



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VINÍCIUS PIRES RINCÃO

**AÇÃO DE EXTRATOS DE *Lentinula edodes* E β -GLUCANA
ISOLADA DE *Agaricus brasiliensis* NA REPLICAÇÃO DO
POLIOVÍRUS E HERPESVÍRUS BOVINO**

Londrina
2008

VINÍCIUS PIRES RINCÃO

**AÇÃO DE EXTRATOS DE *Lentinula edodes* E β -GLUCANA
ISOLADA DE *Agaricus brasiliensis* NA REPLICAÇÃO DO
POLIOVÍRUS E HERPESVÍRUS BOVINO**

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

Orientadora Profa. Dra. Rosa Elisa Carvalho Linhares.

Londrina
2008

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

R579a Rincão, Vinícius Pires.

Ação de estratos de *Lentinula edodes* e β -Glucana isolada de *Agaricus brasiliensis* na replicação do poliovírus e herpesvírus bovino / Vinícius Pires Rincão. – Londrina, 2008.
67f. : il.

Orientador: Rosa Elisa Carvalho Linhares.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2008.

Inclui bibliografia.

1. Microbiologia – Teses. 2. Cogumelos medicinais – Teses. 3. Shiitake – Teses. 5. Vírus do herpes – Teses. I. Linhares, Rosa Elisa Carva-lho. II. Uni-versidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbilogia. III. Título.

CDU 579

VINÍCIUS PIRES RINCÃO

**AÇÃO DE EXTRATOS DE *Lentinula edodes* E β -GLUCANA
ISOLADA DE *Agaricus brasiliensis* NA REPLICAÇÃO DO
POLIOVÍRUS E HERPESVÍRUS BOVINO**

BANCA EXAMINADORA

Sueli Fumie Yamada Ogatta

Tânia Ueda Nakamura

Rosa Elisa Carvalho Linhares

Londrina, 22 de fevereiro de 2008.

**Dedico este trabalho com todo
meu amor para minha esposa
Patrícia**

AGRADECIMENTOS

À Paty pelo o amor, carinho, paciência e principalmente pela compreensão por inúmeras horas em que não estive presente.

À minha família, pelos ensinamentos de vida e pelo incentivo.

Agradeço à minha orientadora, Professora Rosa Elisa Carvalho Linhares, por me acolher em seu laboratório, pelos ensinamentos, paciência, confiança e amizade.

Ao Professor Carlos Nozawa pela amizade, ajuda, ensinamentos e pelos puxões de orelha que me ensinaram muito.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, Flávio, Fabrício, Lígia, Alessandra, Mariana, Bárbara, Daniel, Kristie, Professora Ana Paula, Jucevânia, Gustavo, Airton, Érica e Daniele pelas risadas, apoio e por todo o tempo que passamos juntos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia pelos conhecimentos que compartilharam comigo.

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

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

RINCÃO, Vinícius Pires. **Ação de extratos de *Lentinula edodes* e β -Glucana isolada de *Agaricus brasiliensis* na replicação do poliovírus e herpesvírus bovino.** 2008. 62f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

Compostos isolados do basidiomiceto *Lentinula edodes*, conhecido como shiitake, apresentam propriedades imunomoduladora, antimetastásica e antimicrobiana. O *Agaricus brasiliensis*, um basidiomiceto conhecido como Cogumelo do Sol, é amplamente utilizado na medicina popular no tratamento de várias doenças e compostos isolados do seu micélio e do corpo de frutificação demonstraram propriedades terapêuticas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiviral do extrato aquoso (AqE) e etanólico (EtOHE) obtidos de *L. edodes* e de uma β glucana isolada do *A. brasiliensis* na replicação de poliovírus tipo 1 (PV-1) e herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1). A adição do AqE, EtOHE e β glucana foi feita antes, durante e após a infecção e a atividade antiviral monitorada por ensaio de plaque. Foi também avaliada a atividade virucida e inibição da adsorção viral pelo AqE e EtOHE. Os resultados mostraram que o AqE e a β -glucana, quando adicionados as células durante a infecção (tempo 0 h) inibiram a replicação do PV-1 em 82.46% e 68.53%, e a do BHV-1 em 89.88% e 83.18% respectivamente. Enquanto o EtOHE foi mais efetivo no tempo de 1 h de infecção tanto para o PV-1 (76.92%) quanto para o BHV-1 (90.63%). O AqE e EtOHE apresentaram baixa atividade virucida e inibição da adsorção viral não significativa para ambos os vírus. A atividade antiviral também foi demonstrada para o AqE e EtOHE por reação de imunofluorescência indireta, no tempo 0 h da infecção. Diante dos dados obtidos sugerimos que o AqE, EtOHE e β -glucana atuam nos processos iniciais da replicação do PV-1 e BHV-1.

Palavras chave: *Lentinula edodes*. *Agaricus brasiliensis*. Antiviral activity. Poliovirus. Bovine herpesvirus.

RINCÃO, Vinícius Pires. **Ação de extratos de *Lentinula edodes* e β -Glucana isolada de *Agaricus brasiliensis* na replicação do poliovírus e herpesvírus bovino.** 2008. 62f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

Compounds isolated from the basidiomycete *Lentinula edodes*, known as shiitake, show immunomodulatory, antimetastatic and antimicrobial properties. *Agaricus brasiliensis*, a basidiomycete known as “cogumelo do sol,” is widely utilized in popular medicine for the treatment of various diseases, and compounds isolated from their mycelium and fruiting body show therapeutic properties. The aim of this study was to determine the antiviral activity of aqueous (AqE) and ethanol (EtOHE) extracts obtained from *L. edodes* and a β -glucan isolated from *A. brasiliensis* in the replication of poliovirus type 1 (PV-1) and bovine herpes virus type 1 (BHV-1). The addition of AqE, EtOHE and β -glucan was done before, during and after infection, and antiviral activity was monitored by the plaque assay. Also evaluated were the virucidal activity of and inhibition of viral adsorption by AqE and EtOHE. The results showed that AqE and β -glucan, when added to the cells during infection (time 0 h), inhibited the replication of PV-1 by 82.46% and 68.53% and of BHV-1 by 89.88 and 83.18%, respectively. However, EtOHE was more effective at time 1 h of infection against both PV-1 (76.92%) and BHV-1 (90.63%). AqE and EtOHE showed low virucidal activity, and inhibition of viral adsorption was not significant for the two viruses. Antiviral activity of the AqE and EtOHE was demonstrated by the direct immunofluorescence reaction, at time 0 h of infection. Based on the data obtained, we suggest that AqE, EtOHE and β -glucan act on the initial processes of replication of PV-1 and BHV-1.

Keywords: *Lentinula edodes*. *Agaricus brasiliensis*. Antiviral activity. Poliovirus. Bovine herpesvirus.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 ANTIVIRAIS	10
3 ATIVIDADE ANTIVIRAL DE PRODUTOS NATURAIS	12
4 LENTINULA EDODES	17
5 AGARICUS BRASILIENSIS	18
6 B-GLUCANAS	19
7 POLIOVÍRUS	20
8 HERPESVÍRUS BOVINO	22
9 OBJETIVOS	23
9.1 OBJETIVO GERAL	23
9.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
REFERÊNCIAS	24
ARTIGO	36

1 INTRODUÇÃO

A origem dos vírus ainda hoje permanece incerta para os pesquisadores. Mas independente de como surgiram, estas microscópicas entidades tornaram-se um importante problema para a saúde e qualidade de vida da população mundial. Relatos de milhares de anos atrás já descreviam doenças com características de infecções virais. Acredita-se que o vírus da varíola surgiu a mais de 5000 anos atrás (ESPOSITO & FENNER, 2001; JEROME, 2005). Esta doença foi responsável por milhares de mortes durante séculos, até que um programa da Organização Mundial da Saúde que promoveu a vacinação em massa da população culminou em sua erradicação, anunciada em maio de 1980, sendo o último caso registrado em 26 de outubro de 1977 (HENDERSON, 1987).

Ainda hoje o impacto causado por algumas viroses é enorme. As pandemias, como as causadas pelo vírus influenza e pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), mostram que a falta de medidas preventivas e terapêuticas para as infecções virais pode resultar em graves conseqüências (JONES, 1998). Para combater esses agentes infecciosos a medicina conta com poucas alternativas. A vacinação é a mais efetiva intervenção contra doenças causadas por vírus (ARVIN & GREENBERG, 2006), pois proporciona uma eficiente e duradoura resposta imune. A erradicação da varíola e o controle da poliomielite, por exemplo, foram realizados tendo como ferramentas as vacinas. No entanto para muitos outros vírus ainda não existem vacinas. Dados mostram que 39,5 milhões de pessoas vivem com o HIV em todo mundo (UNAIDS/WHO, 2006); estima-se que 170 milhões de pessoas estejam infectadas com o vírus da hepatite C (HCV) (LAUER & WALKER, 2001; ZUO *et al.*, 2007; KONG *et al.*, 2007); em 1998 havia pelo menos 350 milhões de portadores do vírus da hepatite B (HBV) (JONES, 1998), e em 2004, aproximadamente 460 milhões de pessoas em todo mundo já eram portadoras do HBV (RADJEF *et al.*, 2004). Estes fatos tornam a pesquisa com antivirais ainda mais importante e necessária.

Muitos esforços foram gastos na tentativa de desenvolver uma vacina eficiente contra doenças causadas por alguns vírus sem resultados satisfatórios. Vírus como HIV e HCV são instáveis geneticamente enquanto outros vírus como os herpesvírus possuem potentes mecanismos de escape da resposta imune. Por não ser capaz de vencer obstáculos como estes, juntamente com a emergência de outros vírus para os quais os mecanismos de infecção são pouco conhecidos, a vacinação, embora ideal, é uma ferramenta restrita e muitas vezes ineficaz (DE CLERCQ, 2002; JEROME, 2005). Sendo assim a terapia com drogas

antivirais é em muitos casos o único caminho para o controle das viroses. Esses compostos, apesar de possuírem diferentes alvos moleculares, se concentram em uma gama muito pequena de vírus. Isto abre uma enorme possibilidade para pesquisas nesta área (JONES, 1998).

2 ANTIVIRAIS

A pesquisa com compostos antivirais teve sua origem no início da década de 1950, mas pelo fato dos vírus utilizarem a maquinaria celular para sua replicação, muitos pesquisadores achavam ser impossível a utilização de um medicamento seletivo (JONES, 1998).

Apesar das características de replicação dos vírus apontarem para uma impossibilidade de ação antiviral seletiva, vários pesquisadores realizaram experimentos buscando esta finalidade. O ponto de início e, para a época, o mais provável, era o teste com compostos que já haviam apresentado atividade antimicrobiana. Assim o primeiro composto a ser testado como antiviral foi a tiosemicarbazona, contra o vírus vaccínia. Este composto era usado para o tratamento da tuberculose (HAMRE *et al.*, 1950; BROWNLEE & HAMRE, 1951; THOMPSON *et al.*, 1951). Em 1960, a metisazona, derivado da tiosemicarbazona, foi utilizada na profilaxia e tratamento da varíola (JONES, 1998). Posteriormente surgiu a idoxiuridina, um análogo de nucleosídeo, de ação seletiva para o herpes simplex vírus (HSV) (KAUFMAN & HEIDELBERGER, 1964).

Mesmo demonstrando capacidade em combater efetivamente infecções virais, algumas das substâncias utilizadas apresentavam alta toxicidade, quando administradas por via sistêmica.

O Ara-A foi o primeiro análogo de nucleosídeo a ser utilizado como antiviral, administrado por via sistêmica, sem gerar toxicidade significativa para o hospedeiro (JONES, 1998). Este composto, mais tarde conhecido como vidarabina, é efetivo contra o HSV e varicela-zoster vírus (VZV) (SCHABEL, 1968; BUCHANAN & HESS, 1985).

Apesar de apresentar baixa toxicidade sistêmica, a vidarabina possui uma baixa toxicidade seletiva (FIELD *et al.*, 2006), pois a forma trifosfatada pode ser gerada em qualquer célula, infectada ou não. Foi somente no final da década de 1970, com o desenvolvimento do Aciclovir, para o tratamento de herpesvirus, que foi possível alcançar uma seletividade absoluta. Este composto tem sua atividade dependente de uma timidina quinase codificada pelo vírus e, portanto, age somente nas células infectadas. Esta descoberta marca o início da era da terapia antiviral (JONES, 1998; JEROME, 2005).

Os análogos de nucleosídeo foram o alvo das pesquisas com antivirais até o final da década de 1980. Com desenvolvimento da biologia molecular foi possível conhecer e melhor compreender o ciclo replicativo dos vírus, resultando em uma enorme quantidade de

alvos para a terapia antiviral (JONES, 1998). Porém, a partir desta década, o elevado custo fez com que as pesquisas com antivirais se concentrassem nas doenças virais com maior importância epidemiológica (WIGG, 2002). Atualmente, a maioria dos novos fármacos com propriedades antivirais são focados em um pequeno grupo de vírus. Isso corrobora a importância do desenvolvimento de novas substâncias com atividade antiviral para vírus cujas infecções ainda não são controláveis (JONES, 1998).

Apesar de meio século de pesquisas com antivirais, pouco mais de 40 drogas (DE CLERCQ & FIELD, 2006) foram descobertas e liberadas oficialmente para o uso clínico. Desses compostos, pelo menos metade é usada para o tratamento de infecções causadas por HIV (DE CLERCQ, 2005). As outras se concentram em uma gama pequena de vírus, entre eles o HBV, HCV, vírus influenza, HSV, VZV e citomegalovírus (CMV) (DE CLERCQ, 2004; DE CLERCQ 2005).

Muitos dos compostos testados e já utilizados contra vírus possuem uma certa toxicidade (DE CLERCQ, 2001), como por exemplo, o aciclovir que pode apresentar neurotoxicidade, e o ganciclovir que pode provocar problemas renais nos pacientes tratados (EMST & FRANEY, 1998; WAUGH *et al.*, 2002). Doenças virais emergentes, como a síndrome respiratória severa aguda (SARS) que foi descrita pela primeira vez em 2003 (LI, 2005a), que se tornaram um grave problema de saúde pública, bem como cepas resistentes a quimioterapia atual, como por exemplo, herpesvírus, HBV e HIV (RICHMAN, 2006), têm estimulado pesquisadores a procurarem fontes alternativas de compostos químicos para o tratamento das infecções virais.

3 ATIVIDADE ANTIVIRAL DE PRODUTOS NATURAIS

Uma das alternativas para o tratamento das viroses é a busca por substâncias de origem natural, principalmente extratos e compostos isolados de plantas e fungos. Há muito tempo, os povos indígenas usam produtos de origem natural para tratar várias doenças inclusive as infecciosas. Estas substâncias são reconhecidas pela indústria farmacêutica por sua ampla diversidade estrutural bem como pela variedade de atividades farmacológicas (STROHL, 2000).

Os produtos naturais podem ser fontes de moléculas úteis como fármacos, ou ainda gerar modelos para produção de substâncias com atividade biológica (NIELSEN, 2002). Segundo STROHL (2000) um em cada três dos medicamentos mais vendidos do mundo, são produtos naturais ou derivados deles.

Estes produtos naturais são a maior fonte de novas moléculas com propriedades terapêuticas em várias áreas, incluindo doenças infecciosas (CLARDY & WALSH, 2004). Apenas uma porção insignificante de toda diversidade de fungos, fauna e flora marinha, bactérias e plantas foi explorada até então, possibilitando assim, amplas oportunidades para pesquisas futuras (HARVEY, 1999; COS *et al.*, 2006).

Nos últimos anos diversos trabalhos foram publicados sobre a atividade antiviral de produtos naturais. A maioria destes, descreve pesquisas realizadas com extratos ou compostos isolados de plantas, pois elas são selecionadas por serem amplamente utilizados na medicina popular (RUFFA *et al.*, 2004).

BARRIO & PARRA (2000), provaram que um extrato aquoso de *Phyllanthus orbicularis* possui atividade antiviral seletiva para herpesvirus bovino tipo 1 (BHV-1) e para Herpes simplex vírus tipo 2 (HSV-2). BEDOYA *et al.* (2001), encontraram atividade antiviral em extratos aquosos de *Tuberaria lignosa* e *Sanguisorba minor magnolii* contra a infecção pelo HIV. SCHMITT *et al.* (2001), observaram atividade antiviral de um extrato metanólico de *Hypericum connatum* contra vírus da imunodeficiência felina (FIV). CRAIG *et al.* (2001), encontraram atividade antiviral em uma fração polissacarídica, obtida de *Cedrela tubiflora*, contra HSV-2 e o vírus da estomatite vesicular (VSV).

MA *et al.* (2002), testaram 44 ervas da medicina popular chinesa contra o vírus respiratório sincicial (RSV), das quais 22 apresentaram atividade antiviral. CHENG *et al.* (2002), encontraram atividade antiviral, contra HSV-2, testando um tanino isolado de *Terminalia arjuna*. DEVEHAT *et al.* (2002), testaram oito plantas medicinais da Indonésia

contra herpes simplex vírus tipo 1 (HSV-1) e poliovírus (PV), destas, seis apresentaram atividade antiviral contra HSV-1 e sete contra o PV. TALYSHINSKY *et al.* (2002), observaram a presença de atividade antiviral contra o vírus da leucemia de murinos e vírus do sarcoma de murinos em um polissacarídeo extraído de algas vermelhas. CORONA *et al.* (2002), encontraram atividade antiviral em um extrato aquoso de *Spirulina maxima*, contra HSV-1, HSV-2, vírus da pseudo-raiva, citomegalovirus humano e adenovirus.

HEGDE *et al.* (2003), descreveram dois novos compostos oligofenólicos isolados de *Stylogne cauliflora*, que possuem atividade inibitória para a protease NS3 do HCV.

OOI *et al.* (2004), mostraram que um extrato etanólico de *Youngia japonica*, do qual posteriormente foram isoladas duas frações com a mesma característica, apresentou atividade antiviral contra o RSV. RUFFA *et al.* (2004), testaram 15 plantas medicinais utilizadas na Argentina para atividade antiviral. Destas, três foram ativas contra o vírus da diarreia viral bovina tipo 1, duas contra HSV-1 e HSV-2 e 10 apresentaram atividade contra o vírus do influenza A.

UNCINI MANGANELLI *et al.* (2005), mostraram a atividade antiviral dos extratos aquosos de *Sambucus nigra*, *Urtica dioica* e *Parietaria diffusa*, contra o FIV. SOKMEN *et al.* (2005), encontraram atividade antiviral em extratos e compostos isolados de *Geranium sanguineum* contra o vírus influenza A. LI *et al.* (2005b), testaram compostos isolados de *Schefflera heptaphylla* contra o RSV, os quais apresentaram atividade antiviral.

ZHU *et al.* (2006), testaram e comprovaram a ação antiviral de um polissacarídeo sulfatado, isolado de *Sargassum patens*, uma alga marrom, contra o HSV-1. GEBRE-MARIAM *et al.* (2006), testaram a atividade antiviral de plantas medicinais da Etiópia, usadas no tratamento de doenças de pele. Entre estas, havia espécies que apresentaram atividade contra HSV-1, vírus coxsackie B3 e contra o vírus do influenza A. FELIPE *et al.* (2006), testaram a atividade antiviral de extratos de *Guazuma ulmifolia* e *Stryphnodendron adstringens*, contra a replicação de poliovírus do tipo 1 (PV-1) e BHV-1, encontrando uma alta inibição contra ambos os vírus.

Extrato aquoso de *Fructus Ligustri Lucidi* inibiu RNA polimerase dependente de RNA de HCV (KONG *et al.*, 2007). ZUO *et al.* (2007), encontraram atividade inibitória sobre uma protease de HCV, testando um extrato etanólico de *Rhodiola kirilowii*. SADDI, *et al.* (2007), avaliaram a atividade antiviral de um óleo extraído das folhas de *Artemisia arborescens*, e constataram que este foi ativo contra HSV-1 e HSV-2. YANG *et al.*

(2007), testaram e encontraram atividade antiviral para compostos isolados de *Phyllanthus urinaria*, contra os vírus HSV-1 e HSV-2.

MELO *et al.* (2008), testaram e comprovaram a ação antiviral de um composto isolado de *Heteropteris aphrodisiaca*, contra PV-1 e o BHV-1.

Apesar da maioria dos trabalhos sobre produtos naturais, publicados recentemente, estarem relacionados com plantas, uma outra fonte natural de compostos químicos bioativos que também merece reconhecimento, são os fungos (GU *et al.*, 2007). Diversos pesquisadores estão voltando sua atenção para as propriedades farmacológicas apresentadas pelos fungos, principalmente àqueles que apresentam um corpo de frutificação, estrutura macroscópica que determinados fungos desenvolvem para a reprodução, popularmente conhecidos como cogumelos.

O uso dos cogumelos na medicina popular de vários países asiáticos tem uma longa tradição, demonstrando que esses fungos possuem propriedades bioativas que merecem ser investigadas, como atividade antibiótica, antifúngica, antiviral, antitumoral, imunomoduladora, antialérgica, antiinflamatória entre outras (KANENO *et al.*, 2004; LINDEQUIST *et al.*, 2005).

Dentre estas várias propriedades, uma que está ganhando espaço é a de atividade antiviral. Diversos trabalhos, sobre esta atividade de fungos macroscópicos, foram publicados nos últimos anos.

COLLINS & NG (1997), testaram um polissacaropeptídeo, isolado do cogumelo comestível *Coriolos versicolor*, com relação a sua capacidade em inibir a replicação do HIV-1, encontrando uma alta atividade antiviral.

ICHIMURA *et al.* (1998), demonstraram que um extrato aquoso do cogumelo comestível *Fuscoporia obliqua* inibiu uma protease do HIV-1. Testes posteriores demonstraram que esta inibição está relacionada a um derivado de lignina presente no extrato aquoso.

PIRAINO & BRANDT (1999), testaram a capacidade da proteína RC-183, purificada do cogumelo comestível *Rozites caperata*, em inibir a replicação de diversos vírus. A proteína foi efetiva contra HSV-1 e 2, VZV, vírus da influenza A e RSV.

EO *et al.* (2000), testaram as propriedades antivirais de duas polissacaroproteínas, isoladas do extrato aquoso do cogumelo *Ganoderma lucidum*, contra os vírus HSV-1 e 2. Os autores demonstraram que os isolados possuem atividade antiviral, e sugeriram que eles agem impedindo os processos de adsorção e penetração.

Frações do extrato aquoso do micélio de *Agaricus brasiliensis* inibiram de forma significativa o efeito citopático (ECP) causado pelo vírus da encefalite eqüina do oeste (WEE) em células Vero (SORI MACHI *et al.*, 2001).

LEE *et al.* (2002), extraíram polissacarídeos de cinco linhagens do cogumelo *Antrodia camphorata*. Todos os polissacarídeos extraídos do micélio das cinco linhagens demonstraram atividade inibitória para o HBV.

MOTHANA *et al.* (2003) testaram três triterpenos isolados do basidiomiceto *Ganoderma pfeifferi*, quanto a sua atividade inibitória para os vírus HSV-1 e influenza do tipo A. Todos os compostos apresentaram atividade contra o vírus da influenza A, mas apenas um apresentou efeito inibitório para o HSV-1. AWADH ALI *et al.* (2003), demonstraram a presença de atividade antiviral em extratos etanólicos do corpo de frutificação e do micélio de *Inonotus hispidus*, contra o vírus da influenza tipos A e B. Destes extratos foram isolados dois compostos fenólicos, onde possivelmente se concentraria a atividade antiviral constatada, pelo fato de que ambos apresentaram atividade contra os vírus da influenza A e B.

LIU *et al.* (2004), mostraram que uma proteoglicana, inicialmente chamada de GLPG, purificada do micélio do basidiomiceto *Ganoderma lucidum*, inibiu o ECP causado pelos vírus HSV-1 e 2 em células Vero. ZHANG *et al.* (2004), testaram frações extraídas do fungo *Pleurotus tuber-regium*, com relação a sua atividade antiviral. Dentre as frações testadas, aquelas que foram sulfatadas apresentaram atividade antiviral contra os vírus HSV-1 e 2.

AKIHISA *et al.* (2005), avaliaram compostos isolados do cogumelo *Hypsizigus marmoreus*, com relação a sua capacidade em inibir a ativação do vírus Epstein-Barr. Dois esteróis testados apresentaram altos níveis de inibição.

GU *et al.* (2007), demonstraram a atividade antiviral de uma proteína purificada de um extrato do basidiomiceto *Grifola frondosa*, contra o HSV-1. Os experimentos realizados demonstraram que a atividade inibitória está relacionada a inibição da penetração do vírus na célula.

Todos os exemplos de atividade antiviral relatados, podem ser consequência direta da inibição de enzimas virais, da síntese dos ácidos nucléicos virais ou da adsorção, além da indução da fagocitose do vírus pelas células de mamíferos. Efeitos diretos estão relacionados, principalmente, a ação de moléculas pequenas. Moléculas complexas, como por exemplo, polissacarídeos, têm sua atividade relacionada a imunoestimulação, e por tanto sua ação antiviral é considerada indireta (BRANDT & PIRAINO, 2000). Entretanto, trabalhos

recentes demonstraram que polissacarídeos podem apresentar atividade direta na inibição da replicação viral (FACCIN *et al.*, 2007).

É amplamente conhecida a propriedade antitumoral de diversas espécies de fungos, principalmente cogumelos (LINDEQUIST *et al.*, 2005; GU & BELURY, 2005; ELLERTSEN *et al.*, 2006; MIYAJI *et al.*, 2006). Muitos compostos que possuem atividade antitumoral são importantes fontes de busca para novos antivirais, pois estes apresentam atividade relacionada ao material genético e, portanto, poderiam agir diretamente inibindo a replicação do genoma viral. Isto, porque podem ter sua ação regulatória ou inibitória na síntese de ácidos nucléicos, diretamente bloqueando a ação de polimerases ou, indiretamente, agindo 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 macroscópicos formadores de cogumelos são pertencentes, principalmente, a divisão Basidiomycota. Portanto, avaliando todos os exemplos e propriedades citados para os cogumelos, em especial para os basidiomicetos, este grupo de fungos é uma importante fonte para pesquisas que visam avaliar compostos com atividade antiviral. Muitas espécies deste grupo tornaram-se objeto de grande interesse, devido a seu valor nutricional e propriedades farmacológicas (GUTERREZ *et al.*, 2004). Entre estas, duas vêm, atualmente, chamando a atenção de muitos pesquisadores: *Agaricus brasiliensis* e *Lentinula edodes*.

4 LENTINULA EDODES

O basidiomiceto *Lentinula edodes* (BERKELEY) PEGLER [= *Lentinus edodes* (BERKELEY) SINGER], 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).

A importância terapêutica do *L. edodes* é conhecida desde a dinastia Ming (1368-1644) através do relato de que o shiitake aumentava o vigor e energia e era efetivo no tratamento de hemorragias cerebrais (ITO, 1978).

Sua composição varia entre 85 a 95% de água (PRZYBYLOWICZ & DONOGHUE, 1990), e quando desidratado, aproximadamente 59,2% da massa é de carboidratos, 22,7% de proteínas, 10% de fibras, 3,2% 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). 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 demonstrou 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.

No entanto, existem poucos trabalhos avaliando a atividade antiviral de compostos isolados e extratos totais do shiitake. 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 do *L. edodes* contra o VSV; SASAKI *et al.* (2001) demonstraram a atividade antiviral dos extratos do micélio e do substrato da cultura de *L. edodes* para o VSV em células Vero. Estes fatos, aliado aos diversos relatos das atividades terapêuticas do *L. edodes*, disponibilizam um amplo campo de pesquisas para avaliar a atividade antiviral deste cogumelo contra inúmeros vírus de importância clínica.

5 AGARICUS BRASILIENSIS

O cogumelo *Agaricus brasiliensis* (= *Agaricus Blazei* Murill ss. Heinemann), 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).

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).

A partir de resíduos solúveis em água, do corpo de frutificação do *A. brasiliensis*, foi isolado um complexo proteína-polissacarídeo [proteína-(1→6)-β-D-glucana] constituído de 50,2% de carboidrato e 43,3% de proteína (KAWAGISHI *et al.*, 1989 e 1990). Esse complexo apresentou atividade inibitória para o sarcoma 180 implantado em camundongos, devido às propriedades imunomodulatórias (ITOH *et al.*, 1994). Este é um dos inúmeros exemplos de trabalhos que nas últimas décadas avaliaram as propriedades anticarcinogênicas do *A. brasiliensis*. No entanto, assim como ocorre para *L. edodes*, as propriedades antivirais dos extratos totais e de compostos isolados deste basidiomiceto ainda foram pouco exploradas.

Entre estes trabalhos, podemos destacar SORIMACHI *et al.* (2001), que verificaram uma inibição completa do efeito citopático induzido pelo WEE em células vero, decorrente do tratamento com frações obtidas do extrato aquoso do micélio de *A. brasiliensis*. Apesar da não ocorrência de inibição significativa para o HSV e PV, com as mesmas frações testadas para o WEE, tanto do micélio quanto do corpo de frutificação, é possível que moléculas isoladas deste fungo, desempenhem uma maior inibição contra estes e outros vírus de importância clínica. Isto foi demonstrado por FACCIN *et al.* (2007), que avaliaram a atividade de extratos totais e de um polissacarídeo isolado do corpo de frutificação de *A. brasiliensis*, contra a replicação do PV-1, resultando em uma elevada redução do número de plaques em relação ao controle.

6 B-GLUCANAS

Entre todas as categorias de compostos que apresentam alguma atividade biológica, os polissacarídeos e os triterpenos são as duas principais (LIU *et al.*, 2004). Inúmeras moléculas com potencial atividade antiviral, são classificadas nessas duas categorias. As β -glucanas, que são uma classe de polissacarídeos constituída geralmente de uma cadeia central formada por resíduos de (β 1 \rightarrow 3)-D-glucose de onde partem ramificações variáveis de (β 1 \rightarrow 6)-D-glucose (CROSS *et al.*, 2001), estão entre as mais estudadas.

Segundo CAMELINI *et al.* (2005), as qualidades nutracêuticas do corpo de frutificação dos basidiomicetos, são dependentes de sua composição química, particularmente em relação a constituição de β -glucanas. Essa mesma classe de moléculas derivada de outros fungos apresentou atividade antitumoral, antimicrobiana e antiviral (REYNOLDS *et al.*, 1980; OHNO *et al.*, 1987; JONG & BIRMINGHAM, 1993; ZHANG *et al.*, 2005; MARUYAMA *et al.*, 2006).

Os extratos de *A. brasiliensis* possuem uma alta quantidade de β -glucanas, o que poderia explicar as atividades antitumorais encontradas (MIZUNO *et al.*, 1990; ITOH *et al.*, 1994; OSHIMAN *et al.*, 2002; DONG *et al.*, 2002). As moléculas de β -glucana deste basidiomiceto apresentam uma cadeia central de (β 1 \rightarrow 6)-D-glucose com ramificações de (β 1 \rightarrow 3)-D-glucose (OHNO *et al.*, 2001; DONG *et al.*, 2002; CAMELINI *et al.*, 2005). KAWAGISHI *et al.* (1989), evidenciaram atividade antitumoral para uma (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana sem ramificações. Segundo DONG *et al.* (2002), as ramificações de (β 1 \rightarrow 3)-D-glucose, desempenham um papel importante aumentando as propriedades imunomodulatórias de polissacarídeos. Além disso, uma importante atividade antitumoral foi evidenciada para uma (1 \rightarrow 6)(1 \rightarrow 3)- β -D-glucana solúvel em água (MIZUNO *et al.*, 1990).

Todas as propriedades terapêuticas, bem como aquelas relacionadas a β -glucanas, fazem do *A. brasiliensis*, um importante alvo para pesquisas com antivirais. Pois apresentam características que podem apresentar ação na replicação viral.

7 POLIOVÍRUS

Os poliovírus 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. São classificados no gênero *Enterovirus*, pertencentes à família *Picornaviridae*, a qual possui muitos outros patógenos para humanos e outros animais (RACANIELLO, 2006). 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).

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, 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). 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).

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, em 2007 foram registrados mais de 800 casos de poliomielite em países da África e Ásia (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.

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 a subfamília *Alphaherpesvirinae*, família *Herpesviridae* (SPILKI *et al.*, 2004; JONES *et al.*, 2005; FELIPE *et al.*, 2006). Esta subfamília possui como características, um curto ciclo reprodutivo, causar a destruição das células infectadas com eficiência e a capacidade em estabelecer latência primariamente, mas exclusivamente em gânglios sensoriais (ROIZMAN & PELLETT, 2001).

O BHV 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 (JAWETZ *et al.*, 2005).

Várias doenças importantes do gado são atribuídas à infecção por BHV-1, principalmente, uma doença respiratória denominada rinotraqueíte bovina infecciosa (IBR) (FELIPE *et al.*, 2006). As infecções por BHV-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 BHV-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).

9 OBJETIVOS

9.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antiviral dos extratos aquoso e etanólico de *Lentinula edodes* e da β -glucana isolada do *Agaricus brasiliensis* na replicação do poliovírus tipo 1 e do herpesvírus bovino tipo 1 em culturas de células HEp-2.

9.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade dos extratos aquoso e etanólico de *Lentinula edodes* e da β -glucana isolada do *Agaricus brasiliensis* em células HEp-2.
- Avaliar a atividade antiviral dos extratos aquoso e etanólico de *Lentinula edodes* e da β -glucana isolada do *Agaricus brasiliensis* na replicação do poliovírus tipo 1 e do herpesvírus bovino tipo 1 através de diferentes tratamentos utilizando ensaio de redução de plaque e reação de imunofluorescência indireta.

REFERÊNCIAS

- AKIHISA, T.; FRANZBLAU, S.G.; TOKUDA, H.; TAGATA, M.; UKIYA, M.; MATSUZAWA, T.; METORI, K.; KIMURA, Y.; SUZUKI, T. and 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.
- 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. and LINDESQUIST, U. Antiviral activity of *Inonotus hispidus*. *Fitoterapia*, 74: 483-485, 2003.
- 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. and 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. and 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.
- 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.
- 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.
- CAMELINI, C.M.; MARASCHIN, M.; MENDONÇA, M.M.; ZUCCO, C.; FERREIRA, A.G. and TAVARES, L.A. Structural characterization of β -glucans of *Agaricus brasiliensis* in different stages of fruiting body maturity and their use in nutraceutical products. *Biotechnology Letters*, 27: 1295-1299, 2005.

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

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

CHIHARA, G.; HAMURO, J.; MAEDA, Y.Y.; ARAI, Y. and 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.

COS, P.; VLIETINCK, A.J.; VANDEN-BERGHE, D. and 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.

CORONA, A.H.; NIEVES, I.; MECKES, M.; CHAMORRO, G. and BARRON, B.L. Antiviral activity of *Spirulina maxima* against herpes simplex virus type 2. *Antiviral Research*, 56: 279-285, 2002.

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.

CRAIG, M.I.; BENENCIA, F. and COULOMBIÉ, F.C. Antiviral activity of an acidic polysaccharides fraction extracted from *Cedrela tubiflora* leaves. *Fitoterapia*, 72: 113-119, 2001.

CROSS, G.G.; JENNINGS, H.J.; WHITFIELD, D.M.; PENNEY, C.L.; ZACHARIE, B. and GAGNON, L. Immunostimulant oxidized β -glucan conjugates. *International Immunopharmacology*, 1: 539-550, 2001.

DE CLERCQ, E. Antiviral drugs: current state of the art. *Journal of Clinical Virology* 22: 73-89, 2001.

DE CLERCQ, E. Strategies in the design of antiviral drugs. *Nature Reviews - Drug Discovery*, 1: 13-25, 2002.

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. and BOUSTIE, J. Antiviral and cytotoxic activities of some Indonesian plants. *Fitoterapia*, 73: 400-405, 2002.

DONG, Q.; YAO, J.; YANG, X. and FANG, J. Structural characterization of water-soluble β -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. *Carbohydrate Research*, 337: 1417-1421, 2002.

ELLERTSEN, L.K.; HETLAND, G.; JOHNSON, E. and 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. and 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.

ESPOSITO, J.J. and FENNER, F. Poxviruses. Chapter: 85. *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*. 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. 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.

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. and NOZAWA, C. Antiviral Effect of *Guazuma ulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on Poliovirus and Bovine Herpesvirus. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29: 1092-1095, 2006.

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

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

GRINDE, B.; HETLAND, G. and 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.

GU, C.Q.; LI, J.W.; CHAO, F.; JIN, M.; WANG, X.W. and 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.

GUTERREZ, Z.R.; MANTOVANI, M.S.; EIRA, A.F.; RIBEIRO, L.R. and 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. and 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.

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. and 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.

HURK, S.D.L.; LOEHR, B.I. and BABIUK, L.A.. Immunization of livestock with DNA vaccines: current studies and future prospects. *Vaccine*, 19: 2474-2479, 2001.

ICHIMURA, T.; WATANABE, O. and 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.

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. and 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. and 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. and 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.

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. and 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. and 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.

KONG, L.; LI, S.; HAN, X.; XIANG, Z.; FANG, X.; LI, B.; WANG, W.; ZHONG, H.; GAO, J. and 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. and HOF, H. Lentinan has a stimulatory effect on innate and adaptive immunity against murine *Listeria monocytogenes* infection. International Immunopharmacology, 6: 686-696, 2006.

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. and LU, M.K. *Antrodia camphorata* polysaccharides exhibit anti-hepatitis B virus effects. FEMS Microbiology Letters, 209: 63-67, 2002.

LI, S.; CHEN, C.; ZHANG, H.; GUO, H.; WANG, H.; WANG, L.; ZHANG, X.; HUA, S.; YU, J.; XIAO, P.; LI, R. and 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. and 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. and 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. and 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.

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. and 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. 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.

MELNICK, J.L. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses, p. 655-712. vol. 1. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIM, R.A.; LAMB, M.A.; MARTIN, B.; ROIZMAN, B. and STRAUS, S.S. (eds.). Fields Virology. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996.

MELO, F.L.; BENATI, F.J.; JUNIOR, W.A.R.; MELLO, J.C.P.; NOZAWA, C. and LINHARES R.E.C. The in vitro antiviral activity of an aliphatic nitrocompound from *Heteropteris aphrodisiaca*. Microbiological Research, article in press, 2008.

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. and 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.

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

MUELLER, S.; WIMMER, E. and 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.

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

OHNO, N.; KURACHI, K. and YADOMAE, T. Antitumor activity of a highly branched (1–3)-beta-d-glucan, SSG, obtained from *Sclerotinia sclerotiorum* IFO 9395. *Journal of Pharmacobio-dynamics*, 10: 478-486, 1987.

OSHIMAN, K.; FUJIMIYA, Y.; EBINA, T.; SUZUKI, I. and NOJI, M. Orally administered beta-1,6-d-polyglucose extracted from *Agaricus blazei* results in tumor regression in tumor-bearing mice. *Planta Medica*, 68: 610, 2002.

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.

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.

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

RADJEF, N.; GORDIEN, E.; IVANIUSHINA, V.; GAULT, E.; ANAÏS, P.; DRUGAN, T.; TRINCHET, J.C.; ROULOT, D.; TAMBY, M.; MILINKOVITCH, M.C. and DÉNY, P. Molecular phylogenetic analyses indicate a wide and ancient radiation of African hepatitis delta virus, suggesting a deltavirus genus of at least seven major clades. *Journal of Virology*, 78: 2537-2544, 2004.

REYNOLDS, J.A.; KASTELLO, M.D.; HARRINGTON, D.G.; CRABBS, C.L.; PETERS, C.J.; JEMSKI, J.V.; SCOTT, G.H. and DI LUZIO, N.R. Glucan-induced enhancement of host resistance to selected infectious diseases. *Infection and Immunity*, 30: 51-57, 1980.

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

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*. 4. ed. United States of America: Lippincott Williams & Wilkins Desktop Division, 2001.

RUFFA, M.J.; WAGNER, M.L.; SURIANO, M.; VICENTE, C.; NADINIC, J.; PAMPURO, S.; SALOMÓN, H.; CAMPOS, R.H. and 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. and DE LOGU, A. Antiherpesvirus activity of *Artemisia arborescens* essential oil and inhibition of lateral diffusion in Vero cells. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 6: 10, 2007.

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. and 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. and 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. and 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. and 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. and 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. and 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. and CHIHARA, G. Antitumor and immunological activity of Lentinan in comparison with LPS. *International Journal Immunopharmacology*, 16: 463-468, 1994.

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

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

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

UNCINI MANGANELLI, R.E.; ZACCARO, L. and 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.

WASSER, S.P.; DIDUKH, M.Y.; AMAZONAS, M.A.L.A.; NEVO, E.; STAMETS, P. and 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.

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

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

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global polio eradication initiative: Wild Poliovirus Weekly Update. Geneva, 2007.

YANG, C.M.; CHENG, H.Y.; LIN, T.C.; CHIANG, L.C. and 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, O.; NAKASHIMA, H.; YOSHIDA, T.; KANEKO, Y.; YAMAMOTO, I.; MATSUZAKI, K.; URYU, T. and 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. and 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. and ZENG, F. Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan. *Carbohydrate Research*, 340: 1515-1521, 2005.

ZHU, W.; CHIU, L.C.M.; OOI, V.E.C.; CHAN, P.K.S. and 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.

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

ARTIGO**Effect of extracts from *Lentinula edodes* and β -glucana from *Agaricus brasiliensis* on poliovirus and bovine herpesvirus replication.**

Vinicius Pires Rincão^a, Kristie Aimi Yamamoto^a, Ana Paula Dores Ramos^a, Sandra Aguiar Soares^b, Luzia Doretto Paccola Meirelles^c, Carlos Nozawa^a, Rosa Elisa Carvalho Linhares^{a,*}.

^a Departamento de Microbiologia, Universidade estadual de londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

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

^c Departamento de Biologia Geral, Universidade estadual de londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

* Corresponding author. Tel.: +55 43 3371 4617; fax: +55 43 33714788.

E-mail address: relin@uel.br (R. E. C. Linhares).

Abstract

Compounds isolated from the basidiomycete *Lentinula edodes*, known as shiitake, show immunomodulatory, antimetastatic and antimicrobial properties. *Agaricus brasiliensis*, a basidiomycete known as “cogumelo do sol,” is widely utilized in popular medicine for the treatment of various diseases, and compounds isolated from their mycelium and fruiting body show therapeutic properties. The aim of this study was to determine the antiviral activity of aqueous (AqE) and ethanol (EtOHE) extracts obtained from *L. edodes* and a β -glucan isolated from *A. brasiliensis* in the replication of poliovirus type 1 (PV-1) and bovine herpes virus type 1 (BHV-1). The addition of AqE, EtOHE and β -glucan was done before, during and after infection, and antiviral activity was monitored by the plaque assay. Also evaluated were the virucidal activity of and inhibition of viral adsorption by AqE and EtOHE. The results showed that AqE and β -glucan, when added to the cells during infection (time 0 h), inhibited the replication of PV-1 by 82.46% and 68.53% and of BHV-1 by 89.88 and 83.18%, respectively. However, EtOHE was more effective at time 1 h of infection against both PV-1 (76.92%) and BHV-1 (90.63%). AqE and EtOHE showed low virucidal activity, and inhibition of viral adsorption was not significant for the two viruses. Antiviral activity of the AqE and EtOHE was demonstrated by the direct immunofluorescence reaction, at time 0 h of infection. Based on the data obtained, we suggest that AqE, EtOHE and β -glucan act on the initial processes of replication of PV-1 and BHV-1.

Key words: Lentinula edodes; Agaricus brasiliensis; Antiviral activity; Poliovirus; Bovine herpesvirus

1. Introduction

Currently, a little more than 40 drugs (De Clercq & Field, 2006) are released officially for clinical use in the treatment of viral infections. Studies regarding these drugs concentrated on synthetic products up to the end of the 1980s (Jones, 1998), when natural compounds attracted attention because of their efficacy in the inhibition of viruses important in human and animal health. Natural products are recognized by the pharmaceutical industry because of their wide structural diversity as well variety of pharmacological activities (Strohl, 2000). Among the many sources of natural compounds, the fungi have stirred interest among investigators, especially the basidiomycetes.

The basidiomycete *Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler, known as shiitake, is the second most popular in the world (Sugui *et al.*, 2003), and in the last decades, various compounds with therapeutic properties have been isolated from this fungus. Some of these have been widely studied, for example, the polysaccharide lentinan which has demonstrated high immunopotentiating and antimetastatic activities (Suzuki *et al.*, 1994; Kupfahl *et al.*, 2006), antitumor activity (Zhang *et al.*, 2005; Maruyama *et al.*, 2006), and antibacterial, antifungal and antidiabetic activities (Jong & Birmingham, 1993; Markova *et al.*, 2003), among others. However, few works have examined the antiviral activity of this basidiomycete (Yoshida *et al.*, 1988; Kaneko & Chiahara, 1992; Sasaki *et al.*, 2001).

Agaricus brasiliensis (= *Agaricus blazei* Murill ss. Heinem), is the basidiomycete known popularly as “cogumelo do sol,” “cogumelo de Deus” and “himematsutake” (Wasser *et al.*, 2002). This fungus is widely utilized in popular medicine in the treatment of various diseases (Ellertsen *et al.*, 2006; Grinde *et al.*, 2006), and compounds isolated from its mycelium and fruiting body have demonstrated therapeutic properties (Itoh *et al.*, 1994).

However, as with *L. edodes*, only a few works have described antiviral properties for this basidiomycete (Sorimachi *et al.*, 2001; Faccin *et al.*, 2007).

The extracts of *A. brasiliensis* contain a high amount of β -glucans, a class of polysaccharides that consist of a central chain of (β 1 \rightarrow 6)-D-glucose with branches made of (β 1 \rightarrow 3)-D-glucose and have antitumor (Kawagishi *et al.*, 1989) and immunomodulatory (Dong *et al.*, 2002) properties.

Polioviruses are non-enveloped viruses with a capsid of icosahedral symmetry, and a genome consisting of single stranded RNA with positive polarity. They are classified in the genus *Enterovirus*, belonging to the family *Picornaviridae*, which includes many other pathogens of great importance to humans and other animals (Racaniello, 2006). Despite the efforts to eradicate the virus, in 2007 there were more than 800 reported cases of poliomyelitis in countries in Africa and Asia (WHO – Wild Poliovirus Weekly Update, 2007). Besides the clinical importance of poliovirus, vaccine strains are manipulated safely, thereby being utilized as a model for various studies related to picornavirus and other RNA viruses.

Bovine herpesvirus (BHV), an important pathogen belonging to the subfamily *Alphaherpesvirinae*, family *Herpesviridae* (Spilki *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2005) has a genome consisting of double stranded DNA which is linear and enveloped by a capsid of icosahedral symmetry, which is enclosed in a lipid bilayer. In order to reduce losses caused by BHV, 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 replication or after vaccination (Hurk *et al.*, 2001).

The basidiomycetes show various biological activities and little toxicity making them a promising source of bioactive molecules. Therefore, the aim of this study was to determine the antiviral activity of aqueous and ethanol extracts of *L. edodes* and β -glucan isolated from *A. brasiliensis* in the replication of poliovirus and bovine herpesvirus.

2. Material and Methods

2.1 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 (SFB, Gibco-BRL, EUA) 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, Brasil).

The poliovirus type 1 (PV-1), vaccinal strain, was obtained from the ATCC (ATCC, VR-58) and the bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) was supplied by Prof. A. Alfieri - DMVP-UEL, Brazil. Both strains were propagated in HEp-2 cells, and virus titers determined by plaque assay, and kept at -80°C.

2.2 Extracts of *Lentinula edodes* and *Agaricus brasiliensis* β -glucana

The aqueous extract (AqE) of *L. 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 x g for 5 min. The supernatant was pre-filtered in filter paper and submitted to ultra-filtration in a 0.2 µm pore size membrane, and stored at -20°C.

Ethanol extract (EtOHE) was prepared by dissolving ground basideocarp in 46% ethanol, at room temperature (\pm 25°C). The extract was centrifuged at 3000 x g for 5 min, and the supernatant was lyophilized. The lyophilized was resuspended in DMEM, submitted to sterilization by ultra-filtration in a 0.2 µm pore size membrane, and stored at -20°C.

The β -glucan was isolated from the polysaccharide-peptide assemblage extracted from *A brasiliensis* (Gonzaga *et al.*, 2005), according to Angeli *et al.* (2006), and supplied by Laboratório de Polímeros, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, UFC, Brazil. The compound was dissolved in DMEM, submitted to sterilization by ultra-filtration in 0.2 μ m pore size membrane, and stored at -20°C.

2.3 Cytotoxic assay

The cytotoxicity of the test substances was performed by dimethyl-thiazolyl-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) kit (Sigma Chem. Co., USA). HEp-2 cells were grown in 96-well microplates and treated with varying concentrations of AqE (0.1-60%), EtOHE (0.1-40 mg/ml) and β -glucan (0.25-2 mg/ml). After 72 h of 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 (CC_{50}) was determined as the concentration capable of reducing the optical density by 50% in comparison with the control. The CC_{50} was calculated by linear regression analysis of the dose-response curves generated.

The selectivity index (SI) was calculated as the ratio of CC_{50} and IC_{50} .

2.4 Plaque reduction assay

The antiviral activity by plaque reduction assay was accomplished according to Melo *et al.* (2008). 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, without SFB, and supplemented with antibiotic. For experiments with PV-1, nutrient agarose was added of 25 mM MgCl₂. The plates were incubated inverted at 37°C in 5% de CO₂, for 48 h. The cells were fixed with 20% formalin, stained with 0.5% crystal violet, after removal of nutrient agarose layer. Concomitantly, mock-infected cells were used as control. The percentage of viral inhibition (% V.I.), determined by plaque reduction, was calculated by the formula: % V.I. = [1 – (number of plaques in test/number of plaques in virus control)] x 100.

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

Strains of PV-1 and BHV-1 were submitted to the treatment with 1000 U/ml and 10000 U/ml human alfa-2 interferon (Meizler Com. Intern. SA, Brazil), respectively.

2.5 Antiviral activity

2.5.1 Virucidal activity

To evaluate the direct effect of the substances on viral replication, 10^6 PFU/ml of PV and 10^5 PFU/ml of BHV 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 β -glucan (0.1, 0.2 and 0.25 mg/ml) for 1 h at 37°C and inoculated in cell cultures. The viral inhibition was determined by plaque reduction assay.

2.5.2 Time-of-addition assay

The evaluation of the time-of-addition of the substances in viral replication was done as described in Yang *et al.* (2005). 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 β -glucan (100, 200 and 250 μ g/ml) before (-1 h and -2 h), during (0 h) and after (1 h and 2 h) infection. The viral inhibition was monitored by plaque reduction assay.

2.5.3 Viral adsorption assay

The inhibition of the viral adsorption was carried out according to Zhu *et al.* (2004). 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 β -glucan (100, 200 and 250 μ g/ml), and incubated at 4° C in 5% de CO₂ for one h. The cells were washed twice with PBS, and plaque reduction assay was performed after 48 h.

2.6 Immunofluorescence assay

HEp-2 cells grown on coverslips in 24-well plates were infected, at a multiplicity of infection (MOI) of 2 and treated with extracts and β -glucan, according to the protocols, during viral infection (time 0 h). The cultures were collected after 24 h, washed with PBS, and fixed with cold acetone (-20°C). The cultures were either treated with bovine anti-BHV antibodies or rabbit anti-PV antibodies and anti-bovine or anti-rabbit IgG conjugated with FITC (Sigma Chem. Co., USA). The coverslips were mounted with 50% PBS-glycerin and observed under UV light. Mock-infected cells were used as control. The cells were examined with a Leica (DM 4500 B – DFC 300 FX) UV light microscopic, and 100 cells/cover slip were scored. The experiments were carried out in triplicate. The IC_{50} was defined as the concentration capable of reducing fluorescent cells in 50% in relation to control cells. The linear regression analysis of the curves of viral inhibition for each treatment was calculated.

2.7 Statistics

The data were analysed by ANOVA followed by Student's t-test. Values were considered significant to $p \leq 0.05$. All experiments were performed in triplicate.

3. Results

The evaluation of cytotoxicity of the substances tested by the MTT assay in HEp-2 cells resulted in CC_{50} values for the AqE, EtOHE and β -glucan of 74 mg/ml, 29.93 mg/ml and 1.25 mg/ml, respectively (Table 1).

The results of antiviral activity for the AqE of *L. edodes* added at different times of infection by PV-1, and monitored by the plaque assay, are displayed in Figure 1a. When the aqueous extract was added one or two hours before infection (-1 h and -2 h), the highest concentration tested (25mg/ml) produced an inhibition of 5.83% and zero respectively. The addition of the extract at concentrations of 3.1mg/ml, 6.3 mg/ml, 12.5 mg/ml and 25 mg/ml, at the moment of infection (0 h), resulted in a viral inhibition of 1.83%, 17.54%, 41.10% and 82.46%, respectively. However, for the time of addition of one hour post-infection (1 h), with the same concentrations, the resultant percentages of inhibition were 9.20, 12.07, 24.52 and 60.15%, respectively. With the time of addition of two hours post-infection (2 h), the concentrations of 3.1mg/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 28.16 and 49.43%, respectively.

The results of the tests for virucidal activity and of inhibition of adsorption showed that the aqueous extract inhibited the replication of PV-1 by 38.27% and 18.99%, respectively, with the highest concentration tested.

Figure 1b shows the results of the antiviral activity of AqE in the replication of BHV-1, monitored by the plaque assay. When the cells were treated with a concentration of 1.25mg/ml, the highest percentage of viral inhibition obtained was 19.12 and 4.17%, for times -1 h and -2 h of infection, respectively. At time 0 h, the addition of extract, at 3.1, 6.3, 12.5 and 25 mg/ml resulted in inhibition of 50.40, 43.25, 66.67 and 89.88%, respectively. However, the treatments at 1 h and 2 h post-infection, at these same concentrations, gave

inhibition levels of 20.37, 36.11, 45.83 and 62.96% for time 1 h and 11.65, 15.53, 51.46 and 75.73%, for time 2 h.

In tests for virucidal activity and inhibition of adsorption, there was a low inhibitory effect on these parameters for the replication of BHV-1 (32.07% and zero, respectively) with the highest concentration of AqE.

The results of the effect of EtOHE on the replication of PV-1 and BHV-1 are shown in Figures 2. 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, 45.65, 56.52 and 73.91%, respectively, at time 0 h of infection. When the extract was added at time 1 h, at the above concentrations, the percentages of inhibition for PV-1 were 21.37, 24.79, 53.85 and 76.92%, respectively. However, for the treatment at time -1 h, the extract had no effect. In the replication of BHV-1, at the same above concentrations, the extract showed for time 0 h an inhibition of zero, 10.15, 32.43 and 70.79%, respectively. In the treatment at 1 h, inhibition was 35.42, 46.88, 56.25 and 90.63%, respectively. The ethanol extract did not show any virucidal activity or inhibition of viral adsorption for PV-1 as well as BHV-1.

The evaluation of the antiviral activity of β -glucan in both PV-1 and BHV-1 was carried out at time 0 h of infection. The replication of PV-1 was inhibited at 30.77, 55.24, 43.36 and 68.53% when utilizing the concentrations of 0.1, 0.2 and 0.25 mg/ml, respectively, (Figure 3). For BHV-1, treatment with 0.1, 0.2 and 0.25 mg/ml of β -glucan resulted in percentages of inhibition of 37.84, 72.37 and 83.18%, respectively.

The results of the immunofluorescence reaction are shown in Table 2. The highest percentages of inhibition of poliovirus replication, obtained with the highest concentrations of EtOHE (3 mg/ml) and AqE (25mg/ml) were respectively 90.00 and 58.33%. For BHV-1, treatment was done only with the above concentrations of AqE and EtOHE, resulting in

inhibitions of 92.31 and 73.91%. The IC_{50} and the respective SI, for EtOHE, AqE and β -glucan, calculated for treatment at time 0 h de infection, are shown in Table 1.

Interferon alpha-2, utilized as the positive control, inhibited the replication of PV-1 and BHV-1 by 100% at a concentration of 1000 U/ml and 10,000 U/ml, respectively.

4. Discussion

In this work, the aqueous and ethanol extracts of the fruiting body of *Lentinula edodes* and β -glucan isolated from *Agaricus brasiliensis* were evaluated for antiviral activity. The results demonstrated that both extracts, as well as β -glucan, inhibited the replication of PV-1 and BHV-1. In relation to AqE, the inhibition of PV-1 and BHV-1 was dependent on the concentration, and the highest percentages of inhibition were obtained at time 0 h of infection. In treatments where the extract was added -1 h and -2 h of infection and in the test for inhibition of adsorption, there was no significant inhibitory effect in the replication of both viruses, which suggests that AqE does not impede specific binding of the virus to cell receptors. AqE also did not show virucidal activity, and therefore, did not have a direct effect on the virus particle. Sorimachi *et al.* (2001) demonstrated that fractions of the aqueous extract of *Agaricus brasiliensis* mycellium inhibited significantly the CPE of WEE virus in Vero cells.

EtOHE was effective in inhibiting the replication of both viruses. For PV-1 and BHV-1, the greatest percent reduction in the number of plaques was 76.92 and 90.63%, respectively, when the extract was added at 1 h post-infection. Based on the data, it is likely that EtOHE also acted on the initial processes of replication and, as the AqE, did not show virucidal activity or inhibition of viral adsorption. Awadh Ali *et al.* (2003), demonstrated the

presence of antiviral activity in ethanol extracts of the fruiting body and of the mycelium of *Inonotus hispidus*, against influenza virus types A and B.

β -glucan demonstrated antiviral activity that was dependent on concentration, for PV-1 as well as BHV-1, at time 0 h of infection. This substance was isolated from a polysaccharide fraction derived from the fruiting body of *Agaricus brasiliensis*, whose antiviral activity against PV-1 was previously described by Faccin *et al.* (2007). The authors demonstrated that the polysaccharide was more effective when added at time 0 h of infection in agreement therefore with the results obtained in our study. Oliveira (2007) determined the action of this same polysaccharide on the replication of BHV-1, and in the same manner as observed for PV-1 here, the greatest viral inhibition also occurred when the substance was added at the moment of infection. Zhang *et al.* (2004) evaluated the β -glucans extracted from the fungus *Pleurotus tuber-regium* and found antiviral activity against herpes simplex virus type 1 and type 2, where inhibition was observed at time 0 h of infection.

The indirect immunofluorescence reaction demonstrated a reduction in the number of fluorescent cells, directly proportional to concentration, for the two viruses tested and treated with EtOHE and AqE, in concordance with the plaque assay results.

In relation to the selectivity index (SI), the ethanol extract showed better results with both PV-1 and BHV-1.

In view of these results and based on the high levels of inhibition observed for the treatments at 0 h, 1 h and 2 h post-infection, for PV-1 as well as BHV-1, we suggest that AqE, EtOHE and β -glucan act on the initial processes of replication with both viruses. However, a more detailed study is needed to be able to determine with certainty in which phases of replication viral inhibition occurs.

Acknowledgements

This work was partially supported by CNPq, CAPES, UEL and Fundação Araucária and it is part of V.P. Rincão M.Sc. manuscript. We thank Dr. A. Leyva for English editing of the manuscript.

5. References

- Angeli, J.P.F, Ribeiro, L.R., Gonzaga, M.L.C., Soares, S. de A., Ricardo, M.P.S.N., Tsuboy, M.S., Stidl, R., Knasmueller, S., Linhares, R.E., Mantovani, M.S., 2006. Protective effects of β -glucan extracted from *Agaricus brasiliensis* against chemically induced DNA damage in human lymphocytes. *Cell Biology and Toxicology* 22, 285–291.
- Awadh Ali, N.A., Mothana, R.A.A., Lesnau, A., Pilgrim, H., Lindesquist, U., 2003. Antiviral activity of *Inonotus hispidus*. *Fitoterapia* 74, 483-485.
- De Clercq, E., Field, H.J., 2006. Antiviral prodrugs – the development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy. *British Journal of Pharmacology* 147, 1-11.
- Dong, Q., Yao, J., Yang, X., Fang, J., 2002. Structural characterization of water-soluble β -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. *Carbohydrate Research* 337, 1417-1421.
- Ellertsen, L.K., Hetland, G., Johnson, E., Grinde, B., 2006. 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.
- Faccin, L.C., Benati, F., Rincão, V.P., Mantovani, M.S., Soares, S.A., Gonzaga, M.L., Nozawa, C., Linhares R.E.C., 2007. 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.

Grinde, B., Hetland, G., Johnson, E., 2006. 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.

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

Hurk, S.D.L., Loehr, B.I., Babiuk, L.A., 2001. Immunization of livestock with DNA vaccines: current studies and future prospects. *Vaccine* 19, 2474-2479.

Itoh, H., Amano, H., Noda, H., 1994. 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.

Jones, C., Geiser, V., Henderson, G., Jiang, Y., Meyer, F., Perez, S., Zhang, Y., 2005. Functional analysis of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genes expressed during latency. *Veterinary Microbiology* 113, 199-210.

Jones, P.S., 1998. Strategies for antiviral drug discovery. *Antiviral Chemistry Chemotherapy* 9, 283-302.

Jong, S.C., Birmingham, M., 1993. Medicinal and therapeutic value of the shiitake mushroom. *Advances in Applied Microbiology* 39, 153-184.

Kaneko, Y., Chihara, G., 1992. 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.

Kawagishi, H., Inagaki, R., Kanao, T., Mizuno, T., Shimura, K., Ito, H., Hagiwara, T., Nakamura, T., 1989. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydrate Research* 186, 267-274.

Kupfahl, C., Geginat, G., Hof, H., 2006. Lentinan has a stimulatory effect on innate and adaptive immunity against murine *Listeria monocytogenes* infection. *International Immunopharmacology* 6, 686-696.

Markova, N., Kussovski, V., Drandarska, I., Nikolaeva, S., Georgieva, N., Radoucheva, T., 2003. Protective activity of Lentinan in experimental tuberculosis. *International Immunopharmacology* 3, 1557-1562.

Maruyama, S., Sukekawa, Y., Kaneko, Y., Fujimoto, S., 2006. Anti tumor activities of lentinan and micellapist in tumor-bearing mice. *Gan To Kagaku Ryoho* 33, 1726-1729.

Melo, F.L., Benati, F.J., Junior, W.A.R., Mello, J.C.P., Nozawa, C., Linhares R.E.C., 2008. The in vitro antiviral activity of an aliphatic nitrocompound from *Heteropteris aphrodisiaca*. *Microbiological Research*, article in press.

Oliveira, M.C.M., 2007. Atividade antiviral de frações e polissacarídeo isolado de *Agaricus brasiliensis* contra o herpes vírus bovino tipo 1. Dissertação: Mestrado em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

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

Sasaki, S.H., Linhares, R.E.C., Nozawa, C. M., Montalván, R., Paccola-Meirelles, L.D., 2001. Strains of *Lentinula edodes* suppress growth of phytopathogenic fungi and inhibit Alagoas serotype of vesicular stomatitis virus. *Brazilian Journal of Microbiology* 32, 52-55.

Sorimachi, K., Ikehara, Y., Maezato, G., Okubo, A., Yamazakki, S., Akimoto K., Niwa, A., 2001. Inhibition by *Agaricus blazei* Murrill fractions of cytopathic effect induced by Western Equine Encephalitis (WEE) Virus on VERO cells in vitro. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 65, 1645-1647.

Spilki, F.R., Esteves, P.A., Lima, M., Franco, A.C., Chiminazzo, C., Flores, E.F., Weiblen, R., Driener, D., Roehe, P.M., 2004. 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.

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

Sugui, M.M., De Lima, P.L.A., Delmanto, R.D., Da Eira, A.F., Salvadori, D.M.F., Ribeiro, L.R., 2003. Antimutagenic effect of *Lentinula edodes* (BERK.) Pegler mushroom and possible variation among lineages. *Food and Chemical Toxicology* 41, 555-560.

Suzuki, M., Takatsuki, F., Maeda, Y.Y., Hamuro, J., Chihara, G., 1994. Antitumor and immunological activity of Lentinan in comparison with LPS. *International Journal Immunopharmacology* 16, 463-468.

Wasser, S.P., Didukh, M.Y., Amazonas, M.A.L.A., Nevo, E., Stamets, P., Eira, A.F., 2002. Is a widely cultivated culinary-medicinal royal sun Agaricus (the Himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill? *International Journal of Medical Mushroom* 4, 267-290.

World Health Organization (WHO), 2007. Global polio eradication initiative: Wild Poliovirus Weekly Update. Geneva.

Yang, C.M., Cheng, H.Y., LIN, T.C., Chiang, L.C., LIN, C.C., 2005. Acetone, ethanol and methanol extracts of *Phyllanthus urinaria* inhibit HSV-2 infection in vitro. *Antiviral Research* 67, 24-30.

Yoshida, O., Nakashima, H., Yoshida, T., Kaneko, Y., Yamamoto, I., Matsuzaki, K., Uryu, T., Yamamoto, N., 1988. Sulfation of the immunomodulating polysaccharide Lentinan: A novel strategy for antivirals to human immunodeficiency virus (HIV). *Biochemical Pharmacology* 37, 2887-2981.

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

Zhang, L., Li, X., Xu, X., Zeng, F., 2005. Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan. *Carbohydrate Research* 340, 1515-1521.

Zhu, W., Chiu, L.C.M., Ooi, V.E.C., Chan, P.K.S., Ang Jr., P.O., 2004. Antiviral property and mode of action of a sulphated polysaccharide from *Sargassum patens* against herpes simplex virus type 2. *International Journal of Antimicrobial Agents* 24, 81-85.

Figure 1. Effect of *Lentinula edodes* aqueous extract on viral replication, monitored by plaque reduction assay in HEp-2 cells. a) Effect on poliovirus replication. b) Effect on bovine herpesvirus replication. The extract was utilized in the indicated concentrations before (-1 and -2), during (0) and after infection (1 and 2). The experiments were carry out in triplicate (n=3), and the percent of inhibition were represented with the respective standard deviation.

Figure 2. Effect of *Lentinula edodes* ethanolic extract on viral replication monitored by plaque reduction assay in HEp-2 cells. a) Effect on poliovirus replication. b) Effect on bovine herpesvirus replication. The extract was utilized in the indicated concentrations and was added during () at 1 h after infection (). The experiments were accomplished in triplicate (n=3), and the percentage of the inhibition were represented with the respectives standard deviation.

Figure 3. Effect of β -glucan from the *Agaricus brasiliensis* on poliovirus () and bovine herpesvirus () replication monitored by plaque reduction assay in HEp-2 cells. The β -glucan was utilized in the indicated concentrations and was added in the moment of the infection. The experiments were carry out in triplicate (n=3), and the percentage of the inhibition were represented with the respective standard deviation.

Table 1

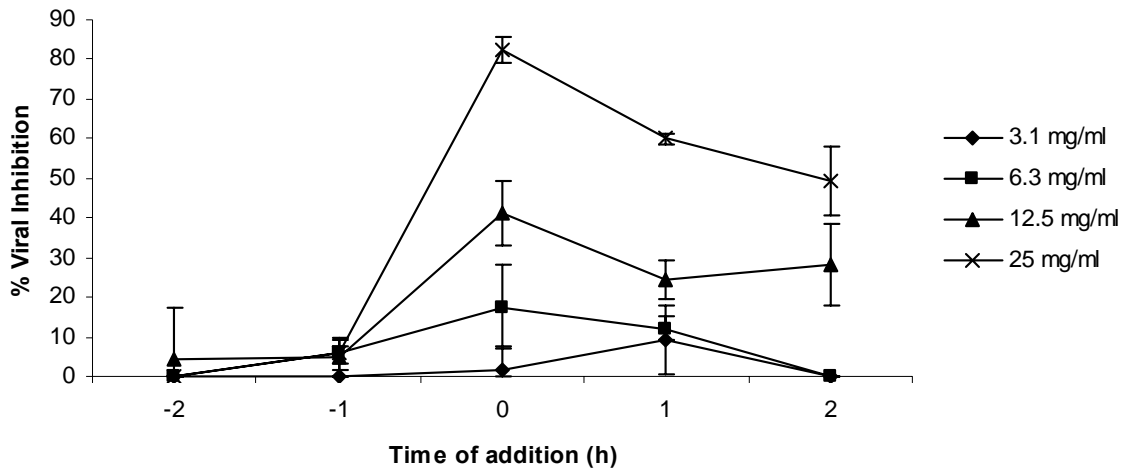
Cytotoxic concentration 50%, inhibitory concentration 50% and selectivity index of aqueous and ethanolic extract of *Lentinula edodes* and of the β -glucan of *Agaricus brasiliensis* for poliovirus and bovine herpesvirus, monitored by plaque assay, time 0 h.

Table 2

Antiviral activity of aqueous and ethanolic extract of the *Lentinula edodes* and on poliovirus and bovine herpesvirus replication by indirect immunofluorescence assay. The viral inhibition is expressed as reduction of fluorescent cells in comparison of the control.

Figure 1

a)



b)

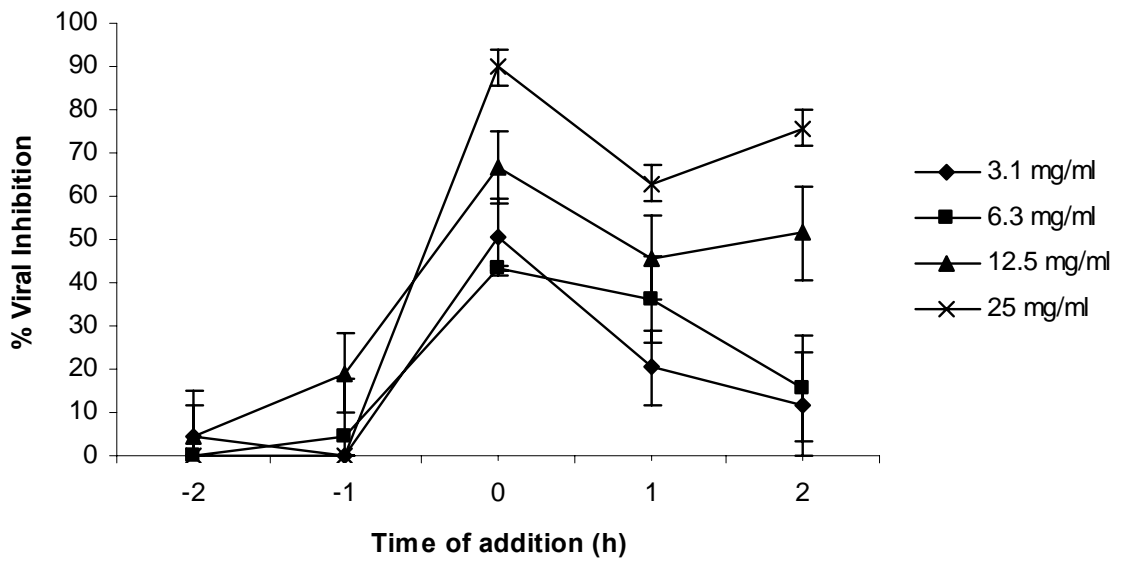
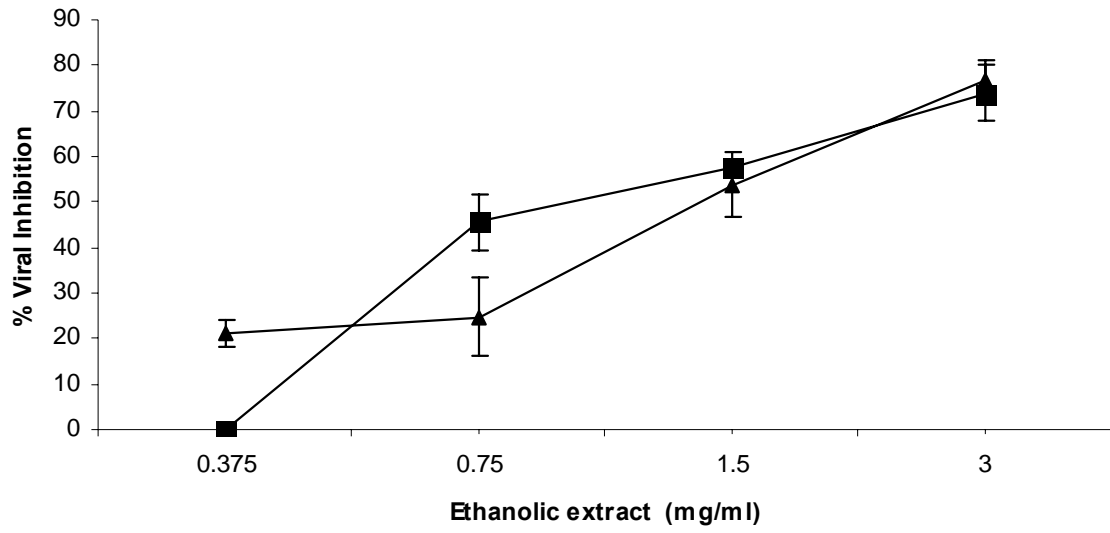


Figure 2

a)



b)

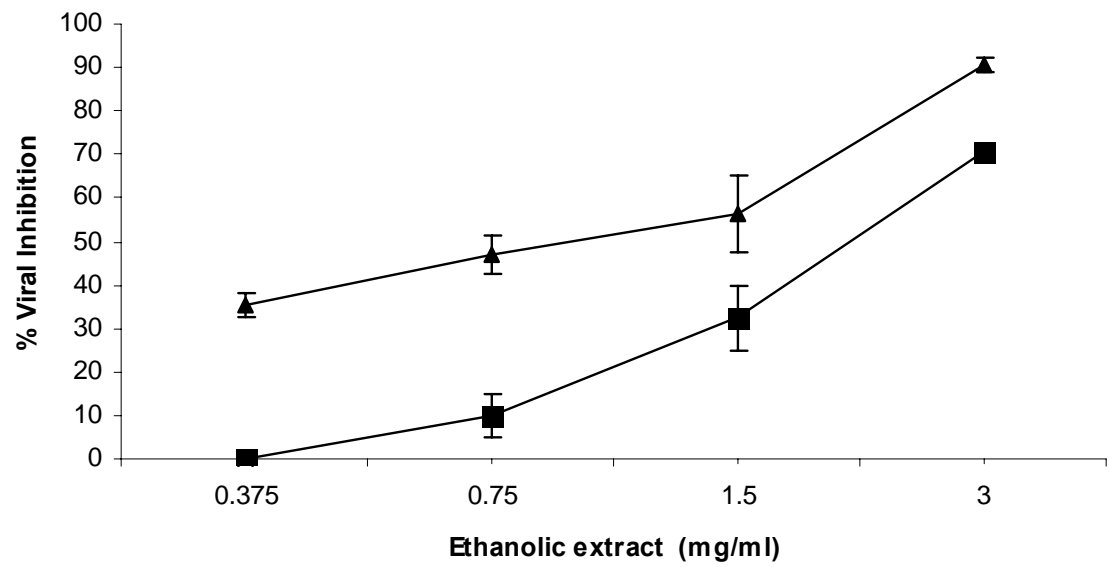


Figure 3

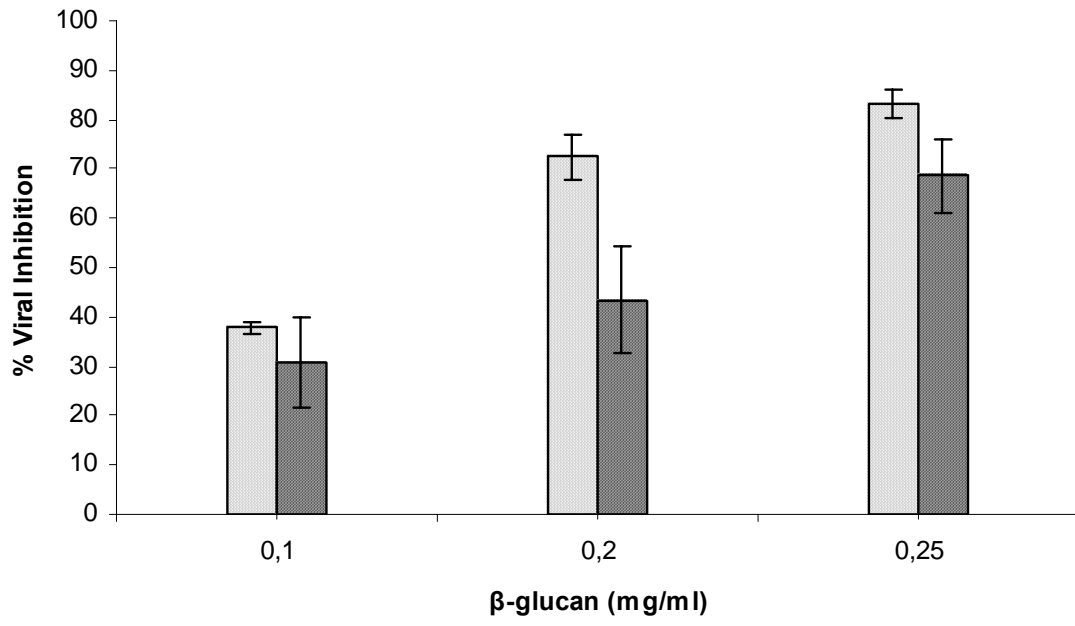


Table 1

Substances (mg/ml)	PV-1			BHV-1		
	CC ₅₀ ^a	IC ₅₀ ^b	SI ^c	CC ₅₀	IC ₅₀	SI
AqE	74	12.7	5.82	74	8.2	9.02
EtOHE	23.68	1.30	18.21	23.68	2.13	11.12
β-glucan	1.25	0.21	6.05	1.25	0.14	9.19

^a – Concentration that cause 50% of celular cytotoxic effect.

^b – Concentration that inhibit 50% of the viral replication.

^c – Selectivity index.

Table 2

Substances	Concentrations (mg/ml)	Viral Inhibition (%)	
		PV-1	BHV-1
AqE	3.1	6.25	s
	6.3	25.00	5.13
	12.5	45.83	89.74
	25	58.33	92.31
EtOHE	0.375	32.00	8.70
	0.75	32.00	17.39
	1.5	46.00	26.09
	3	90.00	73.91

s - no inhibition.