



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LÍGIA CARLA FACCIN GALHARDI

**Atividade antiviral dos extratos aquoso,
etanólico e do polissacarídeo isolado de
Agaricus brasiliensis para o poliovírus tipo1**

LÍGIA CARLA FACCIN GALHARDI

**Atividade antiviral dos extratos aquoso, etanólico e
do polissacarídeo isolado de *Agaricus brasiliensis*
para o poliovírus tipo1**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de mestre em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina.

Orientadora Prof^ª. Dra. Rosa Elisa Carvalho Linhares.

Londrina
2006

LÍGIA CARLA FACCIN GALHARDI

**Atividade antiviral dos extratos aquoso, etanólico e do
polissacarídeo isolado de *Agaricus brasiliensis* para o poliovírus
tipo1**

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Tânia U. Nakamura

Prof. Dr. Mario Sergio Mantovani

Prof^ª. Dra. Rosa Elisa C. Linhares
Orientadora

Londrina, 20 de fevereiro de 2006

Ao meu esposo Fábio com muito amor.

AGRADECIMENTOS

- A Deus por estar sempre do meu lado, sem Você Senhor, eu nada seria.
- Ao Fábio pela compreensão, paciência, força, companheirismo e amor.
- À minha família, pelos ensinamentos de amor ao próximo, respeito e garra.
- Em especial, à minha orientadora, Professora Rosa Elisa Carvalho Linhares, pelo incentivo, confiança, orientação, “paciência” e principalmente pela amizade e compreensão em todos os momentos.
- Ao Professor Carlos Nozawa pela participação, colaboração e amizade.
- Aos Professores de microbiologia da Universidade Estadual de Maringá, Celso e Tânia Nakamura, Benedito P. Dias Filho e Lourdes B. Garcia que abriram as portas para esta realização e serão lembrados sempre, a todos vocês meus sinceros agradecimentos.
- Aos meus amigos de mestrado, Fabrício, Jesiane, Narjara, Sergio, Tatiane e Ariane pelas risadas, amizade e companheirismo durante este período.
- Aos meus colegas de laboratório, Flávio, Rafaela, Janaína, Alessandra, Mariana, Bárbara, Vinícius e Daniel pelo apoio e pelos bons momentos que passamos juntos.
- As minhas amigas de “dura vida” de república, Jesiane e Daliana, que sempre lembrarei com carinho.
- Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia pelo trabalho para a formação de profissionais qualificados.
- Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, em especial a Valdelice, pela disposição no suporte técnico.

- Ao Professor Dr. Mário Sérgio Mantovani pelo extrato gentilmente cedido para a realização dos testes.
- A técnica Maria Yoshie Yoshikawa pela boa vontade em nos fornecer a água de preparo do meio para o cultivo das células.
- A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro parcial, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenadoria de Pesquisa e Pós-graduação da UEL.
- Por fim, agradeço a todas as pessoas que conviveram comigo durante estes dois anos os quais, direta ou indiretamente, fizeram parte da minha vida e serão lembradas com carinho.

*“A sabedoria brilha, não fenece;
Deixa-se ver facilmente pelos que a amam,
Deixa-se encontrar pelos que a procuram.
Antecipa-se aos que a desejam,
Sendo a primeira a se dar a conhecer.
Quem parte cedo a sua procura não se afadigará,
Pois a encontrará sentada a sua porta.
Apaixonar-se por ela é a perfeição do discernimento,
E quem velar por sua causa estará em breve sem inquietações.
O princípio da sabedoria é o simples desejo de ser por ela educado;
Querer ser por ela educado é amá-la,
Amá-la é guardar suas leis,
Observar suas leis é estar seguro da incorruptibilidade,
E a incorruptibilidade aproxima de Deus.
Assim, o desejo da Sabedoria eleva até o reino do céu.”*
Sabedoria 6, 12-20

Obrigada Senhor, por mais esta conquista. Peço que me mantenha firme na fé para que eu não canse de buscar sempre a Vossa sabedoria.

*‘Ninguém ignora tudo
Ninguém sabe tudo
Todos nós sabemos alguma coisa
Todos nós ignoramos alguma coisa
Por isso aprendemos sempre.’*

‘Feliz é aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.’

RESUMO

Agaricus brasiliensis (= *Agaricus blazei* ss. Heinem), também conhecido como Cogumelo do Sol, nativo do Sudeste do Brasil, é amplamente consumido, principalmente na forma de chá, devido suas propriedades nutricionais e farmacológicas. Neste trabalho nós avaliamos a atividade antiviral dos extratos aquoso (EA) e etanólico (EE) bem como do polissacarídeo isolado (PLS) do corpo de frutificação, de *A. brasiliensis* contra poliovírus tipo1 em células HEP-2. A atividade antiviral foi monitorada pelo ensaio de redução de plaque e os compostos foram adicionados, nas várias concentrações, antes (-2 e -1 h), durante (0 h) e após (1 e 2 h) a infecção viral. Os resultados mostraram que quando EA, PLS e EE foram adicionados às células durante a infecção (tempo 0 h) ocorreu uma redução, dependente de concentração, no número plaques de até 50,1 (EA); 67,3 (PLS) e 88 % (EE) com índices de seletividade (IS) de 5,4; 9,9 e 12,3, respectivamente. Os compostos foram poucos efetivos na redução da adsorção viral e não apresentaram efeito virucida, sugerindo uma ação no estágio inicial da replicação do poliovírus.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	9
2 ANTIVIRAIS	11
3 PRODUTOS NATURAIS	13
3.1 BASIDIOMICETOS	15
4 AGARICUS BRASILIENSIS	19
5 POLIOVÍRUS	21
6 OBJETIVOS	24
6.1 OBJETIVOS GERAIS	24
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
REFERÊNCIAS	25
ARTIGO: ANTIVIRAL ACTIVITY OF AQUEOUS AND ETHANOL EXTRACTS AND OF AN ISOLATED POLYSACCHARIDE FROM AGARICUS BRASILIENSIS AGAINST POLIOVIRUS TYPE 1.	29
ANEXO	46

1 INTRODUÇÃO

As doenças virais acompanham o homem desde a formação das primeiras populações. A varíola, por exemplo, matou milhares de pessoas pelo mundo, durante séculos, até ser considerada erradicada (Jerome, 2005). O vírus do sarampo foi responsável por epidemias que dizimaram rapidamente comunidades não imunes. O vírus da poliomielite foi responsável por muitos casos de paralisia, em 1988 havia 350.000 crianças paralíticas pelo vírus da poliomielite em todo o mundo (WHO, 2003).

Ainda hoje as doenças virais são responsáveis por inúmeras mortes e afetam a qualidade de vida, ocasionando mudanças no comportamento das pessoas. À medida que a população mundial aumentou e os meios de transportes evoluíram, o impacto causado pelas doenças virais também aumentou, pois o número de pessoas infectadas com algum vírus cresce a cada ano no mundo todo. A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e as pandemias com o vírus influenza podem demonstrar a consequência das doenças virais na população. Atualmente, cerca de 40 milhões de pessoas estão infectadas com o vírus HIV, porém esta doença representa apenas uma parte do problema, pois cerca de 25 a 35% da população sexualmente ativa do ocidente, estão infectados com o vírus herpes genital (HSV-2) e mais de 30% dos Estados Unidos apresentam verrugas genitais causadas pelo papilomavírus. Aproximadamente, 2% da população mundial está infectada com o vírus da hepatite C e 350 milhões de pessoas são portadoras do vírus da hepatite B, ocasionando milhares de mortes por cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (Jones, 1998; Jerome, 2005).

Um passo para prevenção e controle das doenças virais aconteceu através do desenvolvimento das vacinas. A varíola e a poliomielite são dois exemplos de doenças virais onde o uso da vacinação foi bem sucedido. Em 1980, após décadas de trabalhos e conscientização, a varíola, foi erradicada. A prevenção e o controle da poliomielite tem sido um dos maiores desafios para saúde pública e espera-se que em breve a doença esteja erradicada no mundo. No Brasil a última notificação de poliomielite foi em 1989 (WHO, 2003). Apesar dos benefícios das vacinas nem todas as doenças virais podem ser controladas por elas, como, por exemplo, a hepatite C e a imunodeficiência humana cujos vírus responsáveis sofrem rápidas variações antigênicas e o vírus do herpes simples que tem um potente mecanismo de escape, incluindo o estabelecimento de longo período de latência (Jerome, 2005).

As doenças virais permaneceram sem tratamento durante muitos anos. A falta de conhecimento sobre os ciclos de replicação dos vírus tornava difícil a busca por qualquer terapia para essas doenças, mesmo assim vários métodos foram empregados, na época, para tentar combatê-las. A descoberta dos agentes antibacterianos abriu o caminho para o desenvolvimento de terapias direcionadas aos agentes infecciosos, entre eles, os antivirais, porém, o desenvolvimento da quimioterapia antibacteriana progrediu rapidamente. Existe, atualmente, no mercado um enorme arsenal de quimioterápicos para o tratamento das infecções bacterianas, o que não acontece com os antivirais e isso se deve, em parte, pelo fato de que os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, dependendo dos processos bioquímicos da célula para realizarem seu ciclo de replicação (Jerome, 2005).

2 ANTIVIRAIS

O estudo dos antivirais teve início na década de 1950 (Jones, 1998). Devido ao pouco conhecimento sobre a biologia molecular dos vírus e à toxicidade dos primeiros quimioterápicos utilizados no controle das infecções virais, pensou-se que seria impossível obter um agente antiviral, que não interferisse com o metabolismo celular. As primeiras drogas eram capazes de atuar na síntese do DNA viral, mas também interferiam na síntese do DNA da célula. Assim o uso de novos quimioterápicos antivirais esbarrava na dificuldade em se obter substâncias com toxicidade seletiva (Wigg, 2002).

Por volta de 1960, um grupo de cientistas declarou que seria possível desenvolver compostos seguros e seletivos para os vírus através do desenvolvimento dos análogos de nucleotídeos. Os análogos 5'-iodo-2'-desoxiuridina (IDU) e o trifluorotimidina (TFT) foram introduzidos no mercado para o tratamento de ceratite herpética, porém seu uso era apenas tópico devido a sua toxicidade quando utilizado via sistêmica (Kaufman e Heidelberger, 1964). Um outro análogo de nucleotídeo desenvolvido e considerado como anti-herpético de primeira geração foi a Vidarabina (anteriormente chamada Ara-A), bem tolerada para uso sistêmico e durante muito tempo usada para tratamento de encefalite herpética, herpes neonatal e varicela zoster (Whitley et al., 1980 e Whitley et al., 1992). As pesquisas por novos compostos continuaram e no final da década de 70, todo este esforço resultou na descoberta do primeiro antiviral com excelente índice de seletividade, o Aciclovir, marcando o início da terapia dos antivirais e incentivando a busca de novas drogas (Jones, 1998). O Aciclovir ainda hoje é o fármaco de escolha para infecções herpéticas e tão grande é sua importância que além do uso clínico,

muitos cientistas usam esse composto como referência em pesquisas, em 2003, mais de 9.000 artigos científicos foram publicados relacionando o Aciclovir e seu uso (Jerome, 2005). Durante muitos anos, a pesquisa pelos análogos de nucleotídeos predominou na terapia com antivirais.

Em 1981, com a descoberta da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e pouco mais tarde do vírus da imunodeficiência humana (HIV) fez-se necessário um melhor entendimento no ciclo de vida dos vírus e principalmente no processo de replicação viral para se avaliar novas armas de terapia antiviral. As pesquisas adquiriram um novo perfil e foram enormemente beneficiadas com o avanço da biologia molecular, permitindo que certos vírus não cultiváveis pudessem ser possíveis alvos de terapias (Jones, 1998).

Atualmente, cerca de 40 compostos encontram-se aprovados para a utilização e outros estão sendo avaliados. A maioria destes compostos liberados são para o tratamento de pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite B e C, herpesvírus, varicela zoster, citomegalovírus e vírus influenza (De Clerq, 2004).

Existe uma variedade de fármacos utilizados como antivirais, porém, são focados para um número pequeno de vírus; novos vírus continuam emergindo; muitos vírus estabelecidos já estão satisfatoriamente controlados, porém tem aumentado o aparecimento de cepas virais resistentes. Uma linha de pesquisa que vem se destacando intensamente é o uso de produtos naturais para o desenvolvimento de antivirais. Extratos ou substâncias encontradas em plantas, fungos, bactérias, fauna e flora marinha apresentam uma enorme variedade de constituintes químicos o que torna essa área muito atrativa aos pesquisadores.

3 PRODUTOS NATURAIS

O uso dos produtos naturais como fonte de tratamento para os diversos males é utilizado desde o início dos tempos. De acordo com Halberstein, (2005) evidências arqueológicas indicam que as plantas, com fins medicinais representam a mais velha forma de medicação desde os tempos pré-históricos. No Papiro de Ebers, escrito por volta de 1550 a.C. e descoberto em meados do século passado em Luxor, no Egito, são mencionadas cerca de 700 drogas diferentes, incluindo, principalmente, extratos de plantas, metais (chumbo e cobre) e veneno de animais. Até o século XIX, os recursos terapêuticos eram constituídos predominantemente por plantas e extratos vegetais, o que pode ser ilustrado pelas Farmacopéias da época. Na Farmacopéia Geral para o Reino e Domínios de Portugal, de 1794, havia 30 produtos de origem mineral, 11 produtos de origem animal e cerca de 400 espécies vegetais, ou seja, as plantas medicinais e seus extrativos constituíam a maioria dos medicamentos, que naquela época pouco se diferenciavam dos remédios utilizados na medicina popular (Schenkel et al., 2001).

Atualmente várias pesquisas vêm sendo realizadas para verificar a ação medicinal dos produtos naturais. Estes produtos são fontes importantes de substâncias biologicamente ativas que constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos, entre eles os antivirais.

Kujumgiev et al. (1999) investigaram amostras de própolis de diferentes origens geográficas quanto às suas atividades antibacteriana (contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*), antifúngica (contra *Candida albicans*) e antiviral (contra o vírus da influenza aviária). Todas as amostras foram ativas contra fungos e bactérias gram-positivas testadas e a maioria apresentou atividade antiviral.

Semple et al. (2001) verificaram que o ácido crisofânico extraído das sementes de uma planta medicinal da Austrália, *Dianella longifolia* R. Br. (família Liliaceae) inibiu a replicação do poliovírus em células de rim de macaco verde (Vero), célula de rim de macaco verde Búfalo (BGM) e célula de pulmão embrionário humano (HEL).

Lipipun et al. (2003) avaliaram 20 extratos de plantas medicinais para atividade anti-herpesvírus tipo-1. Onze dos extratos mostraram-se eficientes em reduzir a formação de plaques em 50% utilizando-se uma concentração de 100µg/ml. Alguns extratos foram também efetivos reduzindo o desenvolvimento das lesões de pele.

Zhu et al. (2004) pesquisando a atividade antiviral do polissacarídeo sulfatado SP2, isolado da alga *Sargassum patens*, observaram que o composto inibia a replicação do vírus HSV-2 em células Vero pela inibição da adsorção ou inativação direta do vírus.

Li et al. (2005) demonstraram que o ácido cafeoilquínico obtido de uma planta de uso popular do sudeste da China, *Schefflera heptaphylla* apresentou atividade contra o vírus respiratório sincicial (RSV).

Yang et al. (2005) verificaram que os extratos obtidos da planta *Phyllanthus urinaria* com os solventes etanol, metanol e acetona, inibiram a infecção do HSV-2 e foram efetivos apenas quando adicionados concomitantemente com a infecção.

3.1 BASIDIOMICETOS

Os Basidiomicetos, popularmente conhecidos como cogumelos, têm sido muito estudados devido as suas propriedades nutricionais e por serem extremamente adaptados para habitar substratos sólidos encontrados no ambiente. Desde muitos anos, as propriedades nutricionais, tônicas e medicinais de alguns cogumelos são conhecidas pelos homens, sendo utilizados na dieta normal como chá e alimento nutricional.

Pesquisadores, na busca de novas alternativas terapêuticas, vêm estudando uma variedade de basidiomicetos que tem apresentado diversas atividades medicinais como anticarcinogênica, antiinflamatória, imunossupressora, antimicrobiana entre outras.

Certas escrituras antigas mencionam a importância medicinal de alguns cogumelos. Na Roma antiga, os romanos os consideravam como “alimento dos deuses”, já os chineses como “elixir da vida” (Mattila et al., 2000). Na medicina tradicional oriental, os cogumelos têm uma história estabelecida, *Ganoderma lucidum* (Reish), *Lentinus edodes* (Shiitake), *Inonotus obliquus* (Chaga) e muitos outros têm sido utilizados por milhares de anos na Coreia, China, Japão e Rússia (Lull et al., 2005).

Os cogumelos são constituídos de 90% de água e quando desidratados apresentam de 10-40% de proteínas, 3-28% de carboidratos, 2-8% de lipídios e 3-32% de fibras. Além destas substâncias são encontradas quantidades importantes de enzimas, sais, minerais e vitaminas, entre elas tiamina, riboflavina, ácido ascórbico e vitamina D₂ (Breene, 1990; Mattila et al., 2000).

Várias pesquisas demonstraram que extratos e metabólitos secundários obtidos dos basidiomicetos foram capazes de estimular ou suprimir componentes específicos do sistema imune. Algumas substâncias isoladas como polissacarídeos, triterpenos, lipídeos e fenóis apresentaram essas funções (Lull et al., 2005).

Compostos antibacterianos e antifúngicos também têm sido pesquisados a partir dos basidiomicetos, entre eles estão alguns esteróides isolados de *Ganoderma applanatum* e o ácido oxálico no *Lentinus edodes*. Geralmente os cogumelos apresentam compostos com atividade antibacteriana e antifúngica devido à necessidade de sobrevivência em seu meio natural de desenvolvimento (Lindequist et al., 2005).

Outra propriedade farmacológica dos basidiomicetos, que vem sendo amplamente estudada, é a atividade antiviral. O aparecimento de vírus resistentes aos medicamentos de escolha, principalmente em pacientes imunocomprometidos e a elevada toxicidade de algumas destas drogas, tem despertado o interesse de muitos pesquisadores na busca de novos agentes antivirais, de origem natural, como por exemplo, os obtidos a partir dessa classe de fungos.

Na Ásia, a população consome regularmente os cogumelos na alimentação para prevenção e tratamento da gripe, além de outros motivos. O cogumelo Shiitake é utilizado no tratamento da gripe há centenas de anos. Entretanto, a melhora no quadro sintomático ainda é apenas subjetiva uma vez que não há evidências científicas que o uso dos cogumelos, como parte da dieta normal, possa prevenir ou curar a gripe pelo vírus influenza e outras doenças virais (Mattila et al., 2000).

De acordo com Lindequist et al (2005) o efeito antiviral dos basidiomicetos pode ser encontrado tanto nos extratos como também em compostos isolados e os compostos isolados podem atuar ainda de forma direta ou indireta dependendo do peso molecular. Segundo os autores compostos com baixo peso molecular atuam diretamente pela inibição de enzimas virais, inibição da síntese de ácidos nucléicos virais, da adsorção e da penetração dos vírus na célula e compostos com alto peso molecular, como os polissacarídeos e outras moléculas complexas atuam de forma indireta pela ativação de células do sistema imune.

Os polissacarídeos, constituídos principalmente de cadeias de β -glucanas do tipo 1-3, 1-4 e 1-6, apresentam atividades biológicas como atividade antiviral, atividade mitogênica, ativação da via alternativa do complemento, estimulação da produção de anticorpos, e principalmente como antitumoral. Os polissacarídeos sulfatados têm sido amplamente testados contra os vírus HIV, HSV-1 e 2 e outros vírus envelopados e sua ação antiviral pode estar relacionada com as cargas aniônicas, ou seja, as cargas negativas dos polissacarídeos sulfatados podem interagir com as cargas positivas das glicoproteínas do envelope viral impedindo assim a ligação, a fusão ou ambos os estágios iniciais da infecção (Eo et al., 2000; Lee et al., 2002; Liu et al., 2004; Zhang et al., 2004).

Eo et al (1999) isolaram duas substâncias solúveis em água e oito substâncias solúveis em metanol a partir do basidiomiceto *Ganoderma lucidum* e testaram contra cinco vírus: HSV-1 e 2, influenza A e vírus da estomatite vesicular (VSV) indiana e de New Jersey, cinco destas substâncias inibiram significativamente os efeitos citopáticos de HSV e VSV. Em 2000, Eo et al, verificaram que uma proteína ácida ligada ao polissacarídeo isolado do mesmo basidiomiceto *Ganoderma lucidum* inibiu a ligação e a penetração dos vírus HSV-1 e 2 em células Vero. Em

2004, Liu et al, isolaram uma proteoglicana do micélio também de *Ganoderma lucidum* e observaram que esta substância inibiu o efeito citopático induzido por HSV-1 e 2 em células Vero.

Piraino e Brandt (1999) mostraram a inibição da replicação do herpesvírus simples tipos 1 e 2, varicela-zoster, influenza A e vírus respiratório sincicial pela proteína designada RC-183, purificada do cogumelo *Rozites caperata*.

Mothana et al (2003) mostraram que os compostos ganodermadiol e lucidadiol, isolados do basidiomiceto europeu *Ganoderma pfeifferi*, apresentaram atividade antiviral contra os vírus influenza tipo A e HSV-1.

Awadh ali et al (2003) verificaram a atividade antiviral dos extratos etanólicos do corpo de frutificação e culturas miceliais de *Inonotus hispidus* contra o vírus da influenza tipos A e B.

Wang e Ng (2004) isolaram a enzima lacase do corpo de frutificação de *Tricholoma giganteum* e mostraram que esta proteína de baixo peso molecular foi capaz de inibir a transcriptase reversa do HIV-1.

4 AGARICUS BRASILIENSIS

O cogumelo *Agaricus brasiliensis* (= *Agaricus blazei* ss. Heinem), também conhecido como Cogumelo do Sol, Cogumelo de Deus e “Himematsutake” é um basidiomiceto natural do interior de São Paulo, Brasil, mais precisamente da cidade de Piedade. O estudo sobre o *A. brasiliensis* iniciou-se com o Dr. Takatoshi Furumoto que observou que os habitantes da região de Piedade eram estatisticamente mais saudáveis do que a média populacional, com uma baixa ocorrência de doenças geriátricas, assim como, uma baixa incidência de câncer. Desde 1965 as amostras são exportadas para o Japão onde são cultivadas e estudadas (Menoli et al., 2001).

O cogumelo *Agaricus brasiliensis* é freqüentemente consumido na alimentação e na forma de chá, em diferentes partes do mundo devido a seus efeitos medicinais e afrodisíacos, sendo utilizado em casos de estresse físico e emocional, redução do colesterol, diabetes, distúrbios gástricos, osteoporose, como anticarcinogênico e antimutagênico, antioxidante, estimulador do sistema imunológico entre outros. Entretanto, o que os cientistas conhecem sobre suas propriedades biológicas ainda é insuficiente para explicar todos os efeitos citados na medicina popular (Menoli et al., 2001; Bellini et al., 2003).

De acordo com Kawagishi et al (1989) os polissacarídeos extraídos dos fungos basidiomicetos apresentam em sua maioria cadeias compostas de D-glicose com ligações do tipo β -1,3, entretanto os polissacarídeos obtidos do *A. brasiliensis* apresentam cadeia de D-glicose com ligações apenas do tipo β -1,6 insubstituíveis e estes resíduos de ligações estão associados com a atividade antitumoral. Várias pesquisas vêm sendo realizadas para identificar a estrutura e

natureza química desses polissacarídeos e esclarecer sua relação com a atividade antitumoral. (Gonzaga et al., 2005).

O corpo de frutificação do *A. brasiliensis* consiste de 85-87% de água. Quando desidratado, é rico em proteínas (40-45%), apresenta de 3-4% de carboidratos, 6-8% de fibras dietéticas, 3-4% de lipídios, vitaminas, especialmente B1, B2 e niacina. Ergosterol (0,1-0,2% peso seco) e ácido linoléico (70-80% de lipídios totais) são os lipídios predominantes. Compostos aromáticos não voláteis como açúcares solúveis, mais comumente a arabinose, glicose e triose, também são encontrados (Bellini et al., 2003). O potássio é o principal componente mineral do *Agaricus brasiliensis* (Oliveira et al., 2002). De acordo com Kawagishi et al (1989) e Kawagishi et al (1990) a partir dos resíduos solúveis em água, do corpo de frutificação do *A. brasiliensis* foi isolado um complexo proteína-polissacarídeo (proteína- β -1,6-D-glucana) constituído de 50,2% de carboidrato e 43,3% de proteína e a análise dos aminoácidos dessas proteínas apresentaram grandes quantidades de alanina (11,9%) e tirosina (2,4%).

A atividade antiviral do *A. brasiliensis* foi pouco estudada. Sorimachi et al (2001) verificaram que frações obtidas da precipitação do extrato aquoso do micélio de *A. brasiliensis* com 44 e 50% de etanol, inibiram completamente a ocorrência de efeito citopático (ECP) induzido pelo vírus da encefalomielite eqüina do oeste (WEE), outras frações com diferentes concentrações de etanol também apresentaram efeito de inibição, porém, menor. O extrato obtido do corpo de frutificação não mostrou efeito significativo na formação do ECP causado por este vírus. As frações obtidas com 44 e 50% de etanol do micélio de *A. brasiliensis* inibiram pouco, a ocorrência do ECP induzido pelo vírus herpes simples (HSV). Frações obtidas com concentrações de 29, 38, 44 e 50% de etanol do corpo de frutificação inibiram levemente a ocorrência do ECP induzido por poliovírus.

5 POLIOVÍRUS

Os poliovírus estão classificados no gênero *Enterovirus* (vírus cuja replicação ocorre principalmente no trato gastrointestinal) pertencentes à família *Picornaviridae*, onde se encontram diversos vírus importantes para o homem e para a agropecuária, como por exemplo, os rinovírus, vírus da hepatite A e o da febre aftosa (Gonçalves et al 2002). No gênero *Enterovirus*, os coxsackievírus e echovírus compreendem a maioria, seguidos do vírus da poliomielite 1 a 3 e enterovírus que infectam o homem e ainda enterovírus de espécies não humanas (Mueller et al., 2005).

A família *Picornaviridae* é constituída de vírus pequenos ‘Pico’ e o genoma de ácido ribonucléico ‘rna’. O vírion apresenta simetria icosaédrica (26 a 30 nm de diâmetro) não possui envelope, o genoma de RNA de fita simples é de polaridade positiva e sua biossíntese ocorre inteiramente no citoplasma (Mueller et al., 2005). A composição química dos poliovírus é de 30% de ácido nucléico e 70% de proteína. O capsídeo é formado por quatro proteínas estruturais, VP1 – VP4, sendo que VP1, VP2 e VP3 são superficiais, e responsáveis pela diversidade antigênica entre poliovírus. VP4 se localiza mais internamente no capsídeo associando-se ao ácido nucléico. A molécula de RNA é linear, possui cerca de 7500 bases e funciona diretamente como RNA mensageiro (RNAm). A região terminal 3’ possui resíduos de adenina (Poli-A) e na região terminal 5’a proteína VPg. O RNAm viral é traduzido primeiramente em uma poliproteína que mais tarde é clivada em proteínas menores originando as proteínas estruturais, proteína VPg, RNA polimerase e proteases (Madigan et al., 2004).

Os poliovírus tipos 1, 2 e 3 são os agentes etiológicos da Poliomielite, doença caracterizada por um quadro clássico de paralisia flácida de início súbito. Acomete em geral os membros inferiores, de forma assimétrica, tendo como principais características: flacidez muscular, com sensibilidade conservada e arreflexia no segmento atingido. A poliomielite pode apresentar-se ainda de maneira abortiva, que é a forma mais comum da doença, e não parálitica (meningite asséptica) (Pallansch e Ross, 2001).

Em 1988 os países membros da Organização Mundial da Saúde (OMS) resolveram propor medidas para erradicação da poliomielite, desde então progressos consideráveis têm sido obtidos na luta contra a doença. Em 1988, o número de países endêmicos chegava a 125 e o número de casos de poliomielite era de 350.000, em 2003 passou para sete o número de países endêmicos e cerca de 1900 notificações da doença. O Brasil não apresenta casos desta doença desde 1989 (WHO, 2003). Em 2005, a luta contra a poliomielite continuou em vários países da África e da Ásia (Mueller et al., 2005).

A vacinação é o principal método para levar à erradicação e ao controle da poliomielite no mundo. Os programas e as campanhas de vacinação para crianças menores de cinco anos têm sido cada vez mais reforçados, utilizando a vacina com vírus atenuado pela maior facilidade de administração, custo mais barato para a aplicação, capacidade de induzir anticorpos séricos e secretores e pela rapidez com que a vacina induz o aparecimento de imunidade duradoura (Gonçalves et al., 2002).

Apesar da tentativa de erradicação e do controle do vírus na maioria dos países, podemos encontrar alguns casos da doença, principalmente em países subdesenvolvidos como os do continente africano. O poliovírus é um dos modelos

virais mais estudados e bem conhecidos, a estabilidade do capsídeo, a fácil purificação do vírion, a obtenção de altos títulos virais e a segurança para trabalhar em nível laboratorial (cepas vacinais) fazem com que seja alvo de várias pesquisas. É utilizado, por exemplo, como modelo de vírus RNA na investigação de novas drogas antivirais (Mueller et al., 2005).

6 OBJETIVOS

6.1 GERAL

Avaliar a atividade antiviral dos extratos aquoso e etanólico e do polissacarídeo purificado de *Agaricus brasiliensis* (= *Agaricus blazei* ss. Heinem) contra poliovírus em cultura de células HEp-2.

6.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade do polissacarídeo purificado e dos extratos aquoso e etanólico de *Agaricus brasiliensis* em células HEp-2.
- Avaliar a atividade antiviral do polissacarídeo purificado e dos extratos aquoso e etanólico de *Agaricus brasiliensis* contra poliovírus tipo 1 utilizando diferentes tratamentos pelo ensaio de plaque e imunofluorescência indireta, com o intuito de identificar em que etapa da replicação as substâncias estariam atuando.

REFERÊNCIAS

- Awadh Ali, N.A., Mothana, R.A.A., Lesnau, A., Pilgrim, H., Lindesquist, U. **Antiviral activity of *Inonotus hispidus***. *Fitoterapia* 74, 483-485, 2003.
- Bellini, M.F., Giacomini, N.L., Eira, A.F., Ribeiro L.R., Mantovani, M.S. **Anticlastogenic effect of aqueous extracts of *Agaricus blazei* on CHO-k1 cells, studying different developmental phases of the mushroom**. *Toxicology in vitro* 17, 465-469, 2003.
- Breene, W.M. **Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms**. *Journal Food Protection*, 53, 883, 1990.
- De Clercq, E. **Antiviral drugs in current clinical use**. *Journal of Clinical Virology*, 30, 115-133, 2004.
- Eo, S. K., Kim, Y. S., Lee, C. K., Han, S. S. **Antiviral activities of various water and methanol soluble substances isolated from *Ganoderma lucidum***. *Journal of Ethnopharmacology* 68, 129-136, 1999.
- Eo, S. K., Kim, Y. S., Lee, C. K., Han, S. S. **Possible mode of antiviral activity of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* on herpes simplex viruses**. *Journal of Ethnopharmacology* 72, 475-481, 2000.
- Gonçalves, J.L.S., Hubinger, M.G.V., Wermelinger, M.C.M.W. **Viroses do Sistema Nervoso Central**. In: Santos, N.S.O.; Romanos, M.T.; Wigg, M.D. (eds), **Introdução a Virologia Humana**, 3ª.ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. pp. 164-175, 2002.
- Gonzaga, M.L.C., Ricardo, N.M.P.S., Heatley, F., Soares, S.A. **Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill**. *Carbohydrate Polymers* 60, 43-49, 2005.
- Halberstein, R.A. **Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns**. *Annals of Epidemiology* 15, 686-699, 2005.
- Jerome, K.R. **The road to new antiviral therapies**. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 5, 65-76, 2005.
- Jones, P. S. **Strategies for antiviral drug discovery**. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 9, 285-302, 1998.
- Kawagishi, H., Inagaki, R., Kanao, T., Mizuno, T., Shimura, K., Ito, H., Hagiwara, T., Nakamura, T. **Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies**. *Carbohydrate research* 186, 267-274, 1989.
- Kawagishi, H., Inagaki, R., Kano, T., Shimura, K., Ito, H., Hagiwara, T., Nakamura, T. **Formolysis of a potent antitumor (1-6) β -D-glucan-protein complex from**

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

Kaufman, H.E., Heidelberger, C. **Therapeutic antiviral action of 5-trifluoromethyl-2' deoxyuridine in herpes simplex keratitis.** Science 145, 585-586, 1964.

Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Yu., Bankova, V., Christov, R., Popov, S. **Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin.** Journal of Ethnopharmacology 64, 235-240, 1999.

Lee, I.H., Huang, R.L., Chen, C.T., Chen, H.C., Hsu, W.C., Lu, M.K. ***Antrodia camphorata* polysaccharides exhibit anti-hepatitis B virus effects.** FEMS Microbiology Letters 209, 63-67, 2002.

Li, Y., But, P.P.H., Ooi, V.E.C. **Antiviral activity and mode of action of caffeoylquinic acids from *Schefflera heptaphylla* (L.) Frodin.** Antiviral research 68, 1-9, 2005.

Lindequist, U., Niedermeyer, T.H.J, Lich, W.D.J. **The Pharmacological Potential of Mushrooms.** Oxford University press 2, 285-299, 2005..

Lipipun, V., Kurokawa, M., Suttisri, R., Taweechoatipatr, P., Pramyothin, P., Hattori, M., Shiraki, K. **Efficacy of Thai medicinal plant extracts against herpes simplex virus type 1 infection in vitro and in vivo.** Antiviral Research 60, 175-180, 2003.

Liu, J., Yang, F., Ye, X.J., Timan, K.A., Zheng, Y., Wang, Y.H. **Possible mode of action of antiherpetic activities of a proteoglycan isolated from the mycelia of *Ganoderma lucidum* in vitro.** Journal of Ethnopharmacology 95, 265-272, 2004.

Lull, C., Wichers, H.J, Savelkoul, H.F.J. **Antiinflammatory and Immunomodulating Properties of Fungal Metabolites.** Mediators of inflammation 2, 63-80, 2005.

Madigan, M.T., Martinko, J.M.; Parker, J. **Vírus de bactérias, plantas e animais.** Microbiologia de Brock, 10.ed. Prentice Hall, São Paulo. pp.508-509, 2004.

Mattila, P., Suonpa, K., Piironen, V. **Functional Properties of Edible Mushrooms.** Nutrition 16, 7-8, 2000.

Menoli, R.C.R.N., Mantovani, M.S., Ribeiro, L.R., Speit, G., Jordão B.Q. **Antimutagenic effect of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill extracts on V79 cells.** Mutation research 496, 5-13, 2001.

Mothana, R.A.A., Awadh Ali, N.A., Jansen, R., Wegner, U., Mentel, R., Lindequist, U. **Antiviral lanostanoid triterpenes from the fungus *Ganoderma pfeifferi*.** Fitotetapia 74, 177-180, 2003.

Mueller, S., Wimmer, E., Cello, J. **Poliovirus and poliomyelitis: A tale of guts, brains, and an accidental event.** Virus Research 111, 175-193, 2005.

- Oliveira, J.M., Jordão, B.Q., Ribeiro, L.R., Eira, A.F., Mantovani, M.S. **Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murril lineage 99/26) in mammalian cells in vitro**. Food and Chemical Toxicology 40, 1775-1780, 2002..
- Pallansch, M.A., Roos R.P. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. In: B. N. Fields, D. Knipe, P.M. Howley, R.A. Griffim, M.A. Lamb, B. Martin, B. Roizman, S.S. Straus, (eds), **Virology**. 4^a ed. Philadelphia, Lippincott-Raven, pp. 723-776, 2001.
- Piraino, F., Brandt, C.R. **Isolation and partial characterization of an antiviral, RC-183, from the edible mushroom *Rozites caperata***. Antiviral Research 43, 67-78, 1999.
- Schenkel, E.P., Gosmann G., Petrovick P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz, P.R Petrovick, (eds). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 3^a.ed. Universidade/UFRGS/UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, pp. 302-304, 2001
- Semple, S.J., Pyke, S.M., Reynolds, G.D., Flower, R.L.P. **In vitro antiviral activity of the anthraquinone chrysophanic acid against poliovirus**. Antiviral Research 49, 169-178, 2001.
- Sorimachi, K., Ikehara, Y., Maezato, G., Okubo, A., Yamazakki, S., Akimoto K., Niwa, A. **Inhibition by *Agaricus blazei* Murrill fractions of cytopathic Effect Induced by Western Equine Encephalitis (WEE) Virus on VERO Cells in vitro**. Bioscience Biotechnology, Biochemistry 65, 1645-1647, 2001.
- Wang, H.X., Ng, T.B. **Purification of a novel low-molecular-mass laccase with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the mushroom *Tricholoma giganteum***. Biochemical and Biophysical Communications 315, 450-454, 2004.
- Whitley, R.J., Nahmias, A.J., Soong, S.J., Galasso, G.G., Fleming, C.L., Alfred, C.A. **Vidarabine therapy of neonatal herpes simplex virus infection**. Pediatrics 66: 495, 1980.
- Whitley, R.J., Gnann Jr, J.W., Hinthorn, D., Liu, C., Pollard, R.B., Hayden, F., Mertz, G.J., Oxman, M., Soong, S.J. **Disseminated herpes zoster in the immunocompromised host: a comparative trial of acyclovir and vidarabine**. National Institute of Allergy and Infectious Diseases collaborative antiviral study. Journal infection diseases 165: 450, 1992.
- WHO. **The world health report 2003** – shaping the future. WHO Genebra, 2003.
- Wigg, M.D. Antivirais. In: Santos, N.S.O., Romanos, M.T., Wigg, M.D. (eds), **Introdução a Virologia Humana**, 3^a.ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. pp. 47-58, 2002.

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

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

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

ARTIGO**ANTIVIRAL ACTIVITY OF AQUEOUS AND ETHANOL EXTRACTS AND OF AN ISOLATED
POLYSACCHARIDE FROM *AGARICUS BRASILIENSIS* AGAINST POLIOVIRUS TYPE 1.**

Lígia Carla Faccin^a, Fabricio Benati^a, Vinicius Pires Rincão^a, Mario Sergio Mantovani^b, Sandra de Aguiar Soares^c, Maria Leônia da Costa Gonzaga^c, Carlos Nozawa^a, Rosa Elisa Carvalho Linhares^{a*}.

^a *Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil*

^b *Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil*

^c *Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil*

*Corresponding author:

Prof^a. Dra. Rosa Elisa Carvalho Linhares

E-mail address: relin@uel.br

Depto. de Microbiologia/CCB

Universidade Estadual de Londrina

Caixa Postal 6001

CEP 86051-990

Londrina-PR, Brazil

Phone: 55-4333714617

Fax: 55-4333714192

Abstract

Agaricus brasiliensis (= *Agaricus blazei* ss. Heinem), also known as the sun mushroom is native to Southeast Brazil, and is widely consumed, mainly in the form of tea, due its nutritional and pharmacological properties. In this study, we tested aqueous (AE) and ethanol (EE) extracts and an isolated polysaccharide (PLS) from the fruiting body of *A. brasiliensis*, for antiviral activity against poliovirus type 1 in HEp-2 cells. The assay for time of addition showed that when AE, PLS and EE were added to cells during infection (time 0 h), there was a concentration-dependent reduction in the number of plaques up to 50.1, 67.3 and 88%, respectively, with a S.I. of 5.4, 9.9 and 12.3, respectively. The test substances had little effect on reducing viral adsorption and did not show any virucidal effect, suggesting activity at the initial stage of replication of poliovirus.

Keywords: *Agaricus brasiliensis*; Antiviral activity; Poliovirus; Time of addition.

1. Introduction

The basidiomycete *Agaricus brasiliensis* (= *Agaricus blazei* ss. Heinem), also known as the sun mushroom, God's mushroom and "Himematsutake," is a species native to the southeast region of Brazil. It is frequently consumed as food and in the form of tea, in different parts of the world, where it is used in traditional medicine. It is used for medicinal purposes, for example, in cases of physical and emotional stress, high cholesterol, diabetes, gastric and digestive disturbance, and osteoporosis. This mushroom is also used as an anticarcinogenic and antimutagenic agent and

antioxidant, and to stimulate the immune system. However, there is little known about its biological properties (Menoli et al., 2001; Bellini et al., 2003).

The fruiting body of *A. brasiliensis* consists of 85-87% water. When desiccated, it is rich in protein (40-45%), and also contains 3-4% carbohydrates, 6-8% dietary fiber, 3-4% lipids, and vitamins, especially B1, B2 and niacin. Ergosterol (0.1-0.2% dry weight) and linoleic acid (70-80% of total lipids) are the predominant lipids. Aromatic, non-volatile compounds such as the common soluble sugars arabinose, glucose and trehalose are also found (Bellini et al., 2003). Potassium is the main mineral component in *Agaricus brasiliensis* (Oliveira et al., 2002). In accordance with Kawagishi et al. (1989) and Kawagishi et al. (1990), a (1 → 6)-β-D-glucan-protein complex was isolated from the water-soluble residue derived from the fruiting body of *A. brasiliensis*, which consisted of 50.2% carbohydrate and 43.3% protein, and an amino acid analysis of these proteins showed large amounts of alanine (11.9%) and tyrosine (2.4%).

Studies with extracts of *A. brasiliensis* showed that some of these exhibited antimutagenic, anticarcinogenic and immuno-stimulatory activities (Delmanto et al., 2001; Menoli et al., 2001; Nakajima et al., 2002).

The antiviral activity of extracts and compounds isolated from mushrooms has been described by various authors, but the antiviral activity of *A. brasiliensis* has been studied little. Sorimachi et al. (2001) demonstrated that the aqueous extract obtained from *A. Brasiliensis* was capable of blocking the cytopathic effect of western equine encephalitis virus (WEE). Ngai and Ng (2003) described the activity of a lentin isolated from shiitake mushroom, *Lentinus edodes*, against human immunodeficiency virus (HIV). A glycoprotein isolated from the fruiting body of the mushroom *Pleurotus ostreatus* also showed anti HIV activity (Wang and Ng, 2000). The phenolic

compounds hispolon and hispidin and the ethanol extract obtained from the fruiting body of the basidiomycete *Inonotus hispidus* inhibited the replication of influenza A and B viruses (Awadh Ali et al., 2003).

Poliovirus, belonging to the genus *Enterovirus* and family *Picornaviridae*, is the etiologic agent of poliomyelitis, a disease characterized by a classic manifestation of flaccid paralysis with sudden onset (Pallansch and Ross, 2001). Despite the control of the virus in the majority of countries, this disease still occurs in African countries. Poliovirus is one of the most studied and best understood viral models; it replicates efficiently in various types of cultured cells achieving high viral titers (Mueller et al., 2005). In the present study, we used poliovirus as a model of an RNA virus in the investigation of the antiviral activity of aqueous and ethanol extracts and of a polysaccharide derived from the basidiomycete *Agaricus brasiliensis* at various stages of the viral replication cycle.

2. Materials and methods

2.1 Preparation of aqueous and ethanol extracts and polysaccharide

The basideocarp of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murill ss. Heinem), strain 99/26, desiccated and pulverized, was kindly provided by the Faculty of Agricultural Sciences, UNESP/Botucatu – SP, Brazil. To obtain the aqueous extract, 20g of the basideocarp were resuspended in 200 ml of distilled water, at ambient temperature (approximately 25°C), under agitation for one hour. To obtain the ethanol extract, 10 g were dissolved in 100 ml of 46 % ethanol at ambient temperature, with mixing for

one hour. The extracts obtained were then pre-filtered with filter paper and then submitted to sterilization by ultra-filtration utilizing a 0.2- μ m membrane (MFS-USA).

The isolated polysaccharide (PLS) (Gonzaga et al., 2005) was provided by the Polymer Laboratory of the Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza-Ce, Brazil. To determine antiviral activity, the polysaccharide was dissolved in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), filter-sterilized and kept at 4°C for a maximum of 72 h.

2.2. Cells and virus

HEp-2 cells (epithelial cells of human larynx carcinoma, ATCC CCL-23) were grown at 37°C in DMEM, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL) and treated with 100 μ g/ml streptomycin (Sigma, Chem. Co. U.S.A.), 100 IU/ml of penicillin (Sigma, Chem. Co.U.S.A.) and 2.5 μ g/ml of fungizone (Bristol Myers-Squibb).

The sample of poliovirus type 1 (P1) (ATCC VR-58), was donated by the Department of Virology of IMPPG- UFRJ, RJ, Brazil. The virus stock was prepared in HEp-2 cells and maintained at -80°C . The virus titer was determined by the plaque assay.

2.3. Cytotoxicity assay

The evaluation of the test substances for cytotoxicity was carried out using the MTT method (MTT-based in vitro toxicology assay kit, Stock No. TOX-1, Sigma, Chem. Co.) according to the manufacturer's instructions. HEp-2 cells were grown in 96-well microplates at 37°C and in 5% CO₂. After the formation of a monolayer, the medium

was replaced with fresh medium containing different concentrations of the test substances (62.5 – 10000 µg/ml for AE and EE and 25 – 4000 µg/ml for PLS). Cells grown without test substances and in the presence of medium with and without ethanol were used as controls. The plates were incubated for three days at 37°C and cell viability was then determined. The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) was calculated as the concentration of the test substance capable of reducing the optical density of the MTT product by 50% in relation to the controls by regression analysis.

2.4. Time of addition assay

The effect of time of addition of the substances on the replication of poliovirus was determined according to the method described by Yang et al. (2005), but with some modifications. HEp-2 cells were cultivated in 24-well plates and incubated at 37°C for 48 h in 5% CO₂. DMEM containing twofold serial concentrations of AE (125-1000 µg/ml), EE (125-1000 µg/ml) and PLS (25-200 µg/ml) were added at different times: before (-1 and -2 h), during (0 h) and after (1 and 2 h) viral infection at a multiplicity of infection (MOI) of 1. After infection, a plaque assay was carried out by adding to each well a layer of DMEM containing 1.5% agarose and 25mM MgCl₂. The cells were then incubated for 40 h, fixed with 10% formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.3, for 24 h and stained with 0.5% crystal violet in 20% ethanol, to determine the number of plaques. The percent viral inhibition (% V.I.) was calculated by following formula: $[1 - (\text{number of plaques with drug} / \text{number of plaques in control})] \times 100$. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was determined as the concentration capable of reducing the number of PFU by 50%. The selectivity index (S.I.) was expressed as the ratio of CC₅₀/IC₅₀.

Concomitantly, interferon was used as the positive control for inhibition of viral replication at a concentration of 1000 U/ml.

2.5. Virucidal activity

The direct effect of AE, EE and PLS on the replication of poliovirus was determined by mixing equal volumes of virus suspension (10^7 PFU/ml) and DMEM containing different concentrations of the test substances, followed by incubation for 1 h at 37°C. After this period, the residual viral titer was determined by the plaque assay.

2.6. Viral adsorption assay

AE, EE and PLS were examined for their inhibitory effect on virus adsorption by HEp-2 cells according to Zhu et al. (2004) with some modifications. HEp-2 cells were grown in 24-well plates and incubated at 37°C for 2 days in 5% CO₂. After the formation of the cell monolayer, the plates were infected with poliovirus in the presence and absence of different concentrations of the test substances. After a viral adsorption period of 60 min at 4°C, the cells were washed with PBS to remove the non-adsorbed virus and the plaque assay was performed.

2.7. Indirect immunofluorescence reaction (IIF)

HEp-2 cells were grown in 24-well plates containing cover slips and incubated for 2 days at 37°C in 5% CO₂. After the formation of a cell monolayer, the culture medium was removed and the cells were inoculated with virus at an MOI of approximately 1.

Different concentrations, of the test substances, as used before, were added at zero hour of infection (0 h). Cell cultures inoculated but not treated and cell cultures not inoculated maintained in the absence or presence of the test substances and ethanol, served as controls. At 24 h post-infection (p.i.), the cells were washed with PBS and fixed with acetone (-20°C) for 20 min. The IIF reaction was performed using rabbit serum anti-poliovirus type 1 (supplied by Dr. E.C. Leal, INCQS/FIOCRUZ, RJ) and sheep serum anti rabbit IgG conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (Sigma Chem. Co., USA). The cells were examined with a Zeiss fluorescence microscope, and 100 cells/cover slip were scored. The experiments were carried out in triplicate.

3. Results

3.1. Cytotoxicity assay

The test substances affected the viability of cells at different concentrations. CC_{50} for the aqueous and ethanol extracts and polysaccharide was 5000, 2302 and 969 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The ethanol did not show any toxic effect on the cells at the dilution utilized to obtain the extract.

3.2. Effect of time of addition of the test substances obtained from *Agaricus brasiliensis* on viral inhibition

The results obtained from the plaque assay showed a greater activity of viral inhibition when the substances were added at the same time as the virus (time 0h),

for EE, where the % V.I. was 88% for 1000 µg/ml (Fig. 1A); 50.1% for AE at the same concentration (Fig. 1B) and 67.3% for PLS at 200 µg/ml (Fig. 1C). When the substances were added before or after infection occurred, there was a decrease in viral inhibition. The IC₅₀ calculated based on the results obtained for time 0 h was 922.89 (S.I. 5.4), 187.6 (S.I. 12.3) and 97.2 µg/ml (S.I. 9.9) for AE, EE and PLS, respectively (Table 1). Interferon, utilized as a control, at a concentration of 1000 U/ml, inhibited replication of the virus by 100%. The IC₅₀ value was calculated by regression analysis of the dose-response curve generated from the data.

3.3. Virucidal test

The results obtained in the test for virucidal activity showed that none of the test substances (EE, AE and PLS) was capable of interfering with the infectiousness of poliovirus, and therefore these substances had no direct action on the virus.

3.4. Viral adsorption assay

The effect of the test substances on the adsorption of virus by HEp-2 cells, determined by the plaque assay, resulted in a slight %V.I. of 36% for EE, 8% for AE and 12% for PLS at higher concentrations tested.

3.5 Indirect immunofluorescence reaction

The results obtained by indirect immunofluorescence, after treatment with the test substances at time 0 h of infection, showed a dose-dependent response (table 2). A maximum % V.I. of 58.6% for EE, 14% for AE and 28.5% for PLS was observed at higher concentrations.

4. Discussion

In this work, we tested an aqueous and ethanol extract and an isolated polysaccharide of *Agaricus brasiliensis* for antiviral activity against poliovirus type 1. We found that these substances showed activity that was dependent on concentration and the time point of exposure. Both the aqueous and the ethanol extract, along with the polysaccharide, were more effective when added to cultures during the infection period (time 0 h). EE induced the greatest %V.I., followed by PLS and AE, and this finding is in accordance with the S.I. obtained which was also greatest for EE, followed by that for PLS and EA. The results of IIF test showed maximum reduction of fluorescent cells for EE, similarly when compared with plaque assay, albeit in lower percentage of inhibition. This could be justified by the earlier time IIF was performed. Sorimachi et al. (2001) showed that fractions obtained from an aqueous extract of *A. brasiliensis* mycelium with 44 and 50% ethanol, inhibited completely the cytopathic effect (CPE) induced by western equine encephalomyelitis virus (WEE). Fractions obtained with ethanol concentrations of 29, 38, 44 and 50%, from the fruiting body, added after viral adsorption (1 h) inhibited slightly the CPE induced by poliovirus. Some authors have reported an antiviral activity for

polysaccharides isolated from fungi. Zhang et al. (2004) tested fractions obtained from B-glucan isolated from *Pleurotus tuber-regium* for antiviral activity against herpes simplex type 1 and 2 viruses and found that all the fractions were more effective when added simultaneously with the virus at the time of viral infection, concurring thus with the results of our study. AE, EE and PLS did not show virucidal activity, and all three substances had a weak influence on viral adsorption. We suggest therefore that these substances derived from the fruiting body of *A. brasiliensis* interfere in the initial stage of the replication of poliovirus.

Acknowledgements

We thank Dr. Tulio Oliveira de Carvalho for helping on statistical analysis. This work was partially supported by CNPq, CAPES and Fundação Araucária and it is part of L.C.Faccin M.Sc. manuscript.

References

- Awadh Ali, N.A., Mothana, R.A.A., Lesnau, A., Pilgrim, H., Lindesquist, U., 2003. Antiviral activity of *Inonotus hispidus*. *Fitoterapia* 74, 483-485.
- Bellini, M.F., Giacomini, N.L., Eira, A.F., Ribeiro L.R., Mantovani, M.S., 2003. 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.
- Delmanto, R.D., Lima, P.L.A., Sugui, M.M., Eira, A.F., Salvadori, D.M.F., Speit, G., Ribeiro, L.R., 2001. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. *Mutation Research* 496, 15-21.
- Gonzaga, M.L.C., Ricardo, N.M.P.S., Heatley, F., Soares, S.A., 2005. Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murrill. *Carbohydrate Polymers* 60, 43-49.
- 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.
- Kawagishi, H., Inagaki, R., Kano, T., Shimura, K., Ito, H., Hagiwara, T., Nakamura, T., 1990. 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.
- Menoli, R.C.R.N., Mantovani, M.S., Ribeiro, L.R., Speit, G., Jordão B.Q., 2001. Antimutagenic effect of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill extracts on V79 cells. *Mutation Research* 496, 5-13.
- Mueller, S., Wimmer, E., Cello, J., 2005. Poliovirus and poliomyelitis: A tale of guts, brains, and an accidental event. *Virus Research* 111, 175-193.
- Nakajima, A., Ishida T., Koga, M., Takeuchi, T., Mazda, O., Takeuchi, M., 2002. Effect of hot water extract from *Agaricus blazei* Murrill on antibody-producing cells in mice. *International Immunopharmacology* 2, 1205-1211.
- Ngai, P.H., Ng, T.B., 2003. Lentin, a novel and potent antifungal protein from shiitake mushroom with inhibitory effects on activity of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase and proliferation of leukemia cells. *Life Sciences* 73, 3363-3374.
- Oliveira, J.M., Jordão, B.Q., Ribeiro, L.R., Eira, A.F., Mantovani, M.S., 2002. Antigenotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murrill lineage 99/26) in mammalian cells in vitro. *Food and Chemical Toxicology* 40, 1775-1780.
- Pallansch, M. A., Roos R. P., 2001. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. In: D. Knipe, P.M. Howley, R.A. Griffim, M.A.

Lamb, B. Martin, B. Roizman, S.S. Straus, (eds), Fields Virology. 4^a ed. Philadelphia, Lippincott-Raven, pp. 723-776.

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

Wang, H.X., Ng, T.B., 2000. Isolation of a novel ubiquitin-like protein from *Pleurotus ostreatus* mushroom with anti-human immunodeficiency virus, translation-inhibitory, and ribonuclease activities. Biochemical and Biophysical Research Communications 276, 587-593.

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.

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.

Zhu, W., Chiu, L.C.M., Ooi, V.E.C., Chan, P.K.S., Ang, 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.

Table 1. Antiviral activities of the aqueous extract (AE), ethanol extracts (EE) and isolated polysaccharide (PLS) from *Agaricus brasiliensis* against poliovirus type 1 in HEp-2 cells by the plaque assay.

Fig.1. Time-of addition effect of aqueous extract (E.A.) **(a)**, ethanol extract (E.E.) **(b)** and polysaccharide (PLS) **(c)** of *Agaricus brasiliensis* on poliovirus replication in HEp-2 cells by the plaque assay. The extracts were added at various concentrations before (-2 and -1 h) during (0 h) or after (1 and 2 h) virus infection. The values represent the mean \pm SD of three independent experiments.

Table 2. Effect of AE, EE and PLS of *Agaricus brasiliensis* on poliovirus replication in Hep-2 cells by immunofluorescence assay. The substances were added at zero hour of infection. The percentage of inhibition was calculated with respect to untreated infected cells. The experiments were carried out in triplicate.

Table 1

	CC ₅₀ ^a (µg/ml)	IC ₅₀ ^b (µg/ml)	SI ^c
AE	5000	922.9	5.4
EE	2302	187.6	12.3
PLS	969.4	97.2	9.9

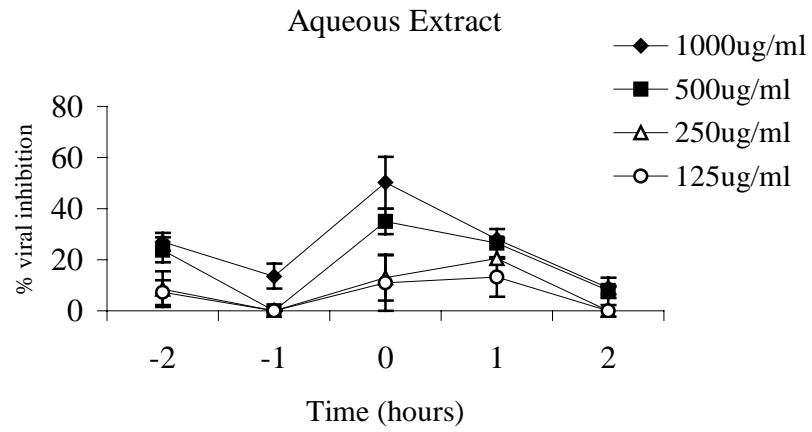
^a 50% cytotoxic concentration

^b 50% inhibitory concentration

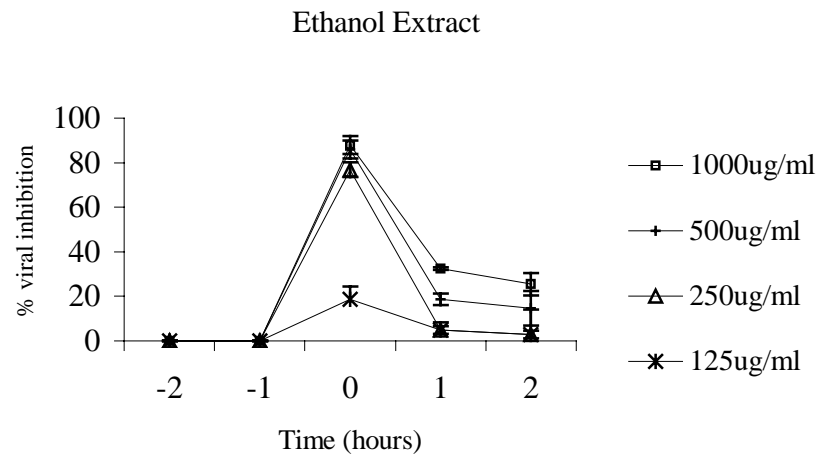
^c Selectivity index = (CC₅₀/IC₅₀)

Fig.1

(a)



(b)



(c)

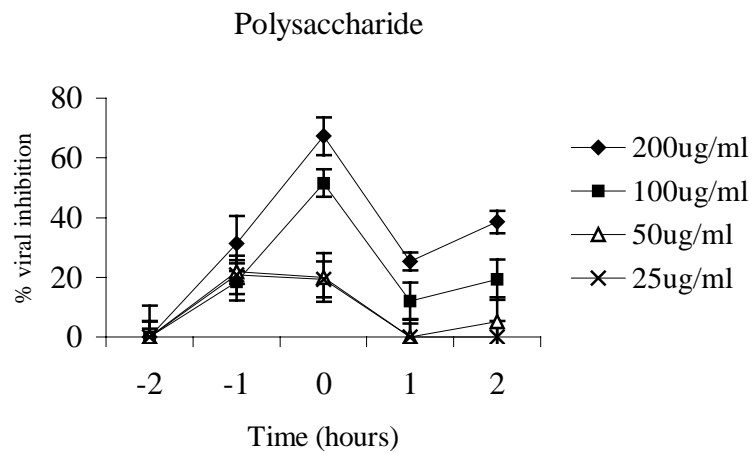


Table 2

Aqueous extract		Ethanol extract		Polysaccharide	
Concentration	%	Concentration	%	Concentration	%
($\mu\text{g/ml}$)	inhibition*	($\mu\text{g/ml}$)	inhibition	($\mu\text{g/ml}$)	inhibition
125	0	125	0	25	0
250	0	250	20.6	50	0
500	7	500	31	100	13
1000	14	1000	58.6	200	28.5

* % of inhibition of fluorescent cells number in comparison with control

ANEXO



Basideomiceto *Agaricus blazei* Murill ss. Heinem