993; MARKOVA et al., 2003) entre outras. Muitos outros compostos foram isolados de *L. edodes* nos últimos anos, e testados quanto suas propriedades terapêuticas em inúmeras áreas (ISRILIDES et al., 2008; LEE et al., 2009).

Apesar das propriedades farmacológicas já comprovadas poucos trabalhos avaliaram a atividade antiviral de compostos isolados e extratos totais do *L. edodes*. Por exemplo, Yoshida et al. (1988) observaram que extratos de *L. edodes* inibiram a adsorção do HIV aos receptores celulares CD4; Kaneko; Chiahara (1992) descreveram uma atividade protetora de extratos de *L. edodes* contra o VSV; Sasaki et al. (2001) demonstraram a atividade antiviral dos extratos do micélio e do meio de cultura de *L. edodes* para o VSV em células Vero. O Lentinan inibe a atividade do HIV-1 em linfócitos T (TOCHIKURA et al., 1988). Extratos do meio de cultura do shiitake inibiram a replicação do herpes simplex vírus 1 (SARKAR et al., 1993). Uma proteína, isolado do corpo de frutificação, denominada Lentin, inibiu a atividade da transcriptase reversa do HIV-1 (NGAI & NG, 2003). Extratos aquosos e etanólicos do corpo de frutificação do shiitake apresentaram atividade inibitória para o poliovírus 1 e herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) (RINCÃO et al., 2012). Está bem evidenciado, portanto, que as propriedades farmacológicas e atividades terapêuticas de *L. edodes*, justificam o isolamento e caracterização de novos compostos com potencial atividade antiviral.

3.4 *AGARICUS BRASILIENSIS*

O cogumelo *Agaricus brasiliensis* (= *Agaricus Blazei* Murill ss. Heinemann) (Figura 4), conhecido popularmente como Cogumelo do Sol, Cogumelo de Deus e “Himematsutake”, é um basidiomiceto natural do sudeste do Brasil (WASSER et al., 2002). Ele é tradicionalmente utilizado como alimento ou consumido na forma de chá, por ser descrito, popularmente, com propriedades terapêuticas contra várias doenças, como câncer, diabetes, arteriosclerose e hepatite (ELLERTSEN et al., 2006; GRINDE et al., 2006).

Figura 4 – Corpo de frutificação do *A. brasiliensis*



(Foto obtida de Cia dos Cogumelos - <http://www.ciadoscogumelos.com.br/agaricus.aspx>)

A. brasiliensis desenvolve um corpo de frutificação constituído de 85-87% de água, e quando desidratado, é rico em proteínas (40-45%), carboidratos (3-4%), fibras dietéticas (6-8%), lipídios (3-4%) e vitaminas (especialmente B1, B2 e niacina). Ergosterol (0,1-0,2%) e ácido linoléico (70-80% de lipídios totais) são os lipídios predominantes. Outros compostos não voláteis também são encontrados, como por exemplo, açúcares solúveis, mais comumente a arabinose, glicose e trealose (BELLINI et al., 2003).

Vários compostos foram isolados deste basidiomiceto, desde o meio de cultura até o corpo de frutificação. Estes compostos bem como extratos formulados a partir de fragmentos do organismo, apresentaram diversas propriedades farmacológicas e de interesse clínico como imunomodulatórias (KAWAGISHI et al., 1989 e 1990; ITOH et al., 1994; ELLERTSEN et al., 2006), antimutagênicas (GUTERREZ et al., 2004; GAMEIRO, 2005). Embora as propriedades biológicas do *A. brasiliensis* estejam bem caracterizadas, sua atividade antiviral não foi muito avaliada.

Alguns poucos trabalhos avaliaram a atividade antiviral de *A. brasiliensis*. Sorimachi et al. (2001), mostraram a inibição completa do efeito citopático induzido pelo WEE em células vero, através do tratamento com frações do micélio de *A. brasiliensis*. Bruggemann et al. (2006), mostraram a atividade antiviral de extratos do corpo de frutificação deste basidiomiceto contra HSV-1 e BoHV-1. Faccin et al. (2007), constataram que extratos e um polissacarídeo isolado do corpo de frutificação de *A. brasiliensis*, apresentam atividade inibitória contra o PV-1. Cardozo et al. (2011), detectaram a inibição da replicação de HSV-1 e 2 por um polissacarídeo sulfatado deste fungo. Minari et al. (2011), mostraram a atividade antiviral de uma fração polissacarídica e de uma β -glucana, ambas isoladas do corpo de frutificação do *A. brasiliensis*, na replicação do BoHV-1.

A. brasiliensis, assim como *L. edodes*, apresenta propriedades bioativas e atividade antiviral já comprovada que o torna um potencial candidato para o isolamento e caracterização de novos antivirais.

Muitos basidiomicetos, se não todos, possuem polissacarídeos com propriedades bioativas em seu corpo de frutificação, meio de cultura ou micélio. Polissacarídeos isolados de cogumelos são as mais potentes macromoléculas conhecidas com propriedades antitumorais e imunomoduladoras (LEE et al., 2009) e, portanto, fontes potenciais de atividade antiviral.

3.5 POLISSACARÍDEOS

Carboidratos constituem o grupo de moléculas mais abundante da natureza. Seu nome deriva de sua estrutura química, composta principalmente por carbono, hidrogênio e oxigênio. Podem ser classificados em monossacarídeos, compostos por uma única molécula de açúcar; oligossacarídeos e polissacarídeos (KOOLMAN; ROEHM, 2005).

Os polissacarídeos são polímeros naturais, constituídos por monossacarídeos que se unem por ligações glicosídicas. Essa estrutura pode ser linear ou conter ramificações constituídas por cadeias laterais. A fórmula geral para representar a estrutura dos polissacarídeos é $C_x(H_2O)_y$ onde x é normalmente uma variação entre 200 a 2500. Como na maioria das vezes as unidades repetidas no polímero são monossacarídeos de 6 carbonos, a fórmula geral também pode ser representada como $(C_6H_{10}O_5)_n$ onde $40 \leq n \leq 3000$ (ZONG et al., 2012).

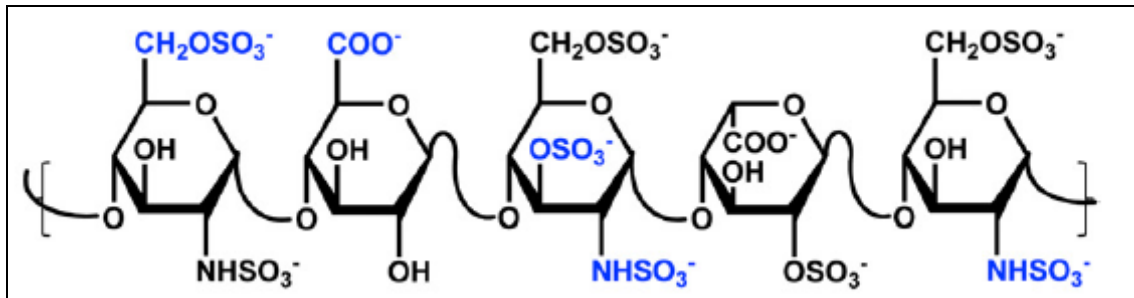
Os polissacarídeos são moléculas que possuem propriedades anticarcinogênicas e imunomoduladoras (ZONG et al., 2012). Estas macromoléculas possuem baixa toxicidade celular e são, há muito tempo, conhecidas por apresentar atividade antiviral (ANDERSSON et al., 1979; GONZALEZ et al., 1987). Essas propriedades podem ser induzidas ou modificadas alterando em parte a estrutura de sua molécula por derivação química (CHEN et al., 2005). Polissacarídeos sulfatados e carboximetilados podem ocorrer naturalmente ou serem sintetizados a partir de moléculas naturais. Nestas moléculas os radicais hidroxilas são parcialmente substituídos por grupos sulfato ou carboximetil (CHAIDEDGUMJORN et al., 2002; MÖLLER et al., 2012). Estes polissacarídeos modificados têm mostrado atividade biológica maior que seus derivados naturais (HUANG et al., 2008a, 2008b).

3.5.1 Polissacarídeos Sulfatados e Carboximetilados

As atividades biológicas de um polissacarídeo dependem principalmente de sua estrutura molecular incluindo a unidade de açúcar, o tipo de ligação glicosídica da cadeia principal, os tipos e grau de polimerização do ramo e flexibilidade e configuração das cadeias (ALBAN et al., 2002; WANG et al., 2002).

Polissacarídeos sulfatados, naturais ou sintetizados são um tipo de polissacarídeo com um grupo sulfato em sua hidroxila (GUO et al., 2009) (Figura 5). Da mesma forma, polissacarídeos carboximetilados, são aqueles que apresentam um radical carboximetil em sua hidroxila (MOURYA et al., 2010) (Figura 6).

Figura 5 – Estrutura de um pentassacarídeo de heparina, um polissacarídeo sulfatado

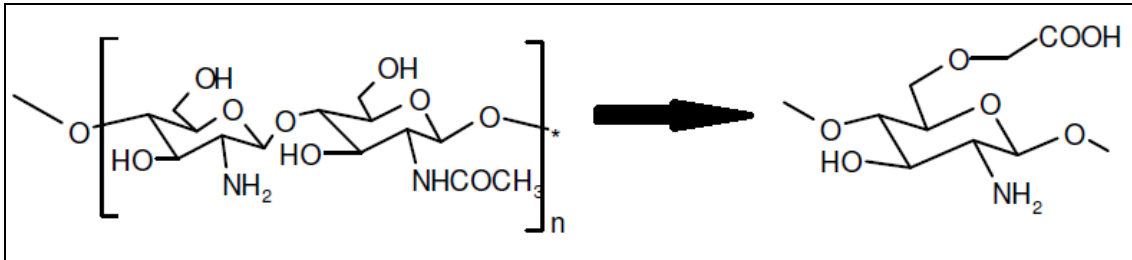


(adaptado de Al-Horani; Desai, 2010)

A alteração química da molécula do polissacarídeo através da adição de grupos sulfato e carboximetil alteram as propriedades bioativas destas moléculas. A sulfatação, através de impedimento estérico e repulsões electrostáticas associados com os grupos sulfato altera a estrutura tridimensional do polissacarídeo, resultando na expansão de cadeia e maior solubilidade em água, que em alguns casos leva a um aumento da bioatividade destas macromoléculas (ZHANG et al., 2004). À carboximetilação podemos atribuir o mesmo efeito (WASSER, 2002; MOURYA et al., 2010).

Tanto polissacarídeos sulfatados quanto carboximetilados de ocorrência natural ou artificialmente sintetizados apresentam várias bioatividades. Os polissacarídeos sulfatados apresentam atividades anti-tumoral, antioxidante, anticoagulante e imunorreguladora (XIA et al., 2000; TALARICO et al., 2004; CRESCENZI et al., 2002; PUPÉREZ et al., 2002; ZHANG et al., 2012). Os polissacarídeos carboximetilados já foram relatados como apresentando atividade imunomodulatória (PAULIK et al. 1996; MAJTAN et al., 2005) e anticarcinogênica (KIHO et al. 1994; YOSHIDA et al. 1996).

Figura 6 – Molécula de quitosana antes e após o processo de carboximetilação



(adaptado de Mourya et al., 2010)

Vários desses polissacarídeos modificados já foram avaliados e apresentaram a atividade antiviral. A maioria dos trabalhos relata a atividade antiviral de polissacarídeos sulfatados (CHATTOPADHYAY et al., 2007; EKBLAD et al., 2010; PUJOL et al., 2012), mas por suas características os polissacarídeos carboximetilados poderiam apresentar efeito similar.

Hoje sabe-se que os principais fatores que contribuem para atividade antiviral, juntamente com o esqueleto do polímero e o tipo de anion (sulfatado, sulfonado, carboximetilado, fosfatado), são peso molecular, sua conformação, frequência e distribuição de cargas (LUSCHER-MATTLI, 2000). É provável que compostos polianiónicos possam interagir com glicoproteínas de membrana, carregadas positivamente, de vírus com envelope e, assim, inibir a ligação viral (WITVROUW et al., 1994).

3.6 POLIOVÍRUS

Os poliovírus (PV) são vírus não-envelopados, com um capsídeo formado por 60 subunidades protéicas constituídas por quatro diferentes polipeptídios, VP1, VP2, VP3 e VP4. Possui simetria icosaédrica (26 a 30 nm de diâmetro), genoma constituído de RNA de fita simples com polaridade positiva, e aproximadamente 7500 nucleotídeos. Toda a biossíntese do vírus ocorre no citoplasma (RACANIELLO, 2006).

O agente patogênico da doença, o vírus da poliomielite (posteriormente denominado poliovírus), foi identificado em 1908 (LANDSTEINER and POPPER, 1908 apud RACANIELLO, 2006). Recentemente o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) modificou o nome de poliovírus para Enterovírus humano C (*Human enterovírus C*) (ICTV, 2011). Nesta última classificação o vírus é classificado no gênero *Enterovirus*, pertencentes à família *Picornaviridae*, ordem *Picornavirales*, a qual possui muitos outros patógenos para humanos e animais. Entre estes

podemos citar os rinovírus (*Rhinovirus*) e vírus da hepatite A (*Hepatovirus*) para humanos, e os vírus da febre aftosa (*Aphthovirus*) e o vírus da encefalomiocardite de roedores (*Cardiovirus*) (JAWETZ et al., 2005; ICTV, 2011).

Os membros do gênero *Enterovirus* (cuja replicação primária ocorre na região da orofaringe ou na mucosa do trato intestinal), são patógenos de grande importância para a saúde humana e além do PV podemos citar os coxsackievirus e echovirus (MUELLER et al., 2005). Estima-se, que os membros desse gênero sejam responsáveis por infecções em um bilhão de pessoas no mundo (MELNICK, 1996; OBERSTE et al., 2000).

O ciclo de replicação do vírus ocorre em aproximadamente 8 horas, gerando uma progênie de mais de 100.000 virions por célula (VIGNUZZI et al., 2005). Tem início com o reconhecimento do receptor celular, uma glicoproteína pertencente à superfamília das imunoglobulinas denominada CD155 (MENDELSON et al., 1989), pelas proteínas do capsídeo viral. O genoma é liberado para o citoplasma celular, onde é traduzido em proteínas iniciais, as quais são responsáveis por alterações fisiológicas da célula. Após a replicação do genoma, da síntese das proteínas virais e da maturação, os novos virions são externalizados quando a célula hospedeira perde sua integridade e sofre um processo de lise (RACANIELLO, 2006).

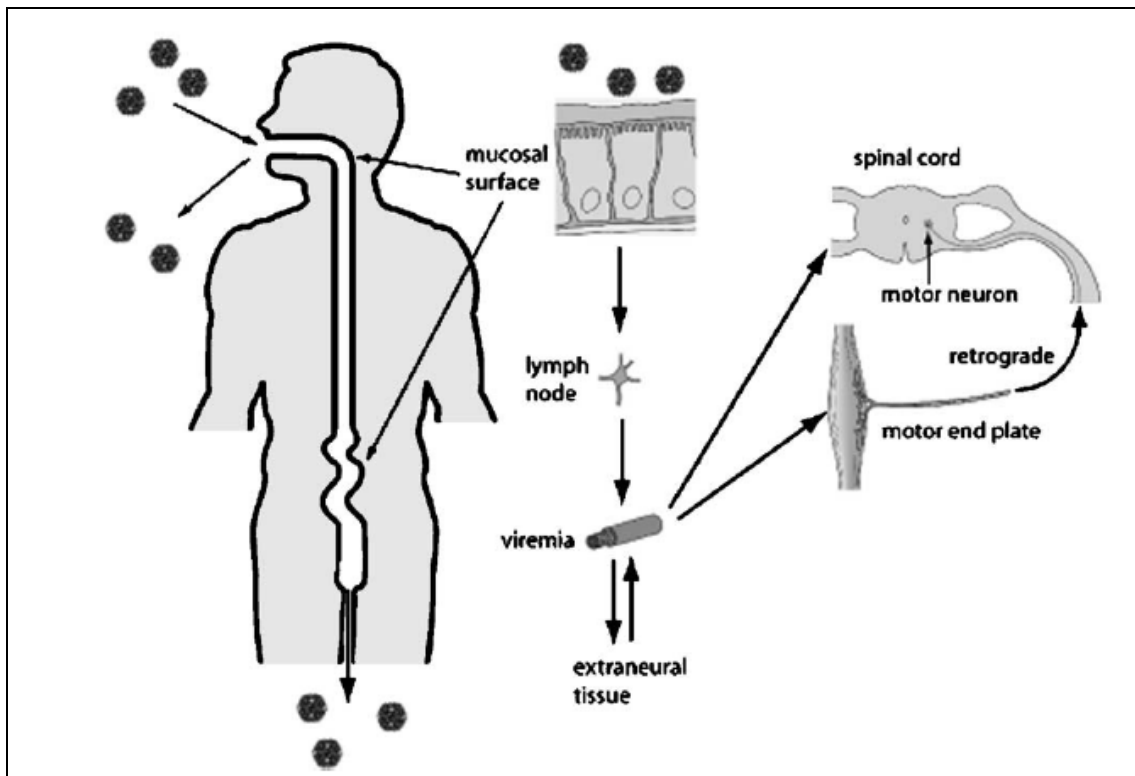
As infecções por poliovírus são em sua maioria inaparentes, mas podem ocorrer quadros clínicos que variam de uma doença febril leve a paralisia grave e permanente (JAWETZ et al., 2005).

O poliovírus pode causar infecção abortiva, que é a forma mais comum da doença, além da forma não paralítica (meningite asséptica) (PALLANSCH; ROOS, 2001). A infecção pode, entretanto, progredir para um quadro mais grave, que consiste na replicação do vírus em células do sistema nervoso central; porém, somente 1 a 2% dos indivíduos infectados desenvolvem esse quadro (NATHANSON; MARTIN, 1979; RACANIELLO, 2006) (Figura 7). A doença é caracterizada por um quadro de paralisia flácida, que atinge principalmente os membros inferiores. No entanto, todas as alterações fisiológicas observadas, são decorrentes da destruição das células nervosas, pois o poliovírus não se multiplica no músculo *in vivo* (JAWETZ et al., 2005). Existem três sorotipos de poliovírus (tipos 1, 2 e 3), todos com capacidade de provocar a doença paralítica (RACANIELLO, 2006).

A transmissão do vírus ocorre via fecal-oral. Portanto a disseminação, e conseqüentemente sobrevivência do vírus, são dependentes somente da replicação do vírus no trato alimentar. Por esse fato, e pela baixa porcentagem de casos de infecção do sistema

nervoso central, a doença neurológica é considerada um acidente decorrente da replicação entérica (RACANIELLO, 2006).

Figura 7 – Sítios de replicação primária do poliovírus e dispersão anormal do vírus para o sistema nervoso central



(Reproduzido a partir de RACANIELLO, 2006).

O controle da doença e a tentativa de erradicação em todo mundo é realizado principalmente pelo uso de vacinas. Apesar dos esforços para erradicar o vírus, nos últimos anos a doença tem se mostrado constante em países da África e Ásia com a ocorrência aproximada de 1000 casos por ano de 2000 a 2010 (Figura 1) (WHO – WILD POLIOVIRUS WEEKLY UPDATE, 2007). Embora o vírus ainda esteja presente na população humana o quadro atual é bastante diferente daquele de 1988, onde foram registrados 350.000 casos da doença (WHO - POLIOMYELITIS, 2006).

Além da importância clínica do PV, este vírus é facilmente cultivado em células de linhagem contínua (PALLANSCH; ROOS, 2001), e as cepas vacinais podem ser manipuladas em laboratório, com segurança, o que permite que estes sejam utilizados como modelo para diversos estudos relacionados aos picornavírus e outros vírus de RNA.

3.7 HERPESVÍRUS HUMANO

O herpes simplex vírus tipo 1 (HSV-1) é o vírus comumente conhecido por causar lesões labiais (o herpes labial). De acordo com o ICTV (2011) este vírus é também denominado *Herpesvirus humano 1*, pertencente ao gênero *Simplexvirus*, sub família *Alphaherpesvirinae*, família *Herpesviridae*, ordem *Herpesvirales*.

Os vírus da família *Herpesviridae* possuem como característica comum a mesma morfologia e a capacidade de reativação após um período de latência (MIRANDA et al., 2002; KAYSER et al., 2005).

O HSV-1 é um vírus envelopado com capsídeo icosaédrico formado por 162 capsômeros (KIMBERLIN, 2003). O genoma viral é representado por uma molécula de DNA dupla fita que contém cerca de 150 Kb que codificam cerca de 70 proteínas. Durante a infecção ocorre a circularização do DNA viral no núcleo da célula hospedeira (ROIZMAN et al., 2007).

O capsídeo possui cerca de 100nm de diâmetro e a partícula viral completa aproximadamente 150nm (GILBERT et al., 2002). O virion apresenta como porção mais externa um envelope lipídico, no qual estão inseridas glicoproteínas virais com funções diversas como adsorção viral e inibição do complemento pelas vias clássica e alternativa, como gE, gI e C-1 (ROIZMAN et al., 2007). Entre o envelope lipídico e o capsídeo a partícula viral apresenta um material protéico e amorfo, denominado tegumento. Esta porção é composta, em maior proporção, pela proteína ICP5 (ROIZMAN et al., 2007).

A replicação do herpes simplex vírus ocorre em três etapas distintas. Na primeira são produzidas proteínas que regulam a replicação viral (alfa proteínas – imediato), em seguida as proteínas que participam da síntese e encapsidação de novas cópias do genoma viral (beta proteínas – precoce) e por fim são produzidas as proteínas estruturais (gama proteínas – tardio). Caso alguma destas fases transcricionais seja interrompida a replicação do HSV é bloqueada, assim estas etapas são potenciais alvos para a terapia viral (ROIZMAN et al., 2007).

A replicação do HSV-1 tem início com a adsorção do vírus a receptores específicos da superfície das células hospedeiras, como, por exemplo, o heparan sulfato. Em seguida, a glicoproteína gD pode interagir com três tipos distintos de receptores secundários, responsáveis pela entrada do vírus na célula hospedeira. (HUBER et al., 2001; ZHOU et al., 2002; ZHOU; ROIZMAN, 2006).

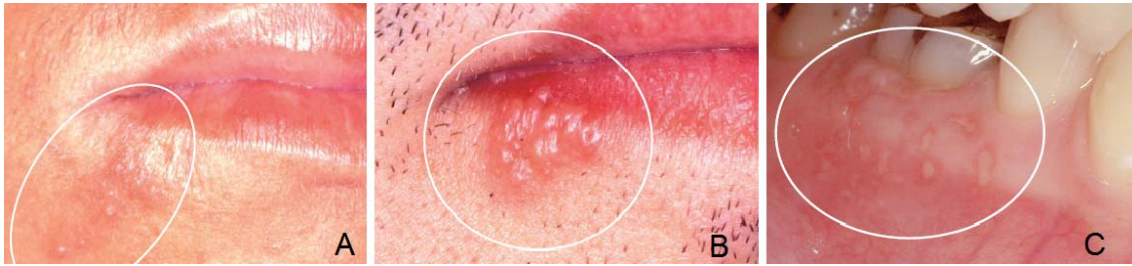
Após a adsorção o vírus funde seu envelope com a membrana celular da célula do hospedeiro. A fusão culmina com a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular, seu transporte até o núcleo e a translocação do genoma viral para dentro do envoltório nuclear através dos poros na membrana.

Duas proteínas do tegumento são importantes aqui, a proteína denominada VHS (virus host shutoff), permanece no citoplasma e desencadeia degradação do RNAm celular. A α -TIF (VP16) é liberada no núcleo juntamente com o DNA viral e regula a expressão de genes α (WHITLEY; ROIZMAN, 2001) iniciando a replicação viral. A transcrição e a síntese protéica ocorrem em uma sequência coordenada, em três fases: imediata (α), precoce (β), e tardia (γ) (HANCOCK, et al., 2006). As proteínas sintetizadas nas fases imediata e precoce são enzimas, que promovem a replicação do DNA viral e a degradação do RNAm celular. Após a replicação do DNA, os genes tardios são transcritos e codificam proteínas estruturais do capsídeo e outras proteínas que formarão os vírions. As proteínas do capsídeo são transportadas para o núcleo, onde ocorre sua montagem e encapsidação do genoma viral. Após a montagem das partículas virais, o nucleocapsídeo, através da fusão com a membrana nuclear interna, é envelopado, e liberado para o espaço perinuclear. Em seguida as partículas virais se fundem com a membrana nuclear externa, e os capsídeos não-envelopados são liberados no citoplasma, onde são re-envelopados por vesículas derivadas do complexo de Golgi. (MELANCON et al., 2004).

O HSV-1 é transmitido por contato direto da mucosa ou pele, desde que lesionada, com secreções que contenham o vírus. Ao atingirem os nervos sensoriais as partículas virais são transportadas, via axônio, retrogradamente, até o gânglio trigêmeo, onde, geralmente, estabelecem infecções latentes por toda vida do hospedeiro (BRADY; BERNSTEIN, 2004).

A infecção pelo HSV-1 pode resultar em diversos quadros clínicos como doença orofaríngea, lesões mucocutâneas, lesões genitais, ceratoconjuntivite, encefalites podem causar morte (COREY; SPEAR, 1986; MORFIN; THOUVENOT, 2003; KIMBERLIN, 2003; KIMBERLIN; WHITLEY, 2005). O quadro de lesão orolabial é o mais comum caracterizando-se por vesículas decorrentes da destruição das células da derme, e pode ser precedida por uma vermelhidão em torno dos lábios, formigamento ou queimação local (WHITLEY, 2002) (Figura 8).

Figura 8 – Lesões labiais (A e B) e de gengiva (C) decorrentes da infecção recorrente do HSV



(Adaptado de Consolaro e Consolaro, 2009).

3.8 HERPESVÍRUS BOVINO

O herpesvirus bovino do tipo 1, anteriormente denominado Vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina ou Vulvovaginite Pustular Infecciosa, um importante patógeno do gado, é classificado como pertencente ao gênero *Varicellovirus*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, família *Herpesviridae* (SPILKI et al., 2004; JONES et al., 2005; FELIPE et al., 2006) e desde 2009 agrupado na ordem *Herpesvirales* (ICTV, 2011). Esta subfamília possui como características, um curto ciclo reprodutivo, causar a destruição das células infectadas com eficiência e a capacidade em estabelecer latência em gânglios sensoriais (ROIZMAN; PELLETT, 2001).

O BoHV possui um genoma, constituído de DNA de fita dupla e linear, envolvido por um capsídeo de simetria icosaédrica, constituído por 162 capsômeros atingindo 100 nm de diâmetro. O envelope viral contém espículas de glicoproteínas com aproximadamente 8 nm de comprimento. A replicação ocorre no núcleo da célula infectada e é semelhante a descrita para o HSV-1 (JAWETZ et al., 2005).

Várias doenças importantes do gado são atribuídas à infecção por BoHV-1, principalmente, uma doença respiratória denominada rinotraqueíte bovina infecciosa (IBR) (FELIPE et al., 2006). As infecções por BoHV-1 raramente resultam em morte, entretanto, podem causar imunossupressão, o que permite a instalação de infecções secundárias, como as causadas por *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Haemophilus somnus* (JONES et al., 2005), as quais podem ser fatais. Para diminuir o grande impacto causado por este patógeno na criação do gado, vacinas com vírus atenuado estão sendo utilizadas, e mostrando resultados positivos. Entretanto, o controle das infecções por BoHV-1 ainda é difícil, em decorrência da latência estabelecida pelo vírus após a replicação primária ou após a vacinação (HURK et al., 2001). O vírus vacinal que estabelece latência pode, durante a reativação, sofrer mudança para a forma patogênica (TIKOO et al., 1995).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBAN, S., SCHAUERTE, A.; FRANZ, G. Anticoagulant sulfated polysaccharides: Part I. Synthesis and structure-activity relationships of new pullulan sulfates. *Carbohydrate Polymers*, 47, 267–276, 2002.
- AL-HORANI, R.A. and DESAI, U.R. Chemical sulfation of small molecules advances and challenges. *Tetrahedron*, 66:2907–2918, 2010.
- AKIHISA, T.; FRANZBLAU, S.G.; TOKUDA, H.; TAGATA, M.; UKIYA, M.; MATSUZAWA, T.; METORI, K.; KIMURA, Y.; SUZUKI, T.; YASUKAWA, K. Antitubercular activity and inhibitory effect on Epstein-Barr virus activation of sterols and polyisoprenepolyols from an edible mushroom, *Hypsizigus marmoreus*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28:1117-1119, 2005.
- ANDERSSON, L.O.; BARROWCLIFFE, T.W.; HOLMER, E.; JOHNSON, E.A.; SODERSTROM, G. Molecular weight dependency of the heparin potentiated inhibition of thrombin and activated factor X. Effect of heparin neutralization in plasma. *Thrombosis Research*, 15:531–541, 1979.
- ARVIN, A.M. and GREENBERG, H.B. New viral vaccines. *Virology*, 344:240-249, 2006.
- AWADH ALI, N.A.; MOTHANA, R.A.A.; LESNAU, A.; PILGRIM, H.; LINDESQUIST, U. Antiviral activity of *Inonotus hispidus*. *Fitoterapia*, 74:483-485, 2003.
- BALBACH, A. *As Plantas que Curam*. 2 ed. São Paulo: Editora Missionária, 1992.
- BARRIO, G. and PARRA, F.. Evaluation of the antiviral activity of an aqueous extract from *Phyllanthus orbicularis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 72:317-322, 2000.
- BEDOYA, L.M.; SANCHEZ-PALOMINO, S.; ABAD, M.J.; BERMEJO, P.; ALCAMI, J. Anti-HIV activity of medicinal plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 77: 113-116, 2001.
- BELLINI, M.F.; GIACOMINI, N.L.; EIRA, A.F.; RIBEIRO L.R.; MANTOVANI, M.S. Anticlastogenic effect of aqueous extracts of *Agaricus blazei* on CHO-k1 cells, studying different developmental phases of the mushroom. *Toxicology in Vitro*, 17:465-469, 2003.
- BILLAUD, G.; THOUVENOT, D.; MORFIN, F. Drug targets in herpes simplex and epstein barr virus infections. *Infectious Disorders Drug Targets*, 2:117-25, 2009.
- BRADY, R.C. and BERNSTEIN, D.I. Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Research*, 61:73–81, 2004.
- BRANDT, C.R. and PIRAINO, F. Mushroom antivirals. *Recent Research Developments for Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 4:11-26, 2000.
- BROWNLEE, K.A. and HAMRE, D.A. Studies on chemotherapy of vaccinia virus 1. An experimental design for testing antiviral agents. *Journal of Bacteriology*, 61:127-134, 1951.

BRUGGEMANN, R.; ORLANDI, J.M.; BENATI, F.J.; FACCIN, L.C.; MANTOVANI, M.S.; NOZAWA, C.; LINHARES, R.E.C. Antiviral activity of *Agaricus blazei* Murrill ss. Heinem extract against human and bovine herpesviruses in cell culture. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37:561–565, 2006.

BUCHANAN, R.A. and HESS, F. Viderabine (Vira-A): pharmacology and clinical experience, p. 109–143. *In*: HUGAR, D. *Viral Chemotherapy*, v. 2. Oxford: Pergamon Press, 1985.

CALMY, A.; BERNARD, H.; COOPER, D.A.; CARR, A. A new era of antiretroviral drug toxicity. *Antiviral Therapy*, 14:165-179, 2009.

CARDOZO, F.T.G.S.; CAMELINI, C.M.; MASCARELLO, A.; ROSSI, M.J.; NUNES R.J.; BARARDI, C.R.M.; MENDONÇA, M.M.; SIMÕES, C.M.O. Antitherpetic activity of a sulfated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* mycelia. *Antiviral Research*; 92:108–114, 2011.

CHATTOPADHYAY, K.; MATEU, C.G.; MANDAL, P.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B.; RAY, B. Galactan sulfate of *Grateloupia indica*: Isolation, structural features and antiviral activity. *Phytochemistry*; 68:1428–1435, 2007.

CHAIDEDGUMJORN, A.; TOYODA, H.; WOO, E.R.; LEE, K.B.; KIM, Y.S.; TOIDA, T.; IMANARI, T. Effect of (1→3) and (1→4) – linkages of fully sulfated polysaccharides on their anticoagulant activity. *Carbohydrate Research* 337:925–933, 2002.

CHANG, R. Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition Reviews*, 54:91-93, 1996.

CHEN, J.Y.; WU, G.R.; WANG, J.A.; LU, C.M.; ZHANG, W.M.; JIANG, J.H. Sulfation techniques of *Bletilla striata* polysaccharide by orthogonal design. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 1:43–46, 2005.

CHENG, H.Y.; LIN, C.C.; LIN, T.C. Antitherpes simplex virus type 2 activity of casuarinin from the bark of *Terminalia arjuna* Linn. *Antiviral Research* 55:447-455, 2002.

CHEVRET, L.; DEBRAY, D.; POULAIN, C.; DURAND, P.; DEVICTOR, D. Neurological toxicity of acyclovir: report of a case in a six-month-old liver transplant recipient. *Pediatric Transplantation*, 10:632-634, 2006.

CHIHARA, G.; HAMURO, J.; MAEDA, Y.Y.; ARAI, Y.; FUKUOKA, F. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially Lentinan, from *Lentinus edodes* (BERK.) SING. (an edible mushroom). *Cancer Research*, 30:2776-2781, 1970.

CLARDY, J. and WALSH, C. Lessons from natural molecules. *Nature* 432:829-837, 2004.

COLLINS, R.A. and NG, T.B. Polysaccharopeptide from *Coriolus versicolor* has potential for use against human immunodeficiency virus type 1 infection. *Pharmacology Letters - Life Sciences*, 60: 383-387, 1997.

CONSOLARO, A. e CONSOLARO, M.F.M.O. Diagnóstico e tratamento do herpes simples recorrente peribucal e intrabucal na prática ortodôntica. *Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial*, 14:16-24, 2009.

- CORONA, A.H.; NIEVES, I.; MECKES, M.; CHAMORRO, G.; BARRON, B.L. Antiviral activity of *Spirulina maxima* against herpes simplex virus type 2. *Antiviral Research*, 56:279-285, 2002.
- COREY, L. and SPEAR, P. G. Infections with herpes simplex viruses 1. *New England Journal of Medicine*, 314:686 – 691, 1986.
- COS, P.; VLIETINCK, A.J.; VANDEN-BERGHE, D.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro ‘proof-of-concept’. *Journal of Ethnopharmacology*, 106: 290-302, 2006.
- COSTA, M.A. *Plantas e Saúde: Guia Introductório à Fitoterapia*. Distrito Federal: Secretaria de Saúde. 1992.
- CRAIG, M.I.; BENENCIA, F.; COULOMBIÉ, F.C. Antiviral activity of an acidic polysaccharides fraction extracted from *Cedrela tubiflora* leaves. *Fitoterapia*, 72:113-119, 2001.
- CRESCENZI, V.; FRANCESCANGELI, A.; RENIER, D.; BELLINI, D. New cross-linked and sulfated derivatives of partially deacetylated hyaluronan: synthesis and preliminary characterization. *Biopolymers*, 64(2):86-94, 2002.
- DE CLERCQ, E. Antiviral drugs: current state of the art. *Journal of Clinical Virology* 22:73-89, 2001.
- DE CLERCQ, E. Antiviral drugs in current clinical use. *Journal of Clinical Virology*, 30:115-133, 2004.
- DE CLERCQ, E. Recent highlights in the development of new antiviral drugs. *Current Opinion in Microbiology*, 8:552-560, 2005.
- DE CLERCQ, E. and FIELD, H.J. Antiviral prodrugs – the development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy. *British Journal of Pharmacology*, 147:1-11, 2006.
- DEVEHAT, F.L.L.; BAKHTIAR, A.; BEZIVIN, C.; AMOROS, M.; BOUSTIE, J. Antiviral and cytotoxic activities of some Indonesian plants. *Fitoterapia*, 73:400-405, 2002.
- ELLERTSEN, L.K.; HETLAND, G.; JOHNSON, E.; GRINDE, B. Effect of a medicinal extract from *Agaricus blazei* Murill on gene expression in a human monocyte cell line as examined by microarrays and immuno assays. *International Immunopharmacology*, 6:133-143, 2006.
- EMST, M.E. and FRANEY, R.J. Acyclovir and gancyclovir-induced neurotoxicity. *Annals of Pharmacotherapy*, 32: 111-113, 1998.
- EO, S.K.; KIM, Y.S.; LEE, C.K.; HAN, S.S. Possible mode of antiviral activity of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* on herpes simples viruses. *Journal of Ethnopharmacology*, 72:475-481, 2000.
- EKBLAD, M.; ADAMIK, B.; BERGSTROM, T.; JOHNSTONE, K.D.; KAROLI, T.; LIU, L.; FERRO, V.; TRYBALA, E. A highly lipophilic sulfated tetrasaccharide glycoside related

to muparfostat (PI-88) exhibits virucidal activity against herpes simplex virus. *Antiviral Research*; 86:196–203, 2010.

ESPOSITO, J.J. and FENNER, F. Poxviruses. Chapter: 85. *In*: FIELDS, B.N., KNIPE, D., HOWLEY, P.M., GRIFFIN, R.A., LAMB, M.A., MARTIN, B., ROIZMAN, B., STRAUS, S.S. (eds.). *Fields Virology*. 4. ed. United States of America: Lippincott Williams & Wilkins Desktop Division, 2001.

FACCIN, L.C.; BENATI, F.; RINCÃO, V.P.; MANTOVANI, M.S.; SOARES, S.A.; GONZAGA, M.L.; NOZAWA, C.; LINHARES R.E.C. Antiviral activity of aqueous and ethanol extracts and of an isolated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* against poliovirus type 1. *Letters in Applied Microbiology*, 45:24-28, 2007.

FELIPE, A.M.M.; RINCÃO, V.P.; BENATI, F.J.; LINHARES, R.E.C.; GALINA, K.J.; TOLEDO, C.E.M.; LOPES, G.C.; MELLO, J.C.P.; NOZAWA, C. Antiviral Effect of *Guazuma ulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on Poliovirus and Bovine Herpesvirus. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29:1092-1095, 2006.

FLEISCHER, R. and JOHNSON, M. Acyclovir Nephrotoxicity: A Case Report Highlighting the Importance of Prevention, Detection, and Treatment of Acyclovir-Induced Nephropathy. *Case Reports in Medicine*, 2010.

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

GAMEIRO, P.H. EFEITO ANTIMUTAGÊNICO DO EXTRATO AQUOSO DE *Agaricus brasiliensis* EM CULTURA DE LINFÓCITOS HUMANOS. 2005. 48 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

GEBRE-MARIAM, T.; NEUBERT, R.; SCHMIDT, P.C.; WUTZLER, P.; SCHMIDTKE, M. Antiviral activities of some Ethiopian medicinal plants used for the treatment of dermatological disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 104:182-187, 2006.

GILBERT, C.; BESTMAN-SMITH, J.; BOIVIN, G. Resistance of Herpesviruses to Antiviral Drugs: Clinical Impacts and Molecular Mechanisms. *Drug Resistance Updates*, 5:88-114: 2002.

GONZALEZ, M.; ALARCON, B.; CARRASCO, L. Polysaccharides as antiviral agents: antiviral activity of carrageenan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31:1388-1393, 1987.

GRINDE, B.; HETLAND, G.; JOHNSON, E. Effects on gene expression and viral load of a medicinal extract from *Agaricus blazei* in patients with chronic hepatitis C infection. *International Immunopharmacology*, 6:1311-1314, 2006.

GRECO, A.; DIAZ, J.J.; THOUVENOT, D.; MORFIN, F. Novel targets for the development of anti-herpes compounds. *Infectious Disorders - Drug Targets*. 7(1):11-8, 2007.

GU, C.Q.; LI, J.W.; CHAO, F.; JIN, M.; WANG, X.W.; SHEN, Z.Q. Isolation, identification and function of a novel anti-HSV-1 protein from *Grifola frondosa*. *Antiviral Research*, 75:250-257, 2007.

- GU, Y.H. and BELURY, M.A. Selective induction of apoptosis in murine skin carcinoma cells (CH72) by an ethanol extract of *Lentinula edodes*. *Cancer Letters*, 220:21-28, 2005.
- GUO, Z.; HU, Y.; WANG, D.; MA, X.; ZHAO, X.; ZHAO, B.; WANG, J.; LIU, P. Sulfated modification can enhance the adjuvanticity of lentinan and improve the immune effect of ND vaccine. *Vaccine*, 27:660–665, 2009.
- GUTERREZ, Z.R.; MANTOVANI, M.S.; EIRA, A.F.; RIBEIRO, L.R.; JORDÃO, B.Q. Variation of the antimutagenicity effects of water extracts of *Agaricus blazei* Murrill in vitro. *Toxicology in Vitro*, 18:301-309, 2004.
- HAMRE, D.; BERNSTEIN, J.; DONOVICK, R. Activity of p-aminobenzaldehyde, 3-thiosemicarbazone on vaccinia virus in the chick embryo and in the mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 73:275-278, 1950.
- HANCOCK, M. H.; CORCORAN, J. A.; SMILEY, J. R. Herpes Simplex Virus Regulatory Proteins VP16 and ICP0 Counteract an Innate Intranuclear Barrier to Viral Gene Expression. *Virology*, 352:237-252, 2006.
- HARVEY, A.L. Medicines from nature: are natural products still relevant to drugs discovery? *Trends In Pharmacological Sciences*, 20: 196-198, 1999.
- HEGDE, V.R.; PU, H.; PATEL, M.; DAS, R.P.; BUTKIEWICZ, N.; ARREAZA, G.; GULLO, V.P.; CHAN, T. Two compounds from the Plant *Stylogne cauliflora* as Inhibitors of HCV NS3 Protease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13:2925-2928, 2003.
- HENDERSON, D.A. Principles and lessons from the smallpox eradication programme. *Bulletin World Health Organization*, 65:535, 1987.
- HUANG, X.; HU, Y.; ZHAO, X.; LU, Y.; WANG, J.; ZHANG, F.; SUN, J. Sulfated modification can enhance the adjuvant activity of astragalus polysaccharide for ND vaccine. *Carbohydrate Polymers*, 73: 303–308, 2008a.
- HUANG, X.; WANG, D.; HU, Y.; LU, Y.; GUO, Z.; KONG, X.; SUN, J. Effect of sulfated astragalus polysaccharide on cellular infectivity of infectious bursal disease virus. *International Journal of Biological Macromolecules*, 42:166–171, 2008b.
- HUBER, M.T.; WISNER, T.W.; HEGDE, N.R. Herpes simplex virus with highly reduced gD levels can efficiently enter and spread between human keratinocytes. *Journal of Virology*, 74:10309-10318, 2001.
- HURK, S.D.L.; LOEHR, B.I., BABIUK, L.A. Immunization of livestock with DNA vaccines: current studies and future prospects. *Vaccine*, 19: 2474-2479, 2001.
- ICHIMURA, T.; WATANABE, O.; MARUYAMA, S. Inhibition of HIV-1 protease by water-soluble lignin-like substance from an edible mushroom, *Fuscoporia obliqua*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 62:575-577, 1998.
- ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus taxonomy: 2011 release. 2011. Disponível em: <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2011>>. Acessado em: 07/05/2012.

- ISRAILIDES, C.; KLETSAS, D.; ARAPOGLOU, D.; PHILIPPOUSSIS, A.; PRATSINIS, H.; EBRINGEROVA, A.; HRIBALOVA, V.; HARDING, S.E. *In vitro* cytostatic and immunomodulatory properties of the medicinal mushroom *Lentinula edodes*. *Phytomedicine* 15:512–519, 2008.
- ITO, T. Cultivation of *Lentinus edodes*, p. 461-473. *IN*: CHANG, S.T. and HAYES, W.A. *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms*. London: Academic Press, Inc., 1978.
- ITOH, H.; AMANO, H.; NODA, H. Inhibitory action of a (1-6)- β glucan-protein complex (FIII-2b) isolated from *Agaricus blazei* Murrill (“Himematsutake”) on meth a fibrosarcoma bearing mice and its antitumor mechanism. *Japan Journal of Pharmacology*, 66:265-271, 1994.
- JAWETZ, E.; MELNICK, J. e ADELBERG, E.A. *Microbiologia Médica*, p. 389-401. BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S. e MORSE, S.A. (eds.). *Revisão de conteúdo: SENNA, J.P.; tradução: VOEUX, P.L.* Rio de Janeiro, McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda., 2005.
- JEROME, K.R. The road to new antiviral therapies. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 5:65-76, 2005.
- JONES, C.; GEISER, V.; HENDERSON, G.; JIANG, Y.; MEYER, F.; PEREZ, S.; ZHANG, Y. Functional analysis of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genes expressed during latency. *Veterinary Microbiology*, 113:199-210, 2005.
- JONES, P.S. Strategies for antiviral drug discovery. *Antiviral Chemistry Chemotherapy*, 9:283-302, 1998.
- JONG, S.C. and BIRMINGHAM, M. Medicinal and therapeutic value of the shiitake mushroom. *Advances in Applied Microbiology*, 39:153-184, 1993.
- KANEKO, Y. and CHIHARA, G. Potentiation of host resistance against microbial infections by Lentinan and its related polysaccharides, p. 201-206. *IN*: FRIDMAN et al. (eds.), *Microbial Infections*. New York, 1992.
- KANENO, R.; FONTANARI, L.M.; SANTOS, S.A.; DI STASI, L.C.; RODRIGUES FILHO, E.; EIRA, A.F. Effects of extracts from Brazilian sun-mushroom (*Agaricus blazei*) on the NK activity and lymphoproliferative responsiveness of Ehrlich tumor-bearing mice. *Food and Chemical Toxicology*, 42: 909-916, 2004.
- KAYSER F.H.; BIENZ K. A.; ECKERT J.; ZINKERNAGEL R. M. *Medical Microbiology*. 698 pages. United Kingdom: Thieme, 2005.
- KAUFMAN, H.E. and HEIDELBERGER, C. Therapeutic antiviral action of 5-trifluoromethyl 2'deoxyuridine in herpes simplex keratitis. *Science*, 145:585-586, 1964.
- KAWAGISHI, H.; INAGAKI, R.; KANO, T.; MIZUNO, T.; SHIMURA, K.; ITO, H.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydrate Research*, 186:267-274, 1989.
- KAWAGISHI, H.; INAGAKI, R.; KANO, T.; SHIMURA, K.; ITO, H.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T. Formolysis of a potent antitumor (1-6) β -D-glucan-protein complex from

Agaricus blazei fruiting bodies and antitumor activity of the resulting products. Carbohydrate Polymers, 12:393-403, 1990.

KIHO, T.; YOSHIDA, I.; KATSURAGAWA, M.; SAKUSHIMA, M.; USUI, S.; UKAI, S. Polysaccharides in fungi: XXXIV. A polysaccharide from the fruiting bodies of *Amanita muscaria* and the antitumor activity of its carboxymethylated product. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 17:1460–1462, 1994.

KIMBERLIN, D.W. Herpes simplex virus infections of the central nervous system. Seminars in Pediatric Infectious Diseases, 2:83-89, 2003.

KIMBERLIN, D.W. and WHITLEY, R.J. Neonatal Herpes: What Have We Learned? Seminars in Pediatric Infectious Diseases, 16:7-16, 2005.

KOOLMAN, J. and ROEHM, K.H. Color atlas of biochemistry. 2. ed. United Kingdom: Thieme. p. 467, 2005.

KONG, L.; LI, S.; HAN, X.; XIANG, Z.; FANG, X.; LI, B.; WANG, W.; ZHONG, H.; GAO, J.; YE, L. Inhibition of HCV RNA-dependent RNA polymerase activity by aqueous extract from *Fructus ligustri* Lucidi. Virus Research, 128:9-17, 2007.

KUPFAHL, C.; GEGINAT, G.; HOF, H. Lentinan has a stimulatory effect on innate and adaptive immunity against murine *Listeria monocytogenes* infection. International Immunopharmacology, 6:686-696, 2006.

LANDSTEINER, K. and POPPER, E., 1908. Mikroskopische präparate von einem menschlichen und zwei affentückermarker. Wein klin Wschr. 21, 1930.

LAUER, G.M. and WALKER, B.D. Hepatitis C virus infection. New England Journal of Medicine, 345:41, 2001.

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

LEE, H.H.; LEE, J.S.; CHO, J.Y.; KIM, Y. E.; HONG, E. K. Study on Immunostimulating Activity of Macrophage Treated with Purified Polysaccharides from Liquid Culture and Fruiting Body of *Lentinus edodes*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 19(6):566–572, 2009.

LI, S.; CHEN, C.; ZHANG, H.; GUO, H.; WANG, H.; WANG, L.; ZHANG, X.; HUA, S.; YU, J.; XIAO, P.; LI, R.; TAN, X. Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. Antiviral Research, 67:18-23, 2005a.

LI, Y.; BUT, P.P.H.; OOI, V.E.C. Antiviral activity and mode of action of caffeoylquinic acids from *Schefflera heptaphylla* (L.) Frodin. Antiviral research, 68:1-9, 2005b.

LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T.H.J.; LICH, W.D.J. The Pharmacological Potential of Mushrooms. Oxford University Press, 2:285-299, 2005.

- LIU, J.; YANG, F.; YE, X.J.; TIMAN, K.A.; ZHENG, Y.; WANG, Y.H. Possible mode of action of antiherpetic activities of a proteoglycan isolated from the mycelia of *Ganoderma lucidum* in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, 95:265-272, 2004.
- LUSCHER-MATTLI, M. Polyanions--a lost chance in the fight against HIV and other virus diseases? *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 11: 249-259, 2000.
- MA, S.C.; DU, J.; BUT, P.P.H.; DENG, X.L.; ZHANG, Y.W.; OOI, V.E.C.; XU, H.X.; LEE, S.H.S.; LEE, S.F. Antiviral Chinese medicinal herbs against respiratory syncytial virus. *Journal of Ethnopharmacology*, 79:205–211, 2002.
- MARKOVA, N.; KUSSOVSKI, V.; DRANDARSKA, I.; NIKOLAEVA, S.; GEORGIEVA, N.; RADOUCHEVA, T. Protective activity of Lentinan in experimental tuberculosis. *International Immunopharmacology*, 3:1557-1562, 2003.
- MARUYAMA, S.; SUKEKAWA, Y.; KANEKO, Y.; FUJIMOTO, S. Anti tumor activities of lentinan and micellapist in tumor-bearing mice. *Gan To Kagaku Ryoho*, 33:1726-1729, 2006.
- MAJTAN, J.; KOGAN, G.; KOVACOVA, E.; BILIKOVA, K.; SIMUTH, J. Stimulation of TNF- α Release by Fungal Cell Wall Polysaccharides. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, 60:921-926, 2005.
- MENDELSON, C.; WIMMER, E.; RACANIELLO, V.R. Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell*, 56:855– 865, 1989.
- MELNICK, J.L. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses, p. 655-712. vol. 1. *In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, R.A.; LAMB, M.A.; MARTIN, B.; ROIZMAN, B. and STRAUS, S.S. (eds.). Fields Virology*. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996.
- MELANCON, J. M.; FOSTER, T. P.; KOUSOULAS, K. G. Genetic Analysis of the Herpes Simplex Virus Type 1 UL 20 Protein Domains Involved in Cytoplasmic Virion Envelopment and Virus-Induced Cell Fusion. *Journal of Virology*, 14:7329 -7343, 2004.
- MELO, F.L.; BENATI, F.J.; JUNIOR, W.A.R.; MELLO, J.C.P.; NOZAWA, C.; LINHARES R.E.C. The in vitro antiviral activity of an aliphatic nitrocompound from *Heteropteris aphrodisiaca*. *Microbiological Research*, 163:136-139, 2008.
- MINARI, M.C.; RINCAO, V.P.; SOARES, S.A.; RICARDO, N.M.P.S.; NOZAWA, C.; LINHARES, R.E.C. Antiviral properties of polysaccharides from *Agaricus brasiliensis* in the replication of bovine herpesvirus 1. *Acta virologica* 55:255 – 259, 2011.
- MIRANDA, M. M. F. S. Viroses Dermatópicas. Capítulo 7. *In: SANTOS, N.S.O.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D. (eds). Introdução à Virologia Humana*. 1ed. Guanabara Koogan. p. 75 – 85, 2002.
- MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T. and ASAKURA, A. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from “Himematsutake”, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54: 2889–2896, 1990.

MIZUNO, T. Shiitake, *Lentinus edodes*: functional properties for medicinal and food purposes. *Food Reviews International*, 11:111-128, 1995.

MIYAJI, C.K.; POERSCH, A.; RIBEIRO, L.R.; EIRA, A.F.; CÓLUS, I.M.S. Shiitake (*Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler) extracts as a modulator of micronuclei induced in HEP-2 cells. *Toxicology in Vitro*, 20: 1555–1559, 2006.

MOLLER, S.; SCHMIDTKE, M.; WEISS, D.; SCHILLER, J., PAWLIKE, K.; WUTZLER, P., SCHNABELRAUCH, M. Synthesis and antiherpetic activity of carboxymethylated and sulfated hyaluronan derivatives. *Carbohydrate Polymers*; 90:608– 615, 2012.

MORFIN, F. and THOUVENOT, D. Herpes Simplex Virus Resistance to Antiviral Drugs (Review). *Journal of Clinical Virology*, 26:29-37, 2003.

MOURYA, V.K.; INAMDAR, N.N.; TIWARI, A. Carboxymethyl chitosan and its applications. *Advanced Materials Letters*, 1:11-33, 2010.

MOTHANA, R.A.A.; AWADH Ali, N.A.; JANSEN, R.; WEGNER, U.; MENTEL, R.; LINDEQUIST, U. Antiviral lanostanoid triterpenes from the fungus *Ganoderma pfeifferi*. *Fitotetapia*, 74:177-180, 2003.

MUELLER, S.; WIMMER, E.; CELLO, J. Poliovirus and poliomyelitis: A tale of guts, brains, and an accidental event. *Virus Research*, 111: 175-193, 2005.

NATHANSON, N. and MARTIN, J.R. The epidemiology of poliomyelitis: enigmas surrounding its appearance and disappearance. *American Journal of Epidemiology*, 110: 672-692, 1979.

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

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

OBERSTE, M.S.; MAHER, K.; FLEMISTER, M.R.; MARCHETTI, G.; KILPATRICK, D.R. and PALLANSCH, M.A. Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *Journal Clinical Microbiology*, 38: 1170–1174, 2000.

OOI, L.S.M.; WANG, H.; LUK, C.; OOI, V.E.C. Anticancer and antiviral activities of *Youngia japonica* (L.) DC (Asteraceae, Compositae). *Journal of Ethnopharmacology*, 94:117-122, 2004.

PALLANSCH, M.A. and ROOS R.P. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses, Chapter: 24. IN: FIELDS, B. N.; KNIPE, D.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, R. A.; LAMB, M. A.; MARTIN, B.; ROIZMAN, B. and STRAUS, S. S. (eds.). *Fields Virology*. 4. ed. United States of America: Lippincott Williams & Wilkins Desktop Division, 2001.

PAULIK, S.; SVRCEC, MOJISOVÁ, J.; DUROVE, A.; BENISEK, Z.; HÚSKA, M. The immunomodulatory effect of the soluble fungal glucan (*Pleurotus ostreatus*) on delayed

hypersensitivity and phagocytic ability of blood leucocytes in mice. *Journal of Veterinary Medicine B* 43:129–135, 1996.

PAUWELS, R. Aspects of successful drug discovery and development. *Antiviral Research*, 71:77–89, 2006.

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

PRZYBYLOWICZ, P. and DONOGHUE, J. *Shiitake growers Handbook The art and Science of Mushroom cultivation*. Northwest Mycological Consultant, Inc., United States of America, p. 217, 1990.

PUJOL, C.A.; RAY, S.; RAY, B.; DAMONTE, E.B. Antiviral activity against dengue virus of diverse classes of algal sulfated polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51:412– 416, 2012.

PUPÉREZ, P.; AHRAZEM, O.; LEAL, J.A. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:840-845, 2002.

RACANIELLO, V.R. One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology*, 344: 9-16, 2006.

RICHMAN, D.D. Antiviral drug resistance. *Antiviral Research*, 71:117-121, 2006.

RINCÃO, V.P.; YAMAMOTO, K.A.; RICARDO, N.M.P.S.; SOARES, S.A.; MEIRELLES, L.D.P.; NOZAWA, C.; LINHARES, R.E.C. Polysaccharide and extracts from *Lentinula edodes*: structural features and antiviral activity. *Virology Journal*, 9:37, 2012.

ROIZMAN, B. and PELLETT, P.E. Poxviruses. Chapter: 85. *In*: FIELDS, B.N., KNIPE, D., HOWLEY, P.M., GRIFFIN, R.A., LAMB, M.A., MARTIN, B., ROIZMAN, B., STRAUS, S.S. (eds.). *Fields Virology*. 4th. ed. United States of America: Lippincott Williams & Wilkins Desktop Division, 2001.

ROIZMAN, B., KNIPE, D., WHITLEY, R. Herpes simplex viruses. *In*: KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M., GRIFFIN, D., LAMB, R., MARTIN, M., ROIZMAN, B., STRAUS, S.E. (Eds.), *Fields Virology*, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 2502– 2601, 2007.

RUFFA, M.J.; WAGNER, M.L.; SURIANO, M.; VICENTE, C.; NADINIC, J.; PAMPURO, S.; SALOMÓN, H.; CAMPOS, R.H.; CAVALLARO, L. Inhibitory effect of medicinal herbs against RNA and DNA viruses. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 15:153–159, 2004.

SADDI, M.; SANNA, A.; COTTIGLIA, F.; CHISU, L.; CASU, L.; BONSIGNORE, L.; DE LOGU, A. Antiherpevirus activity of *Artemisia arborescens* essential oil and inhibition of lateral diffusion in Vero cells. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 6:10, 2007.

SARKAR, S.; KOGA, J.; WHITLEY, R.S.; CHATTERJEE, S. Antiviral effect of the extract of culture medium of *Lentinus edodes* mycelia on the replication of herpes simplex virus type 1. *Antiviral Research*, 20:293–303, 1993.

SASAKI, S.H. Protoplastização de *Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler e seu antagonismo sobre o vírus VSA e sobre fungos filamentosos. Monografia: Mestrado em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, p. 6, 1997.

SASAKI, S.H.; LINHARES, R.E.C.; NOZAWA, C.M.; MONTALVÁN, R.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Strains of *Lentinula edodes* suppress growth of phytopathogenic fungi and inhibit Alagoas serotype of vesicular stomatitis virus. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32:52-55, 2001.

SCHABEL, F.M. The antiviral activity of 9-beta-arabino-furanosyladenine (ara-A). *Chemotherapy*, 13:321-338, 1968.

SCHMITT, A.C.; RAVAZZOLO, A.P.; VON POSER, G.L. Investigation of some *Hypericum* species native to Southern of Brazil for antiviral activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 77:239-245, 2001.

SINGER, R. Mushrooms and truffles botany, cultivation and utilization. Leonard Hill Limited: London, p. 272, 1961.

SOKMEN, M.; ANGELOVA, M.; KRUMOVA, E.; PASHOVA, S.; IVANCHEVA, S.; SOKMEN, A.; SERKEDJIEVA, J. In vitro antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from *Geranium sanguineum* L. *Life Sciences*, 76:2981-2993, 2005.

SORIMACHI, K.; IKEHARA, Y.; MAEZATO, G.; OKUBO, A.; YAMAZAKKI, S.; AKIMOTO K.; NIWA, A. Inhibition by *Agaricus blazei* Murrill fractions of cytopathic Effect Induced by Western Equine Encephalitis (WEE) Virus on VERO Cells in vitro. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 65:1645-1647, 2001.

SPIPKI, F.R.; ESTEVES, P.A.; LIMA, M.; FRANCO, A.C.; CHIMINAZZO, C.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; DRIERNEIR, D.; ROEHE, P.M. Comparative pathogenicity of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) subtypes 1 (BHV-1.1) and 2a (BHV-1.2a). *Pesquisa veterinária brasileira: revista do Colégio Brasileiro de Patologia Animal = Brazilian Journal of Veterinary Research*, 24: 43-49, 2004.

STROHL, W.R. The role of natural products in a modern drug discovery program. *Drug Discovery Today*, 5:2, 2000.

SUGUI, M.M.; DE LIMA, P.L.A.; DELMANTO, R.D.; DA EIRA, A.F.; SALVADORI, D. M.F.; RIBEIRO, L.R. Antimutagenic effect of *Lentinula edodes* (BERK.) Pegler mushroom and possible variation among lineages. *Food and Chemical Toxicology*, 41:555-560, 2003.

SUZUKI, M.; TAKATSUKI, F.; MAEDA, Y.Y.; HAMURO, J.; CHIHARA, G. Antitumor and immunological activity of Lentinan in comparison with LPS. *International Journal Immunopharmacology*, 16:463-468, 1994.

TALARICO, L. B.; ZIBETTI, R. G. M.; FARIA, P. C. S.; SCOLARO, L. A.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 34:63-71, 2004.

TALYSHINSKY, M.M.; SOUPRUN, Y.Y.; HULEIHEL, M.M. Anti-viral activity of red microalgal polysaccharides against retroviruses. *Cancer Cell International*, 2:8, 2002.

TERASHITA, T.; KONO, M.; MISHIMA, N.; OBATA, T.; YAMAUCHI, M. The proximate components, free and protein bound amino acids in protein and 5 GMP in fruit bodies of *Lentinus edodes* Singer Shiitake mushroom grown on artificial bed blocks. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 37:528–532, 1990.

THOMPSON, R.L.; PRICE, M.L.; MINTON, S.A. Protection of mice against vaccinia virus by administration of benzaldehyde thiosemicarbazone (18957). *Proceedings Of The Society For Experimental Biology And Medicine*, 78: 11-13, 1951.

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

TOCHIKURA, T.S.; NAKASHIMA, H.; OHASHI, Y.; YAMAMOTO, N. 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. *Medical Microbiology Immunology*, 177:235–244, 1988.

UNAIDS/WHO. AIDS epidemic update: december 2006. World Health Organization, Geneva, 2006.

UNCINI MANGANELLI, R.E.; ZACCARO, L.; TOMEI, P.E. Antiviral activity in vitro of *Urtica dioica* L., *Parietaria diffusa* M. et K. and *Sambucus nigra* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 98:323-327, 2005.

VIGNUZZI, M.; STONE, J.K. and ANDINO, R. Ribavirin and lethal mutagenesis of poliovirus: molecular mechanisms, resistance and biological implications. *Virus Research*, 107: 173-181, 2005.

WANG, Z.; LI, L.; GUO, S.; CAI, M. Review on structure activity relationship of active polysaccharides. *Modern Chemical Industry*, 18–22, 2002.

WANG, X. and ZHANG, L. Physicochemical properties and antitumor activities for sulfated derivatives of lentinan. *Carbohydrate Research* 344(16):2209-2216, 2009.

WASSER, S.P.; DIDUKH, M.Y.; AMAZONAS, M.A.L.A.; NEVO, E.; STAMETS, P.; EIRA, A.F. Is a widely cultivated culinary-medicinal royal sun Agaricus (the Himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill? *International Journal of Medical Mushroom*, 4:267-290, 2002.

WASSER, S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60:258–274, 2002.

WASSER, S.P. Shiitake. In: Coates, P.M.; Betz, J.M.; Blackman, M.R.; Cragg, G.M.; Levine, M.; Moss, J.; White, J.D. (eds.), *Encyclopedia of dietary supplements*, 2th ed. Informa healthcare, New York, pp. 719-726, 2010.

WAUGH, S.M.L.; PILLAY, D.; CARRINGTON, D.; CARMAN, W.F. Antiviral prophylaxis and treatment (excluding HIV therapy). *Journal of Clinical Virology*, 25:241-266, 2002.

WHITLEY, R.J. and ROIZMAN, B. Herpes Simplex Virus infections. *The Lancet*, 357:1513-1518, 2001.

WHITLEY, R.J. Herpes simplex virus infection. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 13:6-11, 2002.

WIGG, M.D. Antivirais, p.47-58. *In*: SANTOS, N.S.O.; ROMANOS, M.T.; WIGG, M.D. (eds), *Introdução à virologia humana*, 3ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2002.

WITVROUW, M.; ESTE, J.A.; MATEU, M.Q.; REYEMEN, D.; ANDREI G, SNOECK, R.; IKEDA, S.; PAUWELS, R.; BIANCHINI, N.V.; DESMYTER, J.; DE CLERQ, E. Activity of a sulfated polysaccharide extracted from the red seaweed *Aghardhiella tenera* against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 5:297-303, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Poliomyelites: Polio caseload*. World Health Organization, Geneva, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Progress in Polio Eradication, Estimated and Reported Polio Cases, 1985-2006*. World Health Organization, Geneva, 2007. Disponível em: <www.polioeradication.org>. Acessado em: 20/02/2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Wild Poliovirus 2000-2011*. World Health Organization, Geneva, 2011. Disponível em: <www.polioeradication.org> Acessado em: 20/02/2012.

XIA, J.; SRIKRISHNAN, T.; ALDERFER, J. L.; JAIN, R. K.; PISKORZ, C. F.; MATTA, K. L. Chemical synthesis of sulfated oligosaccharides with a β -d-Gal-(1 \rightarrow 3)-[β -d-Gal-(1 \rightarrow 4)-(α -l-Fuc-(1 \rightarrow 3)- β -d-GlcNAc-(1 \rightarrow 6)]- α -d-G alNAc sequence. *329:561-577*, 2000.

YANG, C.M.; CHENG, H.Y.; LIN, T.C.; CHIANG, L.C.; LIN, C.C. The in vitro activity of geraniin and 1,3,4,6-tetra-*O*-galloyl- β -D-glucose isolated from *Phyllanthus urinaria* against herpes simplex virus type 1 and type 2 infection. *Journal of Ethnopharmacology*, 110: 555-558, 2007.

YOSHIDA, I.; KIHU, T.; USUI, S.; SAKUSHIMA, M.; UKAI, S. Polysaccharides in fungi. XXXVII. Immunomodulating activities of carboxymethylated derivatives of linear (1 \rightarrow 3)- α -D-glucans extracted from the fruiting bodies of *Agrocybe cylindracea* and *Amanita muscaria*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 19:114-121, 1996.

YOSHIDA, O.; NAKASHIMA, H.; YOSHIDA, T.; KANEKO, Y.; YAMAMOTO, I.; MATSUZAKI, K.; URYU, T.; YAMAMOTO, N. Sulfation of the immunomodulating polysaccharide Lentinan: A novel strategy for antivirals to human immunodeficiency virus (HIV). *Biochemical Pharmacology*, 37:2887-2981, 1988.

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

ZHANG, L.; LI, X.; XU, X.; ZENG, F. Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan. *Carbohydrate Research*, 340: 1515-1521, 2005.

ZHANG, C.Y.; WU, H.W.; WANG, J.; LAN, M.B. Antioxidant properties of polysaccharide from the brown seaweed *Sargassum graminifolium* (Turn.), and its effects on calcium oxalate crystallization. *Marine Drugs*, 10:105-111, 2012.

ZHOU, G.; GALVAN, V.; CAMPADELLI-FIUME, G. Glycoprotein D or J delivered in trans blocks apoptosis in SK-N-SH cells induced by a herpes simplex virus 1 mutant lacking intact genes expressing both glycoproteins. *Journal of Virology*, 74:11782-11791, 2002.

ZHOU, G. and ROIZMAN, B. Construction and properties of a herpes simplex virus 1 designed to enter cells solely via the IL-13 \pm 2 receptor. *Proceedings of the National Academy of Science of the U S A*, 103:5508-5513, 2006.

ZHU, W.; CHIU, L.C.M.; OOI, V.E.C.; CHAN, P.K.S.; ANG JR., P.O. Antiviral property and mechanisms of a sulphated polysaccharide from the brown alga *Sargassum patens* against *Herpes simplex* virus type 1. *Phytomedicine*, 13: 695-701, 2006.

ZONG, A.; CAO, H.; WANG, F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. *Carbohydrate Polymers*, *in press*, 2012.

ZUO, G.; LI, Z.; CHEN, L.; XU, X. Activity of compounds from Chinese herbal medicine *Rhodiola kirilowii* (Regel) Maxim against HCV NS3 serine protease. *Antiviral Research*, 76:86–92, 2007.

RESEARCH

Open Access

Polysaccharide and extracts from *Lentinula edodes*: structural features and antiviral activity

Vinicius Pires Rincão¹, Kristie Aimi Yamamoto¹, Nágila Maria Pontes Silva Ricardo³, Sandra Aguiar Soares³, Luzia Doretto Paccola Meirelles², Carlos Nozawa¹ and Rosa Elisa Carvalho Linhares^{1*}

Abstract

Background: *Lentinula edodes*, known as shiitake, has been utilized as food, as well as, in popular medicine, moreover, compounds isolated from its mycelium and fruiting body have shown several therapeutic properties. The aim of this study was to determine the antiviral activity of aqueous (AqE) and ethanol (EtOHE) extracts and polysaccharide (LeP) from *Lentinula edodes* in the replication of poliovirus type 1 (PV-1) and bovine herpes virus type 1 (BoHV-1).

Methods: The time-of-addition assay was performed at the times -2, -1, 0, 1 and 2 h of the infection. The virucidal activity and the inhibition of viral adsorption were also evaluated. Plaque assay was used to monitor antiviral activity throughout.

Results: The AqE and LeP were more effective when added at 0 h of infection, however, EtOHE was more effective at the times 1 h and 2 h of the infection. AqE, EtOHE and LeP showed low virucidal activity, and the inhibition of viral adsorption was not significant.

Conclusions: The results allowed us to conclude that AqE, EtOHE and LeP act on the initial processes of the replication of both strains of virus.

Keywords: *Lentinula edodes*, Antiviral activity, Poliovirus, Bovine herpesvirus

Background

Currently, there are a little more than 40 drugs approved for clinical use in the treatment of viral infections [1]. Studies regarding these drugs concentrated on synthetic products up to the end of the 80 s, when natural compounds attracted attention because of their efficacy in the inhibition of viruses important for human and animal health [2]. Natural products are recognized by the pharmaceutical industry because of their wide structural diversity, as well as, variety of pharmacological activities [3]. Amongst the sources of natural compounds, the fungi, especially the basidiomycetes, have stimulated interest from investigators.

The basidiomycete *Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler (*Lentinus edodes*), known as shiitake, an edible mushroom native of the East Asia, is valued for its nutritional

and medicinal properties and culinary and industrial applications [4]. Shiitake is the second most popular in the world [5] and in the last decades various compounds with therapeutic properties have been isolated from its mycelium and fruiting body. Some of these have been widely studied, for example, the polysaccharide lentinan which has demonstrated high immunopotentiating and antimetastatic activities [6,7], antitumor activity [8,9], antibacterial, antifungal and antidiabetic activities [10,11], among others. However, few works have examined the antiviral activity of this basidiomycete [12-14].

Poliovirus is a non-enveloped virus with an icosahedral capsid symmetry, and a genome consisting of a positive single-stranded RNA. The virion is classified in the genus *Enterovirus*, belonging to the family *Picornaviridae*, which includes many other pathogens of great importance to humans and other animals [15]. Despite the efforts to eradicate the virus, there were 1352 reported cases of poliomyelitis in African and Asian countries in 2010 [16]. Bovine herpesvirus (BoHV) is an

* Correspondence: relin@uel.br

¹Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid., km 380, CEP: 86051-990, Londrina, Paraná, Brazil
 Full list of author information is available at the end of the article

important pathogen for the cattle industry. Viron belongs to the subfamily *Alphaherpesvirinae*, family *Herpesviridae* [17], has a genome consisting of a linear double-stranded DNA within an icosahedral capsid, enclosed by an envelope. In order to reduce losses caused by BoHV, vaccines consisting of attenuated virus are being utilized with positive results. However, the control of infections is still difficult, due to the latency established by the virus after primary infection or after vaccination [18].

The basidiomycetes show various biological activities and low toxicity what make them a promising source of bioactive molecules. Therefore, the aim of this study was to determine the antiviral activity of aqueous and ethanol extracts and polysaccharide of *Lentinula edodes* in the replication of poliovirus and bovine herpesvirus.

Methods

Cells and virus

HEp-2 cell cultures (human larynx epithelial cells carcinoma-ATCC, CCL-23) were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco-BRL, EUA*), supplemented with 10% fetal bovine serum (*) and 2 mM glutamine (Sigma Chem. Co., EUA**), 100 µg/ml streptomycin (**), 100 IU/ml penicillin (**) and 2.5 µg/ml amphotericin B (Bristol Myers-Squibb, Brazil).

The poliovirus type 1 (PV-1), vaccinal strain, was obtained from the ATCC (ATCC, VR-58) and the bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) was supplied by DMVP-UEL, Brazil. Both strains were propagated in HEp-2 cells, and virus titers determined by plaque assay.

Aqueous and ethanol extracts

The aqueous extract (AqE) of *Lentinula edodes* (lineage IW) was obtained as follows. Ground basideocarp was resuspended with distilled water, heated at 60°C for 1 h and centrifuged at 3000 × g for 5 min. The supernatant was pre-filtered and submitted to ultrafiltration in 0.2 µm pore size membrane, and stored at -20°C.

The ethanol extract (EtOHE) was prepared by dissolving ground basideocarp in 46% ethanol, at room temperature (± 25°C). The extract was centrifuged at 3,000 × g for 5 min, and the supernatant was lyophilized. The lyophilized was resuspended in DMEM, submitted to ultrafiltration in 0.2 µm pore size membrane, and stored at -20°C.

Polysaccharide extraction and purification

The polysaccharide from *Lentinula edodes* (LeP) was isolated as described by Gonzaga et al. [19]. Briefly, dried mushroom was dissolved at 5% (w/w) in distilled water at 100°C during 5 h. The suspension was centrifuged and clear colorless extract was neutralized to pH 7.0 with 0.1 N NaOH. One percent NaCl was added and the extract

submitted to polysaccharides precipitation with ethanol (5 vol ethanol:1 vol extract). After hydrogen peroxide/ethanol treatment, precipitate was resubmitted to ethanol extraction. The precipitate washed with ethanol and acetone was dried at 40°C, dissolved in distilled water, clarified by centrifugation and lyophilized.

Cytotoxic assay

The cytotoxicity of the test substances was performed by dimethylthiazolyldiphenyl tetrazolium bromide (MTT) kit (**). HEp-2 cells were grown in 96-well microplates and treated with varying concentrations of AqE (0.1-100 mg/ml), EtOHE (0.1-40 mg/ml) and LeP (0.25-6.0 mg/ml). After 72 h incubation, the test was carried out according to the manufacturer's recommendation. Under the same conditions, cells without treatment were used as control. The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) was determined as the concentration capable of reducing the optical density by 50% in comparison with the control. The CC₅₀ was calculated by linear regression analysis of the dose-response curves generated.

Plaque reduction assay

The antiviral activity by plaque reduction assay was done according to Melo et al. [20] and used throughout. Briefly, HEp-2 cells were cultivated in 24-well plates at 37°C in 5% of CO₂. After complete confluence, the cells were infected and treated with the substances accordingly. Cell cultures were overlaid with nutrient agarose and supplemented with antibiotic. For PV-1 experiments, nutrient agarose was added of 25 mM MgCl₂. The plates were incubated inverted at 37°C in 5% CO₂, for 48 h. The cells were fixed with 20% formalin, stained with 0.5% crystal violet, after removal of the nutrient agarose layer. Concomitantly, mock-infected cells were used as control. The percentage of viral inhibition (% V.I.) was calculated by the formula: % V.I. = [1 - (number of plaques in test/number of plaques in virus control)] × 100.

The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was determined as the concentration capable of reducing 50% the number of plaques forming units (PFU) in relation to the controls. The IC₅₀ was determined by linear regression analysis of the curves of viral inhibition, for each treatment.

The selectivity index (SI) was calculated as the ratio of CC₅₀ and IC₅₀.

Strains of PV-1 and BoHV-1 were submitted to the treatment with 1,000 U/ml and 10,000 U/ml human alfa-2 interferon (Meizler Com. Intern. SA, Brazil), respectively.

Virucidal activity

To evaluate the direct effect of the substances on viral particles, at varying concentrations, 10⁶ PFU/ml of PV-1

and 10^5 PFU/ml of BoHV-1 were mixed with equal volumes of AqE (3.1, 6.3, 12.5 and 25 mg/ml), EtOHE (0.375, 0.75, 1.5 and 3 mg/ml) and LeP (0.025, 0.05, 0.1 and 0.2 mg/ml) for 1 h at 37°C and inoculated in cell cultures.

Time-of-addition assay

The evaluation of the time-of-addition effect of the substances, at varying concentrations, was done as in Yang et al. [21]. Cells cultivated in 24-well plates were treated with concentrations of AqE (3.1, 6.3, 12.5 and 25 mg/ml), EtOHE (0.375, 0.75, 1.5 and 3 mg/ml) and LeP (0.025, 0.05, 0.1 and 0.2 mg/ml), before (-1 h and -2 h), during (0 h) and after (1 h and 2 h) infection.

Viral adsorption assay

The inhibition of the viral adsorption was carried out according to Zhu et al. [22]. Briefly, the cells cultivated in 24-well plates were infected with viral strains in the presence of the AqE (3.1, 6.3, 12.5 and 25 mg/ml), EtOHE (0.375, 0.75, 1.5 and 3 mg/ml) and LeP (0.025, 0.05, 0.1 and 0.2 mg/ml), and incubated at 4°C in 5% CO₂ for one h. The cells were washed twice with PBS, and plaque reduction assay was performed after 48 h.

Statistics

The data were analyzed by ANOVA followed by Student's *t*-test. Values were considered significant to *p* < 0.05. All experiments were performed in triplicate.

Results

The polysaccharide isolated from *Lentinula edodes* contains high levels of β -D-glucan. The ¹³C NMR spectrum is shown in Figure 1 and $\beta(1\rightarrow6)$ and $\alpha(1\rightarrow4)$ glucans configurations were identified in the spectrum. The chemical displacements characteristics of the carbons C1 to C6 of the glycosidic ring are presented in Table 1.

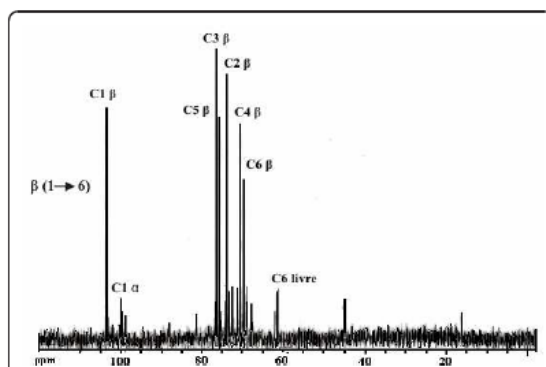


Figure 1 ¹³C NMR spectrum from polysaccharide isolated from *Lentinula edodes*.

Table 1 Chemical displacements characteristics of $\beta(1\rightarrow6)$ and $\alpha(1\rightarrow4)$ glucans present in the purified polysaccharides isolated from *Lentinula edodes*

Configurations	Chemical displacements (ppm)					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
$\beta(1\rightarrow6)$	103.5	73.7	75.6	70.4	75.6	69.7
$\alpha(1\rightarrow4)$	99.9	72.4	76.4	81.3	71.1	61.6

The cytotoxicity of the substances tested resulted in CC₅₀ for the AqE, EtOHE and LeP of 74.0 mg/ml, 25.8 mg/ml and 4.0 mg/ml, respectively (Table 2).

The results of antiviral activity for the AqE at different times of infection for PV-1 are shown in Figure 2a. When the AqE was added, one or two hours before infection (-1 h and -2 h), at the highest concentration tested (25 mg/ml), there was an inhibition of 5.8% and zero%, respectively. The addition of the extract at the concentrations of 3.1, 6.3, 12.5 and 25 mg/ml, at the moment of infection (0 h), resulted in a viral inhibition of 1.8, 17.5, 41.1 and 82.5%, respectively. However, for the time-of-addition of one hour post-infection (1 h), at the same concentrations, the percentages of inhibition were 9.2, 12.1, 24.5 and 60.2%, respectively. With the time-of-addition of two hours post-infection (2 h), the concentrations of 3.1 mg/ml and 6.3 mg/ml were not effective, but the concentrations of 12.5 mg/ml and 25 mg/ml inhibited the replication of PV-1 by 28.2 and 49.4%, respectively.

The results of the tests for virucidal activity and the inhibition of adsorption showed that the AqE inhibited the replication of PV-1 by 38.3% and 19.0%, respectively, at the highest concentration tested. Figure 2b shows the results of the antiviral activity of AqE in the replication of BoHV-1. When the cells were treated with a concentration of 12.5 mg/ml, the highest percentage of viral inhibition obtained was 19.1 and 4.2%, for the times -1 h and -2 h before the infection, respectively. At the time 0 h, for the concentrations of 3.1, 6.3, 12.5 and 25 mg/ml there was inhibition of 50.4, 43.3, 66.7 and 89.9%, respectively. However, for post-infection treatments, at the same concentrations, there was inhibition of 20.4,

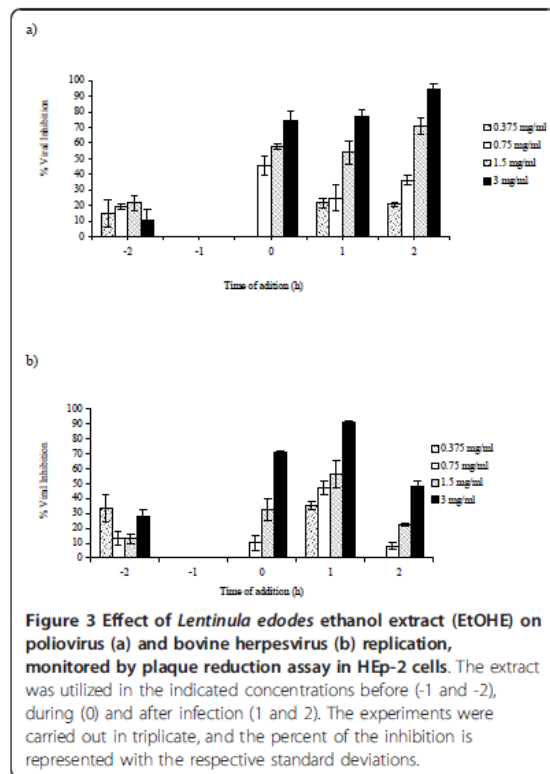
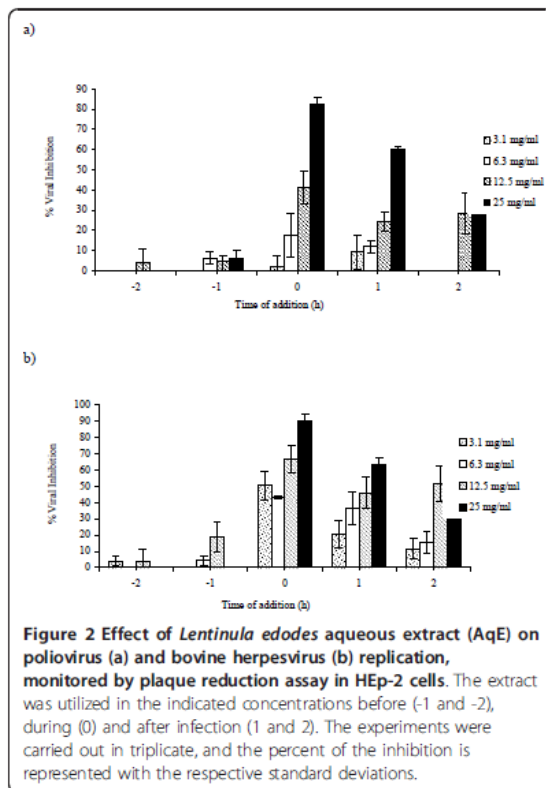
Table 2 Antiviral activity of aqueous extract (AqE), ethanol extract (EtOHE) and polysaccharide (LeP) of *Lentinula edodes* for poliovirus and bovine herpesvirus, monitored by plaque assay

Substances	CC ₅₀ ^a	PV-1		BHV-1	
		IC ₅₀ ^b	SI ^c	IC ₅₀	SI
AqE	74.0	12.7	5.82	8.2	9.02
EtOHE	25.8	1.30	19.85	2.13	12.11
LeP	> 4.0	0.19	> 21.33	0.1	> 39.21

^a Fifty percent cytotoxic concentration (mg/ml)

^b Fifty percent inhibitory concentration (mg/ml)

^c Selectivity index



36.1, 45.8 and 63.0% for the time 1 h and 11.7, 15.5, 51.5 and 75.7% for the time 2 h.

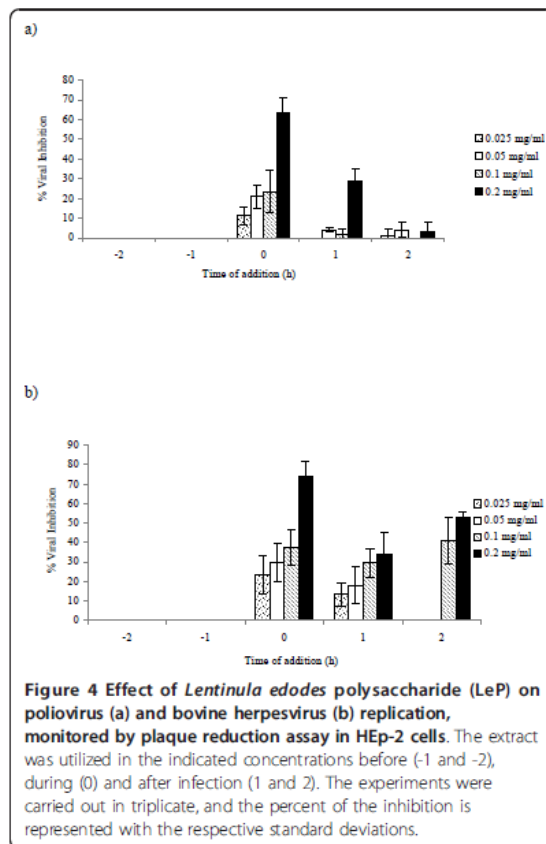
For virucidal and inhibition of adsorption activities, there was a low inhibitory effect for the replication of BoHV-1 (32.1% and zero%, respectively) at the highest concentration of AqE.

The results of the EtOHE on the replication of PV-1 and BoHV-1 are shown in Figure 3. For PV-1, at concentrations of 0.375, 0.75, 1.5 and 3 mg/ml, the extract inhibited replication of the virus by zero, 45.7, 56.5 and 73.9%, respectively, at time 0 h of infection (Figure 3a). When the extract was added at the times 1 h and 2 h, at the indicated concentrations, the percentages of inhibition were 21.4, 24.8, 53.9 and 76.9%, and 20.7, 36.3, 70.8 and 94.6%, respectively. However, treatments at times -1 h and -2 h, showed no significant effect, with the highest inhibition of 21.7%. In the replication of BoHV-1 (Figure 3b), at the same concentrations, the extract showed inhibition of zero, 10.2, 32.4 and 70.8%, respectively, for the time 0 h. Treatments at times 1 h and 2 h resulted in inhibition of 35.4, 46.9, 56.3 and 90.6%, and, zero, 8.1, 22.3 and 47.6%, respectively. The extract did not show any virucidal activity or inhibition of viral adsorption either for both virus strains.

The antiviral activity of LeP on the replication of PV-1 and BoHV-1 are shown in Figure 4. For PV-1, at the concentrations of 0.025, 0.05, 0.1 and 0.2 mg/ml, LeP inhibited viral replication by 11.2, 21.0, 23.6 and 63.8%, respectively, at time 0 h of infection (Figure 4a). When the polysaccharide was added at time 1 h, at the same concentrations, the percentages of inhibition were zero, 4.2, 2.0 and 28.5%, respectively. However, for the treatments at the times 2 h, -1 h and -2 h, no effect was observed. In the replication of BoHV-1, at the same concentrations, LeP showed inhibition of 23.1, 29.6, 37.1 and 74.2%, respectively, for the time 0 h (Figure 4b). Treatments at the times 1 h and 2 h showed inhibition of 13.1, 17.9, 29.4 and 33.5%, and, zero, zero, 40.9 and 52.7%, respectively.

The LeP virucidal activity on the PV-1 replication, at the same concentrations, showed inhibition of 14.5, 24.4, 28.5 and 34.3%. However, LeP neither demonstrated virucidal activity for BoHV-1 nor inhibition of viral adsorption for both virus strains.

The IC₅₀ and the respective SI for AqE, EtOHE and LeP, calculated for treatment at time 0 h of the infection, are shown in Table 2.



Interferon alpha-2, used as positive control, inhibited the replication of PV-1 and BoHV-1 by 100% at concentrations of 1,000 U/ml and 10,000 U/ml, respectively.

Discussion

In this work, the aqueous and ethanol extracts, and polysaccharides of the fruiting body of *Lentinula edodes* were evaluated for antiviral activity.

The results demonstrated that both extracts, as well as, LeP, inhibited the replication of PV-1 and BoHV-1. AqE inhibited PV-1 and BoHV-1 in a dose-dependent curve and the highest percentages of inhibition were obtained at time 0 h of infection. No significant inhibitory effect was observed when the extract was added at -1 h and -2 h of the infection and for the inhibition of adsorption, for both virus. This may suggest that AqE did not influence significantly the specific binding of both virus to cell receptors. AqE did not show virucidal activity, and therefore, did not affect virus particle directly either. Sorimachi et al. [23] demonstrated that fractions of the aqueous extract of *Agaricus blazei* mycelium inhibited significantly the CPE of western

equine encephalitis (WEE) virus, herpes simplex virus and poliovirus in Vero cells. This effect was observed after infection demonstrating that extract of basidiomycetes may contain inhibitory compounds for the initial phases of replication at least for herpesvirus and enterovirus. This finding strengthens the activity that we demonstrated of AqE on PV-1 and BoHV-1 replication.

EtOHE was effective in inhibiting the replication of both viruses. The greatest percent of viral inhibition was demonstrated when the extract was added post-infection, 94.6% (2 h) and 90.6% (1 h) for PV-1 and BoHV-1, respectively. It is likely, therefore, that EtOHE acted on the initial steps of the replication, considering that AqE did not show virucidal activity or inhibition of viral adsorption either. Awadh Ali et al. [24] demonstrated the presence of antiviral activity in ethanol extracts of the fruiting body and mycelium of *Inonotus hispidus* against influenza virus A and B, attributing the effect to phenolic compounds. Concerning the relevance of glucan in biological activities it was demonstrated that LeP contains higher levels of β -D-glucan in comparison with an *Agaricus blazei* isolate [19]. In our study, the pronounced peak representative of anomeric carbon in β (1 \rightarrow 6) configuration is evidence of greater concentration of glucan in relation to that of the α configuration. Many studies disclose β (1 \rightarrow 3) configuration for the isolated glucan from *Lentinus edodes* [25,26], therefore, being different to the one disclosed in this study. Certainly, the characteristics of the cultivation region, such as climate and growth conditions, justify such behaviour. LeP, a β -glucan-protein with a predominance of β -1-6, also showed a dose-dependent inhibitory effect on BoHV-1 and PV-1, although less pronounced, nevertheless, with a higher SI and lower IC₅₀, compared to AqE and EtOHE extracts. The antiviral activity of extracts isolated from the basidiomycetes seems to be mostly attributed to the presence of polysaccharides. The anionic feature of the molecules can interfere with early stages of viral replication [27,28] and sulfated polysaccharides demonstrate higher antiviral activity on enveloped virus [29].

Conclusions

In conclusion, we suggest that AqE, EtOHE and LeP act on the initial processes of PV-1 and BoHV-1 replication. The extracts and the polysaccharide could be considered as a source of potential antiviral substances. However, further study is necessary to better understanding of the step(s) of viral replication where inhibition occurs.

Acknowledgements

This work was partially supported by CNPq, CAPES and Fundação Araucária, and it is part of VPR M.Sc. manuscript.

Author details

¹Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid., km 380, CEP: 86051-990, Londrina, Paraná, Brazil.
²Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid., km 380, CEP: 86051-990, Londrina, Paraná, Brazil.
³Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Av. da Universidade, 2853, CEP: 60455-760, Fortaleza, Ceará, Brazil.

Authors' contributions

VPR participated in the studies on cytotoxicity and antiviral activity of the polysaccharide and extracts from *Lentinula edodes* and prepared the draft of the manuscript. KAY prepared the extracts and fractions and participated in the studies on antiviral activity. NMPSR and SAS participated in the extraction and purification of the polysaccharide, and participated in the manuscript. LDPM was responsible for shiitake cultivation and preparation of the extracts. RECL and CN were responsible for the design and coordination of the work, data analysis and manuscript writing and revision. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 30 November 2010 Accepted: 15 February 2012

Published: 15 February 2012

References

- De Clercq E, Field HJ: Antiviral prodrugs—the development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy. *Br J Pharmacol* 2006, **147**:1-11.
- Jones PS: Strategies for antiviral drug discovery. *Antivir Chem Chemother* 1998, **9**:283-302.
- Strohl WR: The role of natural products in a modern drug discovery program. *Drug Discov Today* 2000, **5**:39-41.
- Jiang T, Luo S, Chen Q, Shen L, Ying T: Effect of integrated application of gamma irradiation and modified atmosphere packaging on physicochemical and microbiological properties of shiitake mushroom (*Lentinula edode*). *Food Chem* 2010, **122**:761-767.
- Sugui MM, De Lima PLA, Delmanto RD, Da Eira AF, Salvadori DMF, Ribeiro LR: Antimutagenic effect of *Lentinula edode* (BERK) Pegler mushroom and possible variation among lineages. *Food Chem Toxicol* 2003, **41**:555-560.
- Kupfahl C, Geginat G, Hof H: Lentinan has a stimulatory effect on innate and adaptive immunity against murine *Listeria monocytogenes* infection. *Int Immunopharmacol* 2006, **6**:686-696.
- Suzuki M, Takatsuki F, Maeda YY, Hamuro J, Chihara G: Antitumor and immunological activity of Lentinan in comparison with LPS. *Int J Immunopharmacol* 1994, **16**:463-468.
- Maruyama S, Sukekawa Y, Kaneko Y, Fujimoto S: Anti-tumor activities of lentinan and micellaplast in tumor-bearing mice. *Gan To Kagaku Ryoho* 2006, **33**:1726-1729.
- Zhang L, Li X, Xu X, Zeng F: Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan. *Carbohydr Res* 2005, **340**:1515-1521.
- Jong SC, Birmingham M: Medicinal and therapeutic value of the shiitake mushroom. *Adv Appl Microbiol* 1993, **39**:153-184.
- Markova N, Kussovski V, Drandarska I, Nikolaeva S, Georgieva N, Radoucheva T: Protective activity of Lentinan in experimental tuberculosis. *Int Immunopharmacol* 2003, **3**:1557-1562.
- Kaneko Y, Chihara G: Potentiation of host resistance against microbial infections by Lentinan and its related polysaccharides. In *Microbial Infections*. Edited by: Friedman H et al. New York: Plenum; 1992:201-206.
- Sasaki SH, Linhares REC, Nozawa CM, Montalván R, Paccolla-Meirelles LD: Strains of *Lentinula edode* suppress growth of phytopathogenic fungi and inhibit Alagoas serotype of vesicular stomatitis virus. *Braz J Microbiol* 2001, **32**:52-55.
- Wang S, Welte T, Fang H, et al: Oral Administration of Active Hexose Correlated Compound Enhances Host Resistance to West Nile Encephalitis in Mice. *J Nutr* 2009, **139**:598-602.
- Racaniello VR: One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology* 2006, **344**:9-16.
- World Health Organization (WHO): Global polio eradication initiative. <http://www.polioeradication.org/Dataandmonitoring/Poliothisweek.aspx>. Accessed 26 dec 2011.
- Jones C, Geiser V, Henderson G, et al: Functional analysis of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genes expressed during latency. *Vet Microbiol* 2006, **113**:199-210.
- Hurk SDL, Loehr BI, Babiuk LA: Immunization of livestock with DNA vaccines: current studies and future prospects. *Vaccine* 2001, **19**:2474-2479.
- Gonzaga MLC, Ricardo NMP, Heatley F, Soares SA: Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blaze* Murrill. *Carbohydr Polym* 2005, **60**:43-49.
- Melo FL, Benati FJ, Roman WA Jr, Mello JCP, Nozawa C, Linhares REC: The in vitro antiviral activity of an aliphatic nitrocompound from *Heteropterus aphrodisiac*. *Microbiol Res* 2008, **163**:136-139.
- Yang CM, Cheng HY, Lin TC, Chiang LC, Lin CC: Acetone, ethanol and methanol extracts of *Phyllanthus urinari* inhibit HSV-2 infection in vitro. *Antiviral Res* 2005, **67**:24-30.
- Zhu W, Ghlu LCM, Ooi VEC, Chan PKS, Ang PO Jr: Antiviral property and mode of action of a sulphated polysaccharide from *Sargassum paten* against herpes simplex virus type 2. *Int J Antimicrob Agents* 2004, **24**:81-85.
- Sorimachi K, Ikehara Y, Maezato G, et al: Inhibition by *Agaricus blaze* Murrill fractions of cytopathic effect induced by Western Equine Encephalitis (WEE) Virus on VERO cells in vitro. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001, **65**:1645-1647.
- Awadh Ali NA, Mothana RAA, Lesnau A, Pilgrim H, Lindesquist U: Antiviral activity of *Inonotus hispidus*. *Fitoterapia* 2003, **74**:483-485.
- Surenjav U, Zhang L, Xu X, Zhang X, Zeng F: Effects of molecular structure on antitumor activities of (1 → 3)-D-glucans from different *Lentinus Edode*. *Carbohydr Polym* 2006, **63**:97-104.
- Zhang Y, Li S, Wang X, Zhang L, Cheung PCK: Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities. *Food Hydrocolloid* 2011, **25**:196-206.
- Ho SK, Kim YS, Oh KW, Lee CK, Lee YN, Han SS: Mode of Antiviral Activity of Water Soluble Components Isolated from *Effvingia aplanat* on Vesicular Stomatitis Virus. *Arch Pharm Res* 2001, **24**:74-78.
- Kabanov A, Sementsova AO, Skamovich MO, Teplyakova TV, Shishkina LN, Sergeev NA: Development of new effective antiinfluenza drugs based on extracts of basidiomycetes. *Int J Infect Dis* 2010, **14**(Suppl 1):e88.
- Damonte EB, Matulewicz MC, Cerezo AS: Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. *Curr Med Chem* 2004, **11**:2399-2419.

doi:10.1186/1743-422X-9-37

Cite this article as: Rincão *et al.*: Polysaccharide and extracts from *Lentinula edodes*: structural features and antiviral activity. *Virology Journal* 2012, **9**:37.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



ANTIVIRAL ACTIVITY OF A *LENTINULA EDODES* SULFATED POLYSACCHARIDE IN HERPESVIRUS REPLICATION

Rincão, V.P.¹; Espada, S.F.¹; Galhardi, L.C.F.¹; Soares, S.A.²; Ricardo, N.M.P.S.²;
Nozawa, C.¹; Linhares, R.E.C.^{1,3}

ABSTRACT: Polysaccharides present several biological activities, including antiviral activity and generally their sulfated derivatives have their potentiality increased. This study aimed to evaluate the antiviral activity of *Lentinula edodes* sulfated polysaccharide (LeSP) in the replication of herpes simplex 1 (HSV-1) and bovine herpesvirus 1 (BoHV-1). LeSP was evaluated for its toxicity in HEp-2 cells by the MTT assay. The antiviral activity was determined by testing the time-of-addition of the substance, the inhibition of virus penetration and adsorption, and virucidal activity, by plaque assay. The inhibition of virus replication was also monitored by the immunofluorescence assay (IF), the polymerase chain reaction (PCR) and the determination of the reduction in plaque size. The results showed a 100% inhibition for both viruses when LeSP was added during infection, at the 50 µg/ml. The IF assay resulted in the inhibition of 74.7% and 79.3% for HSV-1 and BoHV-1, respectively, at the 50 µg/ml. The PCR showed a relative decrease in DNA synthesis in a concentration of 50 µg/ml of the LeSP for HSV-1. It was also shown a decrease in plaque size for both viruses. Thus it is possible that the LeSP inhibits the replication, in early stages of replication, and spread of HSV-1 and BoHV-1.

Keywords: Antiviral activity. Sulfated polysaccharide. Herpes simplex virus. Bovine herpesvirus

Ms. Ref. No.: MICRES-D-12-00311

Title: Antiviral activity of a *Lentinula edodes* sulfated polysaccharide in herpesvirus replication Microbiological Research

Your submission entitled "Antiviral activity of a *Lentinula edodes* sulfated polysaccharide in herpesvirus replication" has been assigned the following manuscript number: MICRES-D-12-00311.

¹ Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná and

² Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

³ Corresponding author. Tel.: +55 43 3371 4617; fax: +55 43 33714788. E-mail address: relin@uel.br (R. E. C. Linhares).

Introduction

The polysaccharides are a group of macromolecules widely distributed among organisms, with many biological activities such as anticancer, antiviral, immunostimulatory (Suzuki et al., 1994; Maruyama et al., 2006; Rincão et al., 2012) among others. The sulfated polysaccharides derivatives have their biological activities increased comparatively to their original counterpart, such as in anticoagulation (Alban and Franz, 2000; Yang et al., 2002), antiviral (Amornrut et al., 1999; Ghosh et al., 2004; Talarico et al., 2005), anticancer (Peng et al., 2005; Nie et al., 2006), antiproliferative (Hoffman and Paper, 1993), immunostimulator (Sugawara et al., 1982; Huang et al. 2008a) among others. Several studies have shown that sulfated polysaccharides isolated from basidiomycetes have antiviral activity in vitro, for example, against HSV, Newcastle disease virus and respiratory syncytial virus (Zhang et al., 2004; Guo et al., 2009; Cardozo et al., 2011).

Infections caused by herpes simplex virus (HSV) can occur in different forms such as cold sores or genital, eye infections, encephalitis and even disseminated infection in immunocompromised individuals (Kleymann, 2005). Although several compounds succeed in the treatment of HSV infections, for example, acyclovir which inhibit the virus and reduce the severity of the disease (Brady and Bernstein, 2004), the emergence of resistant strains after a long period treatment, as well as their toxicity, demonstrate the importance of continuous search for new antivirals (Emst and Franey, 1998; Bacon et al., 2003; Eizuru, 2003).

Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) is an important pathogen of cattle and causes great economic losses in cattle industry (Turin et al., 1999). The clinical manifestations of the infection vary from rhinotracheitis, vulvovaginitis, balanoposthitis, and even abortion (Oirschot, 1995). As HSV, BoHV also establish latent infection and this is the main reason for the difficulty for controlling the infection.

The objective of this study was to evaluate the cytotoxicity and antiviral activity of a sulfated polysaccharide isolated from *Lentinula edodes* in the replication of HSV-1 and BoHV-1.

Materials and Methods

Cells and Viruses

Culture of HEP-2 cells (human larynx carcinoma - ATCC, CCL-23) were grown in minimal essential medium modified by Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM, Gibco-BRL, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco-BRL, USA), 2mM glutamine (Sigma Chem. Co., U.S. *), 100 g / ml streptomycin (*), 100 IU / ml penicillin (*) and 2.5 mg / ml amphotericin B (Bristol-Myers Squibb, Brazil).

The bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) was supplied by DMVP-UEL, Brazil and the herpes simplex virus type 1 (HSV-1) by DV – UFRJ. Both strains were propagated on HEP-2 cells and virus titers were determined by plaque assay, and maintained at -80 ° C.

Sulfated Polysaccharide

The extraction and sulfation of the *Lentinula edodes* polysaccharide (LeSP) was carried out according to Gonzaga et al. (2005) and Singh et al. (2009), respectively. The LeSP were dissolved throughout in DMEM and stored at -20 °C.

Cytotoxicity Assay

The cytotoxicity of the substance was evaluated by MTT kit assay (Sigma Chem. Co., USA). HEP-2 cells were grown in 96-well microplate and treated with varying concentrations of LeSP, from 5 µg/ml to 4000 µg/ml. After 72 h of incubation the test was performed according to manufacturer's instructions. Under the same conditions, untreated cells were used as controls. The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) was determined as the concentration capable to decrease the optical density by 50% compared to control. The CC₅₀ was calculated by linear regression analysis of dose-response curve generated. The selectivity index (SI) was calculated as the ratio of CC₅₀ and IC₅₀.

Plaque reduction assay

The antiviral activity by plaque reduction assay was performed according to Melo et al. (2008). Briefly, confluent HEp-2 cell monolayer grown in 24-well microplates were infected and treated accordingly. Cell cultures were then overlaid with nutrient agarose and incubated for 48 h. The cells were fixed with 20% formalin, the agarose layer removed, and stained with 0.5% crystal violet. Concomitantly, appropriate control was prepared. The percentage of viral inhibition (% VI) was calculated by the formula: % VI = [1 - (number of plaques in the tests / number of plaques in virus control)] x 100.

The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) capable to reduce the number of plaques forming units (PFU) in 50% in comparison to the control was determined by linear regression analysis of viral inhibition curve for each treatment.

Antiviral activity

Virucidal activity

HSV-1 or BoHV-1 (10⁵ PFU/ml) were incubated with LeSP (6.25 µg/ml to 50 µg/ml, v/v) for 1 h at 37° C and inoculated into cell culture. The viral inhibition was determined by plaque reduction assay.

The time-of-addition assay

HEp-2 cells grown in 24-well microplates were treated with concentrations of LeSP (6.25 µg/ml to 50 µg/ml) before (-2 h and -1 h), at the time of infection (0 h) and after (+1 h and +2 h) infection (Yang et al., 2005). Virus inhibition was monitored by plaque reduction assay.

Adsorption inhibition assay

Briefly, HEp-2 cells grown in 24-well microplates were infected in the presence of LeSP and incubated at 4°C for 1 h. Cells were washed twice with PBS, and viral inhibition was monitored by the plaque reduction assay (Zhu et al., 2004).

Penetration inhibition assay

Confluent HEp-2 cells grown in 24-well microplates were incubated for 30 min at 4° C. After infection, cells were incubated at 4 °C for 2 h and treated with LeSP (6.25 µg/ml to 50 µg/ml) and incubated at 37 °C for 10 min. The medium was replaced by pH 3.0 PBS for 1 min and immediately afterward with pH 11.0 PBS. Inhibition of virus was monitored by plaque reduction assay (Cheng et al., 2004).

Evaluation of the plaque size

The area of 15 to 30 plaques were measured after treatment with concentrations (6.25 µg/ml to 50 µg/ml) of LeSP for the different time of substance addition (-1, -2, 0, +1 e +2 h). Plaques were measured with Image J program 1.44p (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). The average value of area was compared between treated and untrated control virus. The results were expressed as percentage of area reduction.

Acycloguanosine and Interferon

Acycloguanosine (Zynvir, Novafarma Indústria Farmacêutica) at the concentration of 2.5 mg/ml and 10,000 U/ml of human alfa-2 interferon (Meizler Com. Intern. SA, Brazil) were used as positive control for HSV-1 and BoHV-1, respectively.

Immunofluorescence assay

HEp-2 cells grown on coverslips in 24-well microplates were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 2 and treated with LeSP at the time of infection (time 0 h). The cells were collected after 24 h, fixed with cold acetone (-20 °C) and

treated with bovine anti-BoHV-1 or mouse anti-HSV-1 antibodies, and then treated with secondary anti-bovine or anti-mouse IgG FITC conjugate (*). Cells were examined under a UV light microscope and 100 cells per coverslip were counted. The experiments were performed in triplicate. The IC₅₀ was calculated by analysis of linear regression of the viral inhibition curves.

Polymerase chain reaction (PCR)

Cells grown in 24-well microplates (2×10^6 cells/ml) were treated with LeSP at the moment of inoculation of HSV-1 (MOI of 1) and incubated for 24h. Viral DNA of infected cells and treated with different concentration of tested substance (50 – 6.2 µg/ml) were extracted using commercial kits (QIAamp® DNA Mini and Blood Mini). Viral DNA from infected cells treated with Acyclovir (3 mg/ml) (Zynvir – Novafarma Indústria Farmacêutica, Anápolis, GO, BR) and viral DNA of infected cells not treated and cells not infected and not treated were used as control. The PCR primer pairs for ICP4 were ICP4F (5' GGCGGGAAGTTGTGGACTGG 3') and ICP4R (5' CAGGTTGTTGCCGTTTATTGCG 3') was described by Tal-Singer et al. (1997). The PCR reactions was carried out in a final volume of 25 µl containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM each deoxynucleosideo triphosphate, 20 pmols of each specific primer, 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Brazil), and 5 µl of extracted DNA. The PCR program consist of denaturation at 94 °C for 4 min and 40 cycles of denaturation at 94° C for 1 min, annealing at 60° C for 1 min, and polymerization at 72° C for 1 min, followed by a final extension at 72° C for 7 min. 10 µl of the PCR products were resolved on a 12% polyacrilamide gel.

Statistics

ANOVA followed by Student's t test were used. Values were considered significant for $p \leq 0.05$. All experiments were performed in triplicate.

Results

The cytotoxicity of the LeSP was determined by the MTT assay. The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) was higher than 4.0 mg/ml.

The results of antiviral activity for LeSP at different times of infection for HSV-1 and BoHV-1 are shown in Figure 1a and Figure 1b, respectively. When the polysaccharide was added, one or two hours before infection (-1 h and -2 h), at the highest concentration tested (50 µg/ml), the inhibition of the HSV-1 was zero%, for both time, however, for BoHV-1 the inhibition was 19.5% and zero%, respectively. The addition of the LeSP at the concentrations of 6.25, 12.5, 25 and 50 µg/ml, at the moment of the infection (0 h), for the HSV-1, resulted in a viral inhibition of 70.2, 98.5, 100.0 and 100.0%, respectively. For the BoHV-1, the addition of the polysaccharide, in these concentrations, at time 0 h, resulted in a viral inhibition of 62.0, 88.0, 95.1 and 100.0%. However, for the time-of-addition of one or two hours post-infection (+1 h and +2 h), at the same concentrations, the percentages of inhibition of the HSV-1 were zero, zero, 11.9 and 36.4%, for +1 h, and 11.9, 11.9, 14.4 and 34.2% for +2 h. For the BoHV-1 the viral inhibition, at same concentrations, was 1.0, 3.2, 16.1 and 67.2%, for +1 h, and zero, zero, 26.9 and 55.5% for +2 h of infection.

The LeSP did not show any virucidal activity, inhibition of viral adsorption or penetration for both virus strains.

The effect of LeSP in the HSV-1 and BoHV-1 replication evaluated by immunofluorescence assay showed an antiviral activity demonstrated by a decrease in fluorescent cells compared to virus control (Table 1).

The evaluation of the plaque size of HSV-1 and BoHV-1 for addition of LeSP at different time of infection showed a decreasing on area of the plaque (Figure 2). When the LeSP was added at -1 and -2 h of infection no inhibition was observed. The addition of the sulfated polysaccharide at +1 and +2 h of HSV-1 infection, at the concentrations 6.25, 12.5, 25 and 50 µg/ml, result in a decrease in plaque area of 22.6, 26.9, 83.7 and 96.3% , for +1 h, and zero, 19.6, 57.7 and 90.3%, for +2 h, respectively. For BoHV-1, at the same concentrations, the decrease in plaque area was of 23.7, 59.4, 85.7 and 97.5%, for +1 h, and zero, 47.1, 69.3 and 92.1%, for +2 h, respectively. Determination of the plaque size to the time of 0h of infection was impaired by the low number of plaques.

LeSP antiviral activity for HSV-1 was also monitored by polymerase chain reaction (PCR). The results shown that, at a concentration of 50 µg/ml, the LeSP inhibited DNA synthesis compared to control viruses (Figure 3).

The IC₅₀ and respective selectivity index of LeSP for HSV-1 and BoHV-1, calculated at time of 0 h of infection are showed in Table 2.

Interferon alpha-2 and acycloguanosine, used with positive control for BoHV-1 and HSV-1, respectively, inhibited the viral replication by 100% at the concentrations 10000 U/ml, for interferon, and 4000 µg/ml, for acycloguanosine.

Discussion

This study evaluated the antiherpetic activity of sulfated polysaccharide of the *Lentinula edodes*. To try identifying in which steps viral replication could be inhibited, LeSP was added before, during and after infection by viral strains. As shown in Figure 1 LeSP was more effective in inhibits replication of HSV-1 and BoHV-1 when added during infection than after. Similar results were obtained for other sulfated polysaccharides evaluated for antiherpetic activity (Zhang et al., 2004; Cardozo et al., 2011).

No significant inhibitory effect was observed when the polysaccharide was added prior to infection or to inhibition of the adsorption and penetration for both viruses, which may suggest that the LeSP does not influence specific binding of virus to the cell receptors or interfere with the process of virus entry into the cell. The results observed when polysaccharide has been added during and after infection showed a viral dose-dependent inhibition for both viruses. This suggests an antiviral activity in the early stages of replication after penetration. This hypothesis is supported by the inhibition of DNA synthesis shown by PCR and by reducing the number of fluorescent cells detected by immunofluorescence assay. These results are consistent with those obtained by Rincão et al. (2012), who evaluated the same polysaccharide, but without sulfation. Comparing the present results with those obtained previously for BoHV-1 (Rincão et al., 2012) and HSV-1 (data not shown) can be also seen that the sulphated polysaccharide derivative had a better antiviral activity shown by an increase in selectivity index by more than forty times. Similar results have been demonstrated for others polysaccharides (Huang et al., 2008b; Chattopadhyay et al., 2008).

Antiherpetic properties of sulfated polysaccharides can derive from a combination of structural characteristics such as molecular mass, branching degree, charge density, and molecular composition of uncharged portions (Ghosh et al., 2009). These properties may represent different mechanisms for antiherpetic activity, including virucidal activity (Ekblad et al., 2010). LeSP not present virucidal activity, for both viruses. Other studies that evaluated the antiviral activity of sulfated polysaccharides too found no virucidal activity (Chattopadhyay et al., 2007; Karmakar et al., 2010).

Inhibition of intercellular spread of viruses constitutes an important target for new antiviral drugs, therefore may represent the inhibition of viral dissemination. In addition to the antiviral activity of LeSP demonstrated by a decrease in the number of plaques, the addition of the polysaccharide in the 0, +1 and +2 h resulted in a decrease in the plaque size. Similar results were found by Mikloska and Cunningham (2001), Jessen et al. (2004) and Ekblad et al. (2010), which evaluated the activity of alpha and gamma interferons, peptides, and sulfated polysaccharides, respectively, in the replication of HSV-1. Thus the reduction in size of the plaques show the ability of LeSP by interfering with the spread of the virus.

In conclusion, we suggest that the sulfated polysaccharide of *Lentinula edodes* inhibits the replication of herpes simplex virus 1 and bovine herpesvirus 1 in the early steps as well as the dissemination, thus it is a potential candidate for development of new antiviral agents. However, further studies are needed to determine the exact action mechanism.

Acknowledgements

The authors thank to CNPq, CAPES and Fundação Araucária for financial support. This work is part of V.P.R. Dr. manuscript who was also recipient of Fundação Araucária fellowship.

References

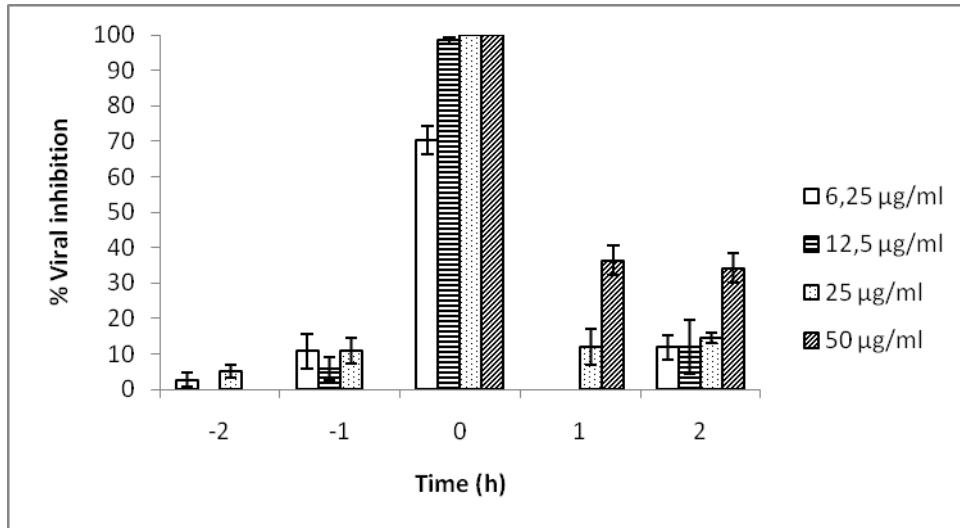
- Alban S and Franz G. Characterization of the anticoagulant actions of a semisynthetic curdlan sulfate. *Thromb Res* 2000; 99:377–388.
- Amornrut C, Toida T, Imanari T, Woo ER, Park H, Linhardt R, Wu SJ, Kim YS. A new sulfated b-galactan from clams with anti-HIV activity. *Carbohydr Res* 1999; 321(1-2):121–127.
- Bacon TH, Levin MJ, Leary JL, Sarisky RT, Sutton D. Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16:114–128.
- Brady RC and Bernstein DI. Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Res* 2004; 61:73–81.
- Cardozo FTGS, Camelini CM, Mascarello A, Rossi MJ, Nunes RJ, Barardi CRM, Mendonça MM, Simões CMO. Antiherpetic activity of a sulfated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* mycelia. *Antiviral Res* 2011; 92:108–114.
- Chattopadhyay K, Mateu CG, Mandal P, Pujol CA, Damonte EB, Ray B. Galactan sulfate of *Grateloupia indica*: Isolation, structural features and antiviral activity. *Phytochemistry* 2007; 68:1428–1435.
- Chattopadhyay K, Ghosh T, Pujol CA, Carlucci MJ, Damonte EB, Ray B. Polysaccharides from *Gracilaria corticata*: Sulfation, chemical characterization and anti-HSV activities. *Int J Biol Macromol* 2008; 43:346–35.
- Cheng HY, Lin TC, Yang CM, Wang KC, Lin LT, Lin, CC. Putranjivain A from *Euphorbia jolkini* inhibits both virus entry and late stage replication of herpes simplex virus type 2 *in vitro*. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 577–583.
- Eizuru Y. Development of new antivirals for herpesviruses. *Antiviral Chem Chemother* 2003; 14: 299–308.
- Ekblad M, Adamiak B, Bergstrom T, Johnstone KD, Karoli T, Liu L, Ferro V, Trybala E. A highly lipophilic sulfated tetrasaccharide glycoside related to muparfostat (PI-88) exhibits virucidal activity against herpes simplex virus. *Antiviral Res* 2010; 86: 196–203.
- Emst ME and Franey RJ. Acyclovir and ganciclovir-induced neurotoxicity. *Ann Pharmacother* 1998; 32: 111-113.
- Hoffman R and Paper DH. Carrageenans: novel, selective growth factor antagonists with anti-proliferative activity. *Br J Cancer* 1993; 68:442–443.
- Huang X, Hu Y, Zhao X, Lu Y, Wang J, Zhang F, Sun J. Sulfated modification can enhance the adjuvant activity of astragalus polysaccharide for ND vaccine. *Carbohydr Polym* 2008a; 73: 303–308.

- Huang X, Wang D, Hu Y, Lu Y, Guo Z, Kong X, Sun J. Effect of sulfated astragalus polysaccharide on cellular infectivity of infectious bursal disease virus. *Int J Biol Macromol* 2008b; 42:166–171.
- Gonzaga MLC, Ricardo NMPS, Heatley F, Soares SA. Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill. *Carbohydr Polym* 2005; 60:43-49.
- Guo Z, Hu Y, Wang D, Ma X, Zhao X, Zhao B, Wang J, Liu P. Sulfated modification can enhance the adjuvanticity of lentinan and improve the immune effect of ND vaccine. *Vaccine* 2009; 27:660–665.
- Ghosh P, Adhikari U, Ghosal PK, Pujol CA, Carlucci MJ, Damonte EB, Ray B. In vitro anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa*. *Phytochemistry* 2004; 65:3151–3157.
- Ghosh T, Chattopadhyay K, Marschall M, Karmakar P, Mandal P, Ray B. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: from structure–activity analysis to clinical evaluation. *Glycobiology* 2009; 19:2–15.
- Jenssen H, Andersen JH, Mantzilas D, Gutteberg TJ. A wide range of medium-sized, highly cationic, α -helical peptides show antiviral activity against herpes simplex virus. *Antiviral Res* 2004; 64:119–126.
- Karmakar P, Pujol CA, Damonte EB, Ghosh T, Ray B. Polysaccharides from *Padina tetrastratica*: structural features, chemical modification and antiviral activity. *Carbohydr Polym* 2010; 80:514–521.
- Kleymann G. Agents and strategies in development for improved management of herpes simplex virus infection and disease. *Expert Opin Investig Drugs* 2005; 14:135–161.
- Maruyama S, Sukekawa Y, Kaneko Y, Fujimoto S. Anti-tumor activities of lentinan and micellapist in tumor-bearing mice. *Gan To Kagaku Ryoho* 2006; 33:1726-1729.
- Mikloska Z and Cunningham AL. Alpha and gamma interferons inhibit herpes simplex virus type 1 infection and spread in epidermal cells after axonal transmission. *J Virol* 2001; 75:11821–11826.
- Melo FL, Benati FJ, Roman WAJr, Mello JCP, Nozawa C, Linhares REC. The in vitro antiviral activity of an aliphatic nitrocompound from *Heteropteris aphrodisiac*. *Microbiol Res* 2008; 163:136-139.
- Nie X, Shi B, Ding Y, Tao W. Preparation of chemically sulfated polysaccharide derived from *Grifola frondosa* and its potential biological activities. *Int J Biol Macromol* 2006; 39:228–233.
- Oirschot JTvan. Bovine herpesvirus in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. *Vet Quart* 1995; 17:29-33.
- Peng Y, Zhang L, Zeng F, Kennedy JF. Structure and antitumor activities of water-soluble polysaccharides from *Ganoderma tsugae* mycelium. *Carbohydr Polym* 2005; 59:385–392.

- Rincão VP, Yamamoto KA, Ricardo NMPS, Soares SA, Meirelles LDP, Nozawa C, Linhares REC. Polysaccharide and extracts from *Lentinula edodes*: structural features and antiviral activity. *Virology* 2012; 9:37.
- Singh V, Srivastava A, Tiwari A. Structural elucidation, modification and characterization of seed gum from *Cassia javahikae* seeds: A non-traditional source of industrial gums. *Int J Biol Macromol* 2009; 45:293–297.
- Sugawara I, Ishizaka S, Moller G. Carrageenans, highly sulfated polysaccharides and macrophage-toxic agents: newly found human T-Lymphocyte mitogens. *Immunobiology* 1982; 163:527–538.
- Suzuki M, Takatsuki F, Maeda YY, Hamuro J, Chihara G. Antitumor and immunological activity of Lentinan in comparison with LPS. *Int J Immunopharmacol* 1994; 16:463-468.
- Tal-Singer R, Lasner TM, Podrzucki W, Skokotas A, Leary JJ, Berger SL, Fraser NW. Gene expression during reactivation of herpes simplex virus type 1 from latency in the peripheral nervous system is different from that during lytic infection of tissue cultures. *J Virol* 1997; 71(7): 5268–5276.
- Talarico LB, Pujol CA, Zibetti RGM, Faria PCS, Nosedá MD, Duarte MER, Damonte EB. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. *Antivir Res* 2005; 66:103–110.
- Turin L, Russo S, Poli G. BHV-1: New molecular approaches to control a common and widespread infection. *Molec Med* 1999; 5:261–284.
- Yang J, Du Y, Huang R, Wan Y, Li T. Chemical modification, characterization and structure–anticoagulant activity relationship of Chinese lacquer polysaccharides. *Int J Biol Macromol* 2002; 31:55–62.
- Yang CM, Cheng HY, Lin TC, Chiang LC, Lin CC. Acetone, ethanol and methanol extracts of *Phyllanthus urinaria* inhibit HSV-2 infection in vitro. *Antiviral Res* 2005; 67:24-30.
- Zhu W, Chiu LCM, Ooi VEC, Chan PKS, Ang PO Jr. Antiviral property and mode of action of a sulphated polysaccharide from *Sargassum patens* against herpes simplex virus type 2. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24:81–85.
- Zhang M, Cheung PCK, Ooi VEC, Zhang L. Evaluation of sulfated fungal β -glucans from the sclerotium of *Pleurotus tuber-regium* as a potential water-soluble anti-viral agent. *Carbohydr Res* 2004; 339:2297–2301.

Figure 1 – Antiviral activity of the LeSP at time-of-addition assay on HSV-1 (a) and BoHV-1 (b) replication monitored by plaque assay in HEp-2 cells. LeSP was utilized in the indicated concentrations before (-1 and -2 h), during (0 h) and after infection (1 and 2 h). The experiments were carried out in triplicate, and the percent of the inhibition is represented with the respective standard deviations.

a)



b)

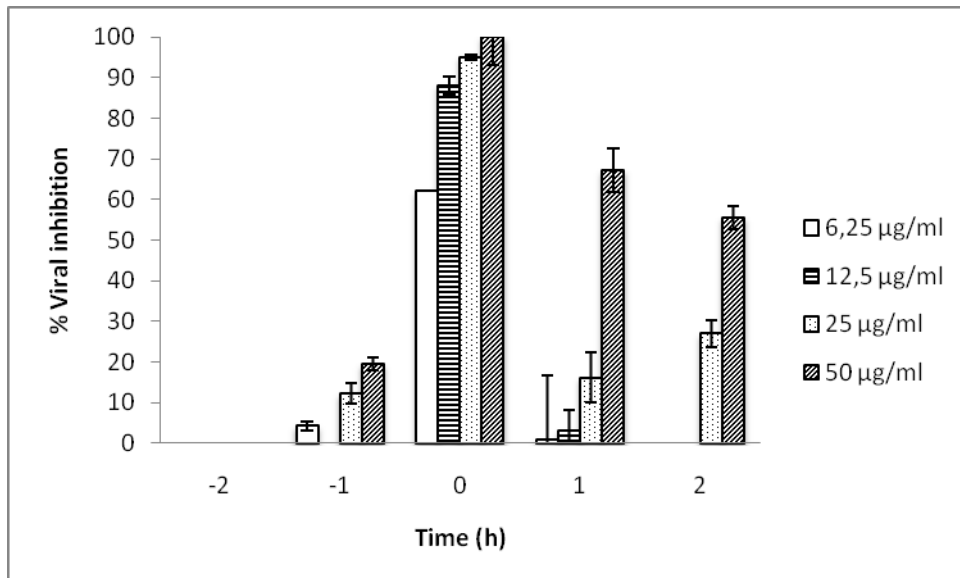
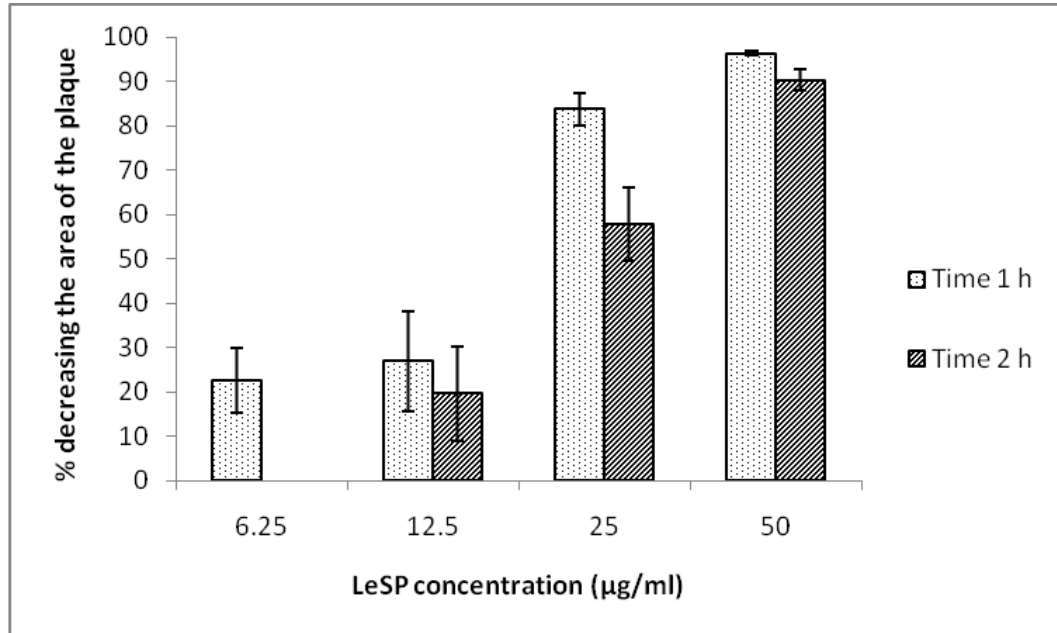


Figure 2 – Evaluation of the plaque size for the time-of-addition assay of the LeSP on HSV-1 (a) and BoHV-1 (b) replication. The measurement was carried out through Imagem J program. The percent of decreasing area of the plaque, presented with the respective standard deviation, were carried out in triplicate.

a)



b)

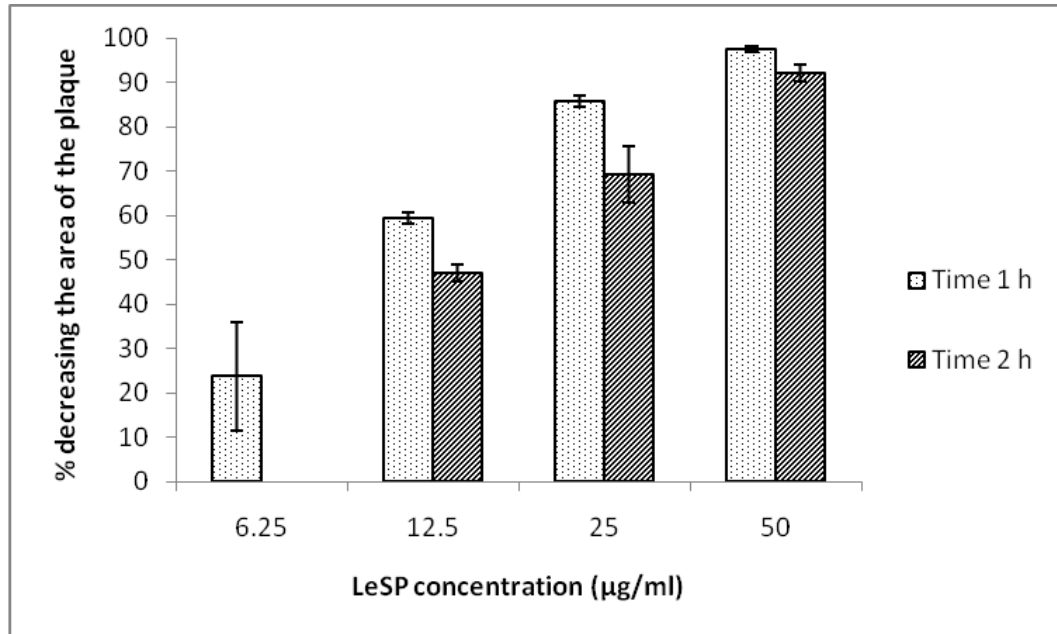


Figure 3 – Antiviral activity of LeSP in the HSV-1 replication monitored by polymerase chain reaction. The channels show: HSV-1 without LeSP (virus control - CV); HSV-1 treated with acycloguanosine (ACV); and HSV-1 plus four concentrations of the LeSP.

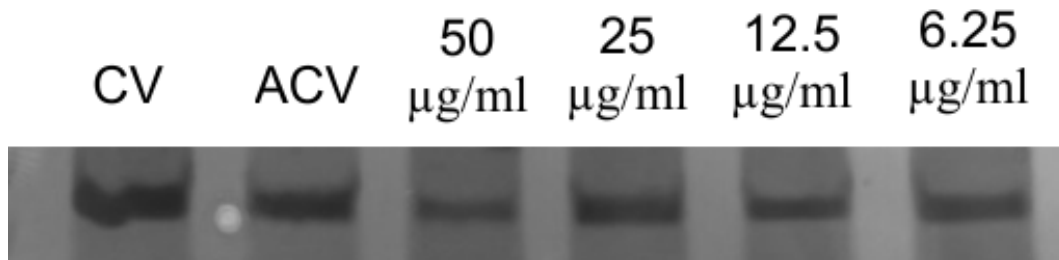


Table 1 – Evaluation of the antiviral activity of LeSP for HSV-1 and BoHV-1 by Immunofluorescence assay.

Concentrations (µg/ml)	Cells with fluorescent focus		% Viral inhibition	
	HSV-1	BoHV-1	HSV-1	BoHV-1
VC	85,0 ± 2,4 ^a	92,0 ± 0,9	-----	-----
6.25	61,3 ± 3,4	30,0 ± 0,7	27,8 ± 4,0	67,4 ± 0,7
12.5	44,4 ± 1,5	34,0 ± 3,8	47,7 ± 1,8	63,0 ± 4,1
25	36,0 ± 2,9	26 ± 5,0	57,6 ± 3,4	71,7 ± 5,4
50	21,5 ± 2,4	19 ± 4,2	74,7 ± 2,8	79,3 ± 4,6

VC – virus control; cells infected with HSV-1 or BoHV-1 without LeSP

a – standard deviation

Table 2 – Selectivity index of the LeSP for HSV-1 and BoHV-1.

Viral Strain	LeSP (µg/ml)		SI ^c
	CC ₅₀ ^a	IC ₅₀ ^b	
HSV-1	> 4000,0	3,41	> 1173
BoHV-1	> 4000,0	2,36	> 1695

a – 50% citotoxic concentration

b – 50% inhibitory concentration

c – Selectivity index

ATIVIDADE ANTIVIRAL DE POLISSACARÍDEOS ISOLADOS DE *LENTINULA EDODES* E *AGARICUS BRASILIENSIS* NA REPLICAÇÃO DE POLIOVÍRUS 1.

Rincão, V.P.¹; Espada, S.¹; Lopes, N.¹; Soares, S.A.²; Paccola-Meirelles, L.D.³; Nozawa, C.¹; Linhares, R.E.C.^{1,4}

RESUMO: Os polissacarídeos são macromoléculas naturais com muitas atividades biológicas que podem ser estimuladas por modificações químicas como sulfatação e carboximetilação. Assim o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antiviral de polissacarídeos sulfatados (PSAb e PSLe) e carboximetilados (PCAb) isolados de *Lentinula edodes* e *Agaricus brasiliensis* na replicação do poliovírus 1 (PV-1). O PSAb, PSLe e PCAb foram avaliados quanto a sua toxicidade em células HEp-2 pelo teste do MTT. A atividade antiviral foi determinada pelos ensaios de tempo-de-adição, inibição da penetração e adsorção viral e atividade virucida, monitorados por ensaio de plaque. A inibição viral foi avaliada também por ensaio de imunofluorescência (IF), reação em cadeia da polimerase (PCR) e avaliação do tamanho do plaque. Os resultados mostraram que o PSAb, PSLe e PCAb não foram tóxicos para as células HEp-2, com CC₅₀ maior que 2.500, 4.000 e 10.000 µg/ml, respectivamente. A avaliação antiviral mostrou que PCAb não inibiu a replicação do PV-1. Entretanto, quando os polissacarídeos sulfatados foram adicionados durante (0 h) e após (+1 h e +2 h) a infecção, a inibição do PV-1 foi de 93,2, 100 e 94,3%, para PSAb, e 97,9, 88,8 e 64,5%, para o PSLe, respectivamente. Foi observada redução da porcentagem de focos fluorescentes de 85,4% para o PSAb e 96,4% para o PSLe. O PCR demonstrou que os polissacarídeos não inibiram a síntese de RNA viral. A avaliação do tamanho do plaque mostrou que o PSAb e o PSLe inibiram a dispersão viral, comprovado pela diminuição da área do plaque. Assim, pode-se sugerir que os polissacarídeos sulfatados do *L. edodes* e do *A. brasiliensis*, inibiram a replicação do PV-1 nos estágios iniciais, além de interferirem com dispersão do vírus.

Palavras chaves: Poliovírus. *Lentinula edodes*. *Agaricus brasiliensis*. Polissacarídeos sulfatados. Polissacarídeos carboximetilados. Atividade antiviral.

1 INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos são macromoléculas naturais que possuem uma variedade de atividades biológicas tais como imunomoduladora, anticarcinogênica, antibacteriana, antiviral (Markova et al., 2003; Kupfahl et al., 2006; Maruyama et al., 2006; Wang et al. 2009), entre outras. Essas propriedades podem ser induzidas ou modificadas alterando em parte a estrutura de sua molécula por derivação química (Chen et al., 2005).

¹ Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

² Laboratório de Polímeros, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará (LP/DQOI/UFC), Fortaleza, 60455-760, CE, Brazil.

³ Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

⁴ Autor para correspondência. Tel.: +55 43 3371 4617; fax: +55 43 33714788. E-mail address: relin@uel.br (R. E. C. Linhares).

Polissacarídeos sulfatados e carboximetilados podem ocorrer naturalmente ou serem sintetizados a partir de moléculas naturais, pela substituição parcialmente dos radicais hidroxilas por grupos sulfato ou carboximetil (Chaidedgumjorn et al., 2002; Möller et al., 2012). Estes polissacarídeos modificados tem mostrado atividade biológica maior que seu derivados naturais (Huang et al., 2008a, 2008b).

O poliovírus é um vírus de RNA simples fita, não envelopado e membro da família Picornaviridae. Sua replicação em geral ocorre nas células do intestino, mas o vírus pode se disseminar e atingir o sistema nervoso central desenvolvendo a doença aguda conhecida como poliomielite (Racaniello, 2006; Pallansch and Roos, 2007).

Um novo alvo para pesquisa com antivirais é a utilização de substâncias que mimetizam os receptores celulares utilizados pelos vírus na prevenção ou tratamento de infecções virais (Von Itzstein, 2007), um exemplo deste mecanismo de ação de antivirais é o de substâncias que mimetizam o heparan sulfato (Vaheri, 1964; Witvrouw and De Clercq, 1997; Balzarini and Van Damme, 2007; Ghosh et al., 2009; Rusnati et al., 2009;), que serve como receptor para muitos vírus diferentes.

Os polissacarídeos em sua constituição natural ou modificados por derivação química tem mostrado uma relevante atividade biológica, o que os tornam promissores candidatos para o desenvolvimento de novos fármacos antivirais. Assim, objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiviral do polissacarídeo sulfatado de *Lentinula edodes* e dos polissacarídeos sulfatado e carboximetilado de *Agaricus brasiliensis* na replicação do poliovírus 1.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 CÉLULAS E VÍRUS

Cultura de células HEp-2 (células de carcinoma de laringe humana – ATCC, CCL-23) foram crescidas em meio mínimo essencial modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM, Gibco-BRL, EUA), acrescido com 10% soro fetal bovino (SFB, Gibco-BRL, EUA), 2 mM glutamina (Sigma Chem. Co., EUA*), 100 µg/ml estreptomicina (*), 100 IU/ml penicilina (*) e 2,5 µg/ml anfotericina B (Bristol Myers-Squibb, Brasil).

O poliovirus tipo 1 (PV-1), foi cedido pelo UFRJ. A cepa foi propagada em células HEp-2, mantida a – 80° C e o título viral determinado por ensaio de plaque.

2.2 POLISSACARÍDEOS DO *LENTINULA EDODES* E *AGARICUS BRASILIENSIS*

O polissacarídeo sulfatado do *Lentinula edodes* (PSLe) e os polissacarídeos sulfatado (PSAb) e carboximetilado (PCAb) de *Agaricus brasiliensis* foram cedidos pelo Laboratório de Polímeros, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Brazil. A extração e sulfatação foi realizada de acordo com Gonzaga et al. (2005) e Singh et al. (2009), respectivamente. Os polissacarídeos foram dissolvidos em DMEM e estocadas a -20°C. No momento da inoculação foram diluídas até concentração de uso.

2.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade das substâncias testadas foi avaliada pelo sistema do dimethyl-thiazolyl-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma Chem. Co., USA). Células HEp-2 foram crescidas em microplacas de 96 poços e tratadas com PSLe, PSAb e PCAb em diferentes concentrações (PSLe, 5 a 4000 µg/ml; PSAb 5 a 2500 µg/ml e PCAb 5 a 10000 µg/ml). Após 72 h de incubação o teste foi realizado de acordo com as orientações do fabricante. Sob as mesmas condições, células sem tratamento foram usadas como controle. A concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) foi determinada como a concentração capaz de reduzir a densidade óptica em 50% em comparação com o controle. A CC₅₀ foi calculada pela análise por regressão linear da curva de dose-resposta gerada. O índice de seletividade (IS) foi calculado como a razão entre CC₅₀ e CI₅₀.

2.4 ENSAIO DE REDUÇÃO DE PLAQUE

A atividade antiviral pelo ensaio de redução de plaque foi realizada de acordo com Melo et al. (2008). Células HEp-2 foram cultivadas em microplacas com 24 poços a 37°C em 5% de CO₂. Após a confluência da monocamada, as células foram infectadas e tratadas de acordo com os protocolos descritos. As culturas de células foram então recobertas com agarose nutrient, sem SFB, e acrescido de antibióticos. As placas foram incubadas invertidas a 37° C em 5% de CO₂ por 48 h. As células foram fixadas com formalina 20%, coradas com cristal violeta 0.5%, em seguida foi removido a camada de agar nutriente. Concomitantemente, células infectadas e não tratadas foram utilizadas como controle. A porcentagem de inibição viral (% IV), determinada pela redução de plaque, foi calculada pela

formula: % IV = [1 – (número de plaques nos testes/ número de plaques no controle de vírus)] x 100.

A concentração inibitória de 50% (CI₅₀) foi determinada como a concentração capaz de reduzir o número de unidades formadoras plaques (UFP) em 50% em relação ao controle. A CI₅₀ foi determinada por regressão linear da curva de inibição viral para cada tratamento.

2.5 ATIVIDADE ANTIVIRAL

2.5.1 Atividade Virucida

Para avaliar o efeito direto das substancias na replicação viral, 10⁵ UFP/ml de PV-1 foram misturadas com volumes iguais de PSLe (6.25 a 50 µg/ml), de PSAb (200 a 800 µg/ml) e de PCAb (200 a 2000 µg/ml) por 1 h a 37 °C e em seguida foram inoculados nas culturas celulares. A inibição viral foi determinada pelo ensaio de redução de plaque.

2.5.2 Ensaio de Tempo-de-Adição

A avaliação do tempo de adição das substancias na replicação foi realizado como descrito em Yang et al. (2005). Células cultivadas em microplacas de 24 poços foram tratadas com concentrações de PSLe (6.25 a 50 µg/ml), de PSAb (200 a 800 µg/ml) e de PCAb (200 a 2000 µg/ml) antes (-1 h e -2 h), no momento (0 h) e após (1 h and 2 h) a infecção. A inibição viral foi monitorada pelo ensaio de redução de plaque.

2.5.3 Ensaio de Inibição da Adsorção

A inibição da adsorção foi realizado de acordo com Zhu et al. (2004). Em síntese, células cultivadas em microplacas de 24 poços foram infectadas com o vírus na presença do PSLe (6.25 a 50 µg/ml), de PSAb (200 a 800 µg/ml) e de PCAb (200 a 2000 µg/ml) e incubadas a 4 °C em 5% de CO₂ por 1 h. As células foram lavadas duas vezes com PBS, e a inibição viral foi monitorada pelo ensaio de redução de plaque.

2.5.4 Ensaio de Inibição da Penetração

A avaliação da inibição da penetração viral foi realizado de acordo com Cheng et al. (2004). Em síntese, células HEp-2 foram cultivadas em microplacas de 24 poços. Após 100% de confluência, as placas foram incubadas por 30 min a 4 °C. Em seguida as células foram inoculadas com as cepas virais e incubadas a 4 °C por 2 h. Após esse período de adsorção, as células foram tratadas com PSLe (6.25 a 50 µg/ml), de PSAb (200 a 800 µg/ml) e de PCAb (200 a 2000 µg/ml) e incubadas a 37 °C por 10 min. Em seguida o excesso de meio foi retirado e foi adicionado sobre as células PBS com pH 3,0 por 1 min. Imediatamente foi adicionado PBS pH 11,0. A inibição viral foi monitorada pelo ensaio de redução de plaque.

2.5.5 Avaliação do Tamanho do Plaque

Para avaliação do tamanho do plaque, foi medido o diâmetro de 15 a 30 plaques de cada poço para as quatro concentrações do PSLe, PSAb e PCAb testadas, bem como para o controle de vírus, de cada protocolo realizado. O diâmetro foi medido utilizando-se o programa Imagem J 1.44p (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). O valor de área média apresentado foi comparado entre as concentrações e o controle de vírus. Os resultados foram expressos em porcentagem de diminuição do diâmetro.

2.6 CONTROLE POSITIVO

PV-1 foi submetido ao tratamento com 1000 U/ml de interferon humano alfa-2 (Meizler Com. Intern. SA, Brazil) e monitorado por ensaio de plaque.

2.7 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

Células HEp-2 cultivadas sobre lamínulas em microplacas de 24 poços foram infectadas a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 2 e tratadas com o PSLe (6.25 a 50 µg/ml), PSAb (200 a 800 µg/ml) e PCAb (200 a 2000 µg/ml), de acordo com o protocolo, no momento da infecção (tempo 0 h). As culturas foram coletadas após 24 h, lavadas com PBS, e fixadas com acetona gelada (-20°C). As culturas foram tratadas com anticorpos de coelho anti-PV-1, e em seguida tratadas com IgG anti-coelho conjugado com FITC (Sigma

Chem. Co., USA). As lamínulas foram fixadas sobre laminas com PBS-glicerina e observadas sobre a luz ultravioleta (UV). Células não infectadas foram utilizadas como controle. As células foram examinadas com um microscópio de luz UV (Leica - DM 4500 B – DFC 300 FX), e 100 células por lamínula foram contadas. Os experimentos foram realizados em triplicata. O CI_{50} , definido como a concentração capaz de reduzir as células fluorescentes em 50% em relação ao controle de vírus, foi calculado através da análise, por regressão linear, das curvas de inibição viral.

2.8 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE ASSOCIADA A TRANSCRIPTASE REVERSA (RT-PCR)

A avaliação da atividade dos polissacarídeos na redução da síntese de RNA do PV-1 foi realizada por RT-PCR, como descrito por Pliaka et al. (2010). O RNA das células HEp-2 (2×10^6 células) infectado com PV-1 (MOI de 1) e tratado com PSLe (6.25 a 50 $\mu\text{g/ml}$), PSAb (200 a 800 $\mu\text{g/ml}$) e PCAb (200 a 2000 $\mu\text{g/ml}$) foi extraído usando um kit comercial (QIAamp® RNA Mini Kit, Qiagen). Inicialmente, a transcrição reversa foi realizada com um volume final de reação de 20 μl . Em síntese, a primeira mistura de reação contendo: primers randômicos (5 pmol), dNTPs (1 mM) e água destilada livre de RNase foi preparada para um volume de 7 ml. Sete microlitros primeira reação misturados com 5 ml do RNA viral extraído foram incubados por 5 min a 65° C. Em seguida, uma segunda mistura de reação contendo: tampão de reação M-MLV (1X), DTT (0.01 M), Transcriptase Reverssa M-MLV (100 U) (Invitrogen, Life Technologies Paisley, UK) e água destilada livre de RNase foi preparada para um volume de 8 ml. Em seguida, 8 μl da mistura da segunda reação foi adicionado para cada amostra e incubado na seguinte sequência: 10 min a 25° C, 50 min a 37° C e 15 min a 70° C. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 μl contendo 0,4 mM de dNTPs, 2 pmol de cada primer, 2.5 U de Taq DNA polimerase com tampão A de PCR (Invitrogen, Life Technologies Paisley, UK) e cDNA. Primers específicos para o gene do capsídeo do PV (VP1–VP4) foram 5'-AGTTTCACCGAAGGCGGA-3' (F) e 5'-CGCTGACACAAAACCAAGGA-3' (R), resultando em um produto amplificado de 102 bp. O programa do PCR consistiu de desnaturação a 95° C por 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação por 15s a 95° C, anelamento a 60° C por 1 min e extensão por 1 min a 72° C. O ciclo de extensão final foi de 7 min a 72° C. Dez microlitros do produto da PCR foram submetidos a um gel de poliacrilamida a 12%. A inibição viral ocasionada pelos

polissacarídeos foi calculada através da comparação de cada concentração com o controle de vírus (não tratado).

2.9 ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo teste ANOVA seguido pelo teste t de Student. Os valores foram considerados significantes para $P \leq 0.05$. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3 RESULTADOS

A avaliação da citotoxicidade realizada através do ensaio do MTT resultou em CC50, para o PSLe, PSAb e PCAb, maiores que 4000 $\mu\text{g/ml}$, 2500 $\mu\text{g/ml}$ e 10000 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

O PCAb, apesar de não apresentar toxicidade nas concentrações avaliadas, não apresentou inibição viral em nenhum dos protocolos testados, mesmo em concentrações elevadas.

As atividades antivirais de PSAb e de PSLe em diferentes tempos de infecção para o PV-1 estão mostradas na Figura 1. Quando o PSAb foi adicionado uma e duas horas antes da infecção (-1 h e -2 h), para a maior concentração testada (800 $\mu\text{g/ml}$), houve uma inibição de 26.0 e 20.8%, respectivamente. Já para o PSLe, nestes mesmos tempos, nenhuma inibição foi observada. A adição dos polissacarídeos, nas concentrações de 200, 400, 600 e 800 $\mu\text{g/ml}$, para o PSAb, e de 6.25, 12.5, 25 e 50 $\mu\text{g/ml}$, para o PSLe, no momento da infecção resultou em uma inibição viral de 49.5, 77.7, 86.4 e 93.2%, e de 38.7, 66.8, 83.0 e 97.9%, respectivamente. Já para os tempos de adição das substâncias uma e duas horas pós-infecção (+1 h e +2 h), nas mesmas concentrações, resultaram, para o PSAb, em inibições de 4.8, 52.4, 85.7 e 100.0%, para +1 h, e 45.2, 69.8, 86.8 e 94.3%, para +2 h. Já para a adição do PSLe nos tempos de +1 h e +2 h, nas mesmas concentrações, resultou em inibições de zero, zero, 11.2 e 88.8% e zero, zero, 7.6 e 64.5%, respectivamente.

A avaliação da inibição da adsorção viral, para o PSAb, resultou em inibições de 30.9, 47.9, 54.6 e 60.0% (Figura 2). Entretanto, este mesmo teste não apresentou inibição para o PSLe. A atividade virucida e avaliação da inibição da penetração não apresentaram inibição, nas concentrações testadas, para ambos os vírus.

A atividade antiviral monitorada pelo ensaio de imunofluorescência resultou em inibições da replicação viral, constatado pela diminuição do número de células fluorescentes em comparação ao controle (Tabela 1).

A avaliação do tamanho do plaque do PV-1 para a adição do PSLe e do PSAb em diferentes tempos de infecção demonstrou uma diminuição da área do plaque (Figura 3). Quando os polissacarídeos foram adicionados a -1 e -2 h de infecção nenhuma inibição foi observada. A adição do PSAb +1 e +2 h de infecção, nas mesmas concentrações testadas, resultou em uma diminuição na área do plaque de 55.2, 63.3, 75.7 e 90.8%, para +1 h, e 56.3, 81.4, 80.7 e 89.9%, para +2 h. Para a adição do PSLe, a diminuição na área do plaque foi de 12.0, 65.0, 83.8 e 91.6%, para +1 h, e 25.2, 66.0, 82.5 e 95.6%, para +2 h. A determinação do tamanho do plaque no tempo de 0 h de infecção, para ambos os vírus, foi prejudicada pelo baixo número de plaques.

A atividade antiviral dos polissacarídeos sulfatados foi monitorada também pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Os resultados encontrados, nas mesmas concentrações, mostraram que o PSAb e o PSLe não inibem a síntese de RNA em comparação ao controle de vírus.

Os CI_{50} e seus respectivos índices de seletividade, para ambos os polissacarídeos, calculados no tempo de 0 h de infecção são mostrados na Tabela 2.

4 DISCUSSÃO

Neste estudo foram avaliadas as atividades antivirais de compostos isolados dos cogumelos, *Agaricus brasiliensis* e *Lentinula edodes* na replicação do poliovírus. Os resultados mostraram que tanto o PSAb como o PSLe inibem a replicação do PV-1 nos estágios iniciais. O mesmo tipo de inibição foi observado para outros polissacarídeos sulfatados (Cardozo et al., 2011; Pujol et al., 2012). Uma análise comparativa da atividade antiviral desses polissacarídeos sulfatados como seus similares naturais, sem sulfatação, (avaliados previamente por Rincão et al., 2012 e Faccin et al., 2007, respectivamente) mostrou uma atividade mais efetiva do PSLe e do PSAb. Embora o tenha sido necessário a utilização de concentrações mais altas do PSAb, em comparação ao polissacarídeo natural, para obter os mesmos valores de inibição, a avaliação do índice de seletividade para esses dois polissacarídeos destaca o PSAb como mais efetivo. Resultados similares foram obtidos por Huang et al. (2008b), que mostraram maior efetividade do derivado sulfatado na inibição do vírus da doença infecciosa bursal.

A avaliação da atividade citotóxica do PCAb, mostrou que a carboximetilação, assim como a sulfatação, tornam essas moléculas menos tóxicas. Entretanto, o PCAb não foi efetivo em inibir a replicação do PV-1, indicando que a sulfatação é uma modificação mais efetiva no controle da replicação viral. Möller et al. (2012) demonstraram o mesmo efeito comparando os derivados sulfatados e carboximetilados de um polissacarídeo.

O uso de moléculas que se assemelham aos receptores celulares para o tratamento e prevenção das infecções virais tem demonstrado ser um campo promissor (Von Itzstein, 2007; Ghosh et al., 2009) na terapia antiviral. O PSAb também se mostrou efetivo em inibir a adsorção viral, assim como outros polissacarídeos sulfatados (Damonte et al., 1994; Chattopadhyay et al., 2007). Esse efeito inibitório é provavelmente o responsável pela inibição encontrada para o tempo de 0 h de adição da substância. Entretanto, o PSAb também inibe a replicação viral após a entrada na célula, pois foi observada uma forte inibição viral para os tempos de +1 h e +2 h. A inibição após a penetração foi constatada também para o PSLe. Apesar dos polissacarídeos não inibirem especificamente a síntese de RNA viral, a inibição pós-infecção foi comprovada pela diminuição no número de células com foco fluorescente.

A avaliação do tamanho do plaque teve por objetivo verificar a atividade dos polissacarídeos na inibição da dispersão viral. Tanto o PSAb quanto o PSLe foram capazes de inibir a dispersão viral, indicada por uma diminuição na área dos plaques. Um efeito similar foi constatado por Mikloska and Cunningham (2001), Jessen et al. (2004) e Ekblad et al. (2010) na replicação do herpes simplex vírus.

A análise dos resultados nos permite sugerir que o PSAb e o PSLe inibem a dispersão viral e replicação do PV-1 nos estágios iniciais. Para o PSAb essa inibição é provavelmente decorrente da inibição da adsorção do vírus a seus receptores específicos na célula. Apesar disso, os dois polissacarídeos inibem a replicação do PV-1 após sua entrada na célula. Entretanto, estudos mais aprofundados são necessários para se determinar qual fase do ciclo viral esses polissacarídeos estariam agindo.

5 AGRDECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES e Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

6 REFERENCIAS

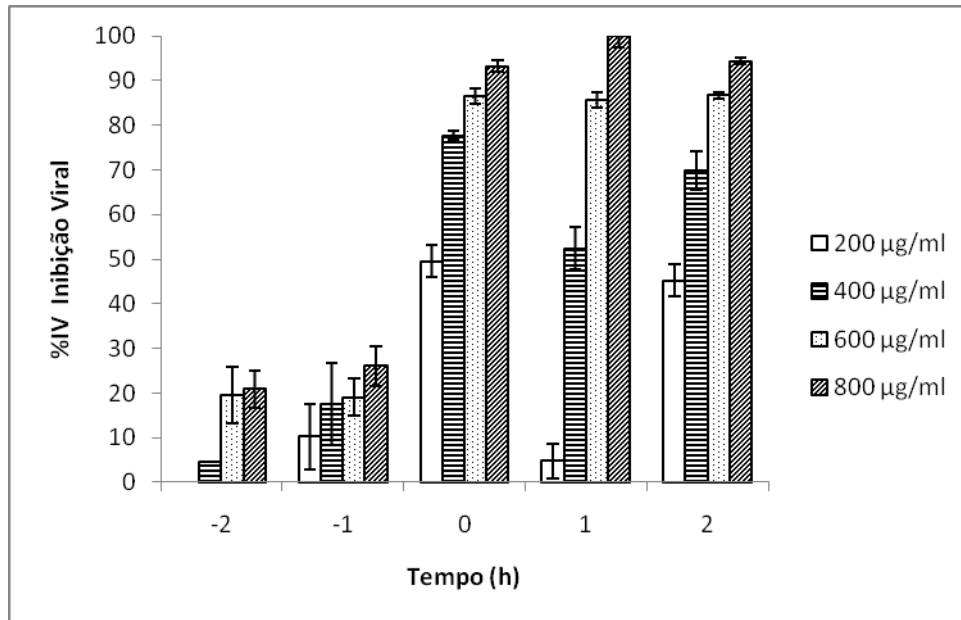
- Balzarini, J. and Van Damme, L. Microbicide drug candidate to prevent HIV infection. *The Lancet*; 369:787–797, 2007.
- Cardozo, F.T.G.S.; Camelini, C.M.; Mascarello, A.; Rossi, M.J.; Nunes, R.J.; Barardi, C.R.M.; Mendonça, M.M. and Simões, C.M.O. Antiherpetic activity of a sulfated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* mycelia. *Antiviral Research*; 92:108–114, 2011.
- Chaidedgumjorn, A.; Toyoda, H.; Woo, E.R.; Lee, K.B.; Kim, Y.S.; Toida, T. and Imanari, T. Effect of (1→3) and (1→4) – linkages of fully sulfated polysaccharides on their anticoagulant activity, *Carbohydrate Research*; 337:925–933, 2002.
- Chattopadhyay, K.; Mateu, C.G.; Mandal, P.; Pujol, C.A.; Damonte, E.B. and Ray, B. Galactan sulfate of *Grateloupia indica*: Isolation, structural features and antiviral activity. *Phytochemistry*; 68:1428–1435, 2007.
- Chen, J.Y.; Wu, G.R.; Wang, J.A.; Lu, C.M.; Zhang, W.M. and Jiang, J.H. Sulfation techniques of *Bletilla striata* polysaccharide by orthogonal design. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*; 1:43–46, 2005.
- Cheng, H.Y.; Lin, T.C.; Yang, C.M.; Wang, K.C.; Lin, L.T. and Lin, C.C. Putranjivain A from *Euphorbia jolkini* inhibits both virus entry and late stage replication of herpes simplex virus type 2 *in vitro*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 53:577–583, 2004.
- Damonte, E.; Neyts, J.; Pujol, C.A.; Snoeck, R.; Andrei, C.F.; Ikeda, S.; Witvrouw, M.; Reymen, D.; Haines, H.; Matulewicz, M.C.; Cerezo, A.; Coto, C.E. and De Clercq, E. antiviral activity of a sulphated polysaccharide from the red seaweed *nothogenia fastigiata*. *Biochemical Pharmacology*; 47:2181-2192, 1994.
- Ekblad, M.; Adamiak, B.; Bergstrom, T.; Johnstone, K.D.; Karoli, T.; Liu, L.; Ferro, V. and Trybala, E. A highly lipophilic sulfated tetrasaccharide glycoside related to muparfostat (PI-88) exhibits virucidal activity against herpes simplex virus. *Antiviral Research*; 86:196–203, 2010.
- Faccin, L.C.; Benati, F.; Rincão, V.P.; Mantovani, M.S.; Soares, S.A.; Gonzaga, M.L.; Nozawa, C. and Linhares, R.E.C. Antiviral activity of aqueous and ethanol extracts and of an isolated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* against poliovirus type 1. *Letters in Applied Microbiology*; 45: 24-28, 2007.
- Ghosh, T.; Chattopadhyay, K.; Marschall, M.; Karmakar, P.; Mandal, P. and Ray, B. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: from structure–activity analysis to clinical evaluation. *Glycobiology*; 19:2–15, 2009.
- Gonzaga, M.L.C.; Ricardo, N.M.P.S.; Heatley, F. and Soares, S.A. Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill. *Carbohydrate Polymers*; 60:43-49, 2005.
- Huang, X.; Hu, Y.; Zhao, X.; Lu, Y.; Wang, J.; Zhang, F. and Sun, J. Sulfated modification can enhance the adjuvant activity of astragalus polysaccharide for ND vaccine. *Carbohydrate Polymers*; 73: 303–308, 2008a.

- Huang, X.; Wang, D.; Hu, Y.; Lu, Y.; Guo, Z.; Kong, X. and Sun, J. Effect of sulfated astragalus polysaccharide on cellular infectivity of infectious bursal disease virus. *International Journal of Biological Macromolecules*; 42:166–171, 2008b.
- Jenssen, H.; Andersen, J.H.; Mantzilas, D. and Gutteberg, T.J. A wide range of medium-sized, highly cationic, α -helical peptides show antiviral activity against herpes simplex virus. *Antiviral Research*; 64:119–126, 2004.
- Kupfahl, C.; Geginat, G. and Hof, H. Lentinan has a stimulatory effect on innate and adaptive immunity against murine *Listeria monocytogene* infection. *International Immunopharmacology*; 6:686-696, 2006.
- Markova, N.; Kussovski, V.; Drandarska, I.; Nikolaeva, S.; Georgieva, N.; and Radoucheva, T. Protective activity of Lentinan in experimental tuberculosis. *International Immunopharmacology*; 3:1557-1562, 2003.
- Maruyama, S.; Sukekawa, Y.; Kaneko, Y. and Fujimoto, S. Anti-tumor activities of lentinan and micellapist in tumor-bearing mice. *Gan To Kagaku Ryoho*; 33:1726-1729, 2006.
- Melo, F.L.; Benati, F.J.; Roman, W.A.Jr.; Mello, J.C.P.; Nozawa, C. and Linhares, R.E.C. The in vitro antiviral activity of an aliphatic nitrocompound from *Heteropteris aphrodisiac*. *Microbiological Research*; 163:136-139, 2008.
- Mikloska, Z. and Cunningham, A.L. Alpha and gamma interferons inhibit herpes simplex virus type 1 infection and spread in epidermal cells after axonal transmission. *Journal of Virology*; 75:11821–11826, 2001.
- Moller, S.; Schmidtke, M.; Weiss, D.; Schiller, J., Pawlike, K.; Wutzler, P. and Schnabelrauch, M. Synthesis and antiherpetic activity of carboxymethylated and sulfated hyaluronan derivatives. *Carbohydrate Polymers*; 90:608– 615, 2012.
- Pallansch, M. and Roos, R. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. Chapter: 25. *In: Fields, B.N., Knipe, D., Howley, P.M., Griffim, R.A., Lamb, M.A., Martin, B., Roizman, B., Straus, S.S. (eds.). Fields Virology. 5. ed. United States of America: Lippincott Williams & Wilkins Desktop Division, 2007.*
- Pliaka, V.; Dedepsidis, E.; Kyriakopoulou, Z.; Mpirli, K.; Tsakogiannis, D.; Pratti, A.; Levidiotou-Stefanou, S. and Markoulatos, P. A new RT-PCR assay for the identification of the predominant recombination types in 2C and 3D genomic regions of vaccine-derived poliovirus strains. *Molecular and Cellular Probes*; 24:115–123, 2010.
- Pujol, C.A.; Ray, S.; Ray, B. and Damonte, E.B. Antiviral activity against dengue virus of diverse classes of algal sulfated polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*; 51:412– 416, 2012.
- Racaniello, V.R. One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology*, 344: 9-16, 2006.
- Rincão, V.P.; Yamamoto, K.A.; Ricardo, N.M.P.S.; Soares, S.A.; Meirelles, L.D.P.; Nozawa, C. and Linhares, R.E.C. Polysaccharide and extracts from *Lentinula edodes*: structural features and antiviral activity. *Virology Journal*; 9:37, 2012.

- Rusnati, M.; Vicenzi, E.; Donalisio, M.; Oreste, P.; Landolfo, S. and Lembo, D. Sulfated K5 Escherichia coli polysaccharide derivatives: a novel class of candidate antiviral microbicides. *Pharmacology & Therapeutics*; 123:310–322, 2009.
- Singh, V.; Srivastava, A. and Tiwari A. Structural elucidation, modification and characterization of seed gum from *Cassia javahikai* seeds: A non-traditional source of industrial gums. *International Journal of Biological Macromolecules*; 45:293–297, 2009.
- Vaheri, A. Heparin and related polyionic substances as virus inhibitors. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. Supplementum*; 171:1–98, 1964.
- Von Itzstein, M. The war against Influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*; 6:967–974, 2007.
- Wang, S.; Welte, T.; Fang, H.; Chang, G.J.J.; Born, W.K.; O'Brien, R.L., Sun, B.; Fujii, H.; Kosuna, K.I. and Wang, T. Oral Administration of Active Hexose Correlated Compound Enhances Host Resistance to West Nile Encephalitis in Mice. *The Journal of Nutrition*; 139:598-602, 2009.
- Witvrouw, M. and De Clercq, E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *General Pharmacology*; 29, 497–511, 1997.
- Yang, C.M.; Cheng, H.Y.; Lin, T.C.; Chiang, L.C. and Lin, C.C. Acetone, ethanol and methanol extracts of *Phyllanthus urinari* inhibit HSV-2 infection in vitro. *Antiviral Research*; 67:24-30, 2005.
- Zhu W, Chiu LCM, Ooi VEC, Chan PKS, Ang PO Jr. Antiviral property and mode of action of a sulphated polysaccharide from *Sargassum patens* against herpes simplex virus type 2. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24:81–85.

Figura 1 – Atividade antiviral do PSAb (a) e do PSLe (b) em diferentes tempos de adição na replicação do PV-1.

a)



b)

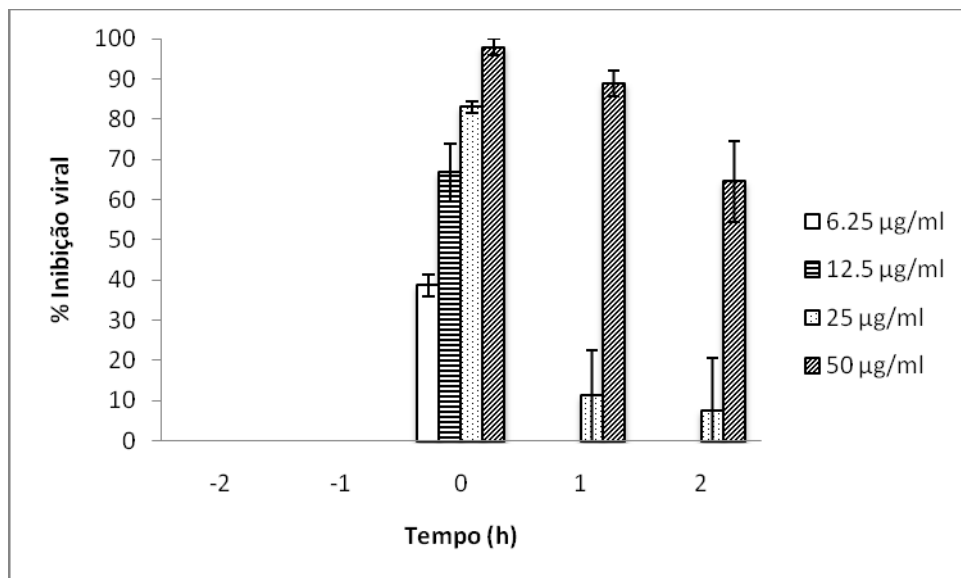


Figura 2 – Inibição da adsorção do PV-1 pelo PSAb.

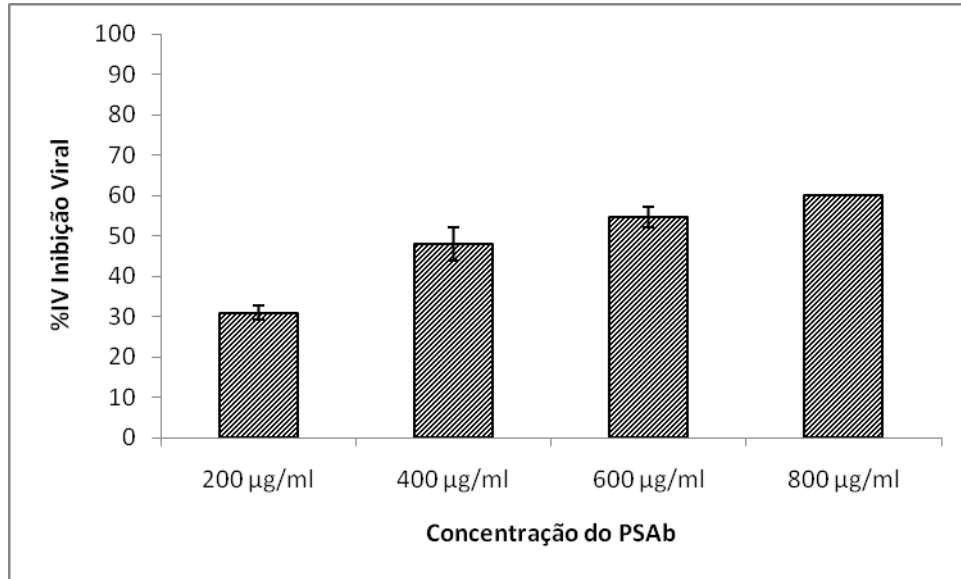
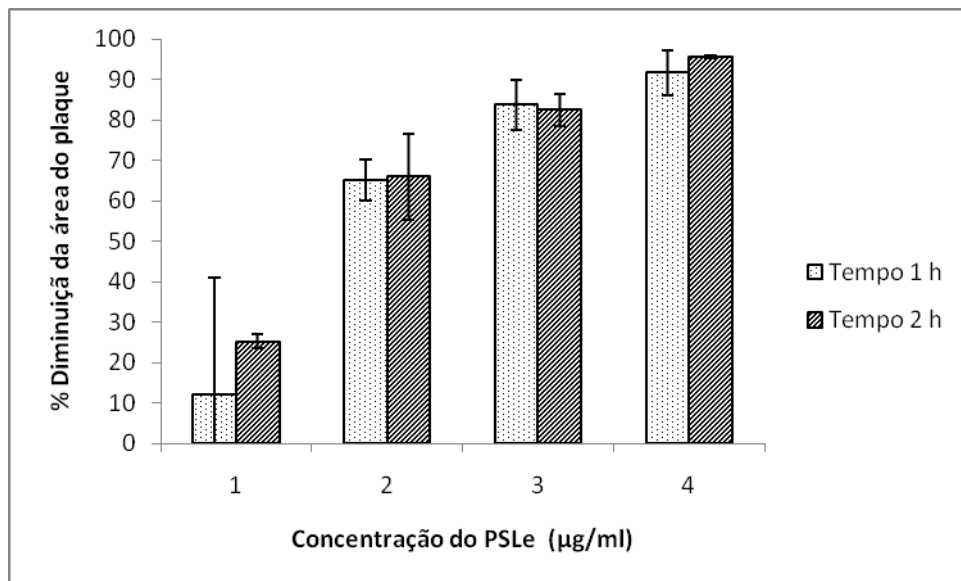


Figura 3 – Avaliação da redução do tamanho do plaque pelo tempo de adição do PSLe (a) e do PSAb (b) na replicação do PV-1.

a)



b)

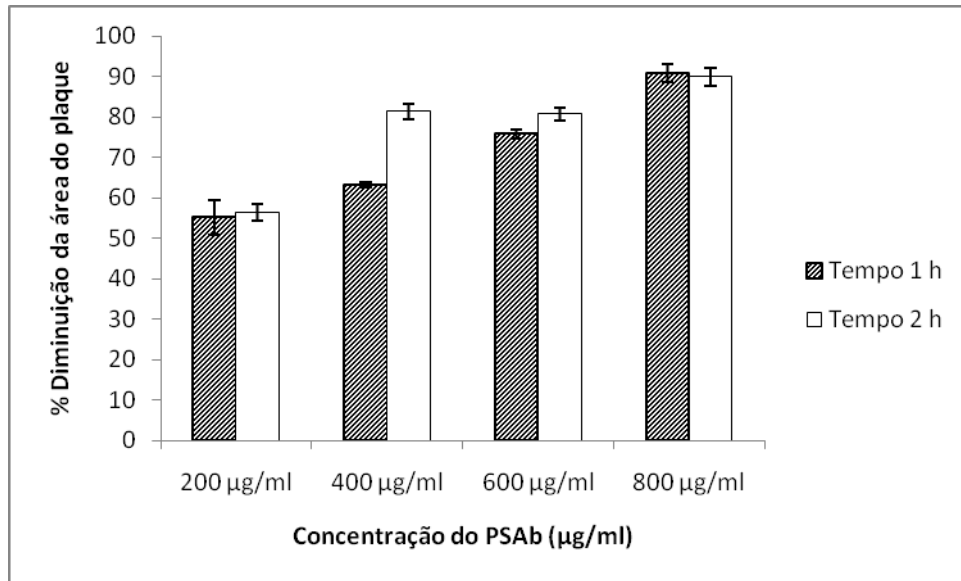


Tabela 1 – Atividade antiviral do PSLe e do PSAb na replicação do PV-1 pelo ensaio de imunofluorescência.

Polissacarídeo	Concentrações (µg/ml)	Células com foco fluorescente	% de Inibição Viral
PSLe	CV	55,6 ± 1,2 ^a	-----
	6.25	40,8 ± 2,9	26,6 ± 5,3
	12.5	26,5 ± 2,5	47,6 ± 4,5
	25	11,7 ± 0,8	78,9 ± 1,5
	50	2,0 ± 1,0	96,4 ± 1,7
PSAb	CV	80,9 ± 1,6	-----
	200	76,3 ± 7,7	5,8 ± 9,6
	400	46,9 ± 3,0	42,1 ± 3,7
	600	17,1 ± 2,5	78,8 ± 3,1
	800	11,8 ± 1,1	85,4 ± 1,4

CV – controle de vírus; células infectadas com o HSV-1 ou BoHV-1, sem LeSP e PSAb

a – desvio padrão

Tabela 2 – Índice de seletividade do PSLe e do PSAb para PV-1.

	CC ₅₀ ^a (µg/ml)	CI ₅₀ ^b (µg/ml)	IS ^c
PSLe	>4000	8,7	>460
PSAb	>2500	118	>21
PCAb	>10000	----	----

a – concentração citotóxica de 50%

b – concentração inibitória de 50%

c – índice de seletividade