



ALDIANE PASSOS DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS EFEITOS ANTIVIRAL E IMUNOMODULADOR
DE *Pleurotus ostreatus* EM MODELO *IN VITRO* DE INFECÇÃO DE HEPATÓCITOS
HUMANOS (HUH- 7) INFECTADOS PELO VÍRUS DENGUE.

Orientador: Prof. Dr. Raimundo Sousa Lima Júnior
Co- Orientadora: Prof (a). Dra. Larissa de Souza Kirsch

Manaus- AM

2017



ALDIANE PASSOS DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS EFEITOS ANTIVIRAL E IMUNOMODULADOR
DE *Pleurotus ostreatus* EM MODELO *IN VITRO* DE INFECÇÃO DE HEPATÓCITOS
HUMANOS (HUH- 7) INFECTADOS PELO VÍRUS DENGUE.

Orientador: Prof. Dr. Raimundo Sousa Lima Júnior
Co- Orientadora: Prof (a). Dra. Larissa de Souza Kirsch

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado ao Curso de Licenciatura em
Ciências Biológicas da Universidade do
Estado do Amazonas, como requisito
obrigatório para a obtenção do grau de
Licenciado em Ciências Biológicas.

Manaus- AM

2017

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

D278a de Oliveira, Aldiane Passos
Avaliação dos possíveis efeitos antiviral e imunomodulador de *Pleurotus ostreatus* em modelo *in vitro* de infecção de hepatócitos humanos (Huh- 7) infectados pelo vírus Dengue / Aldiane Passos de Oliveira. 2017
34 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Dr. Raimundo Sousa Lima Júnior
Coorientadora: Dra. Larissa de Souza Kirsch
TCC de Graduação (Licenciatura Plena em Ciências Biológicas) -
Universidade do Estado do Amazonas.

1. NS1. 2. IL-8. 3. *Pleurotus ostreatus*. 4. DENV-2 . I. Lima Júnior, Dr. Raimundo Sousa II. Universidade do Estado do Amazonas III. Título

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Raimundo Sousa Lima Júnior (orientador)

Prof. M.Sc. Leandro Barreto Dutra (UEA)

Prof. M.Sc. Wagner Alan dos Santos Moreira (ESBAM)

À minha querida família, amigos e professores
que sempre tiveram dispostos a me incentivar e
colaboraram na conquista desse sonho.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus por ter me dado o dom da vida e por iluminar constantemente meu caminho durante toda minha caminhada.

A minha querida família, em especial meus pais, Ilma e Vanildo, as minhas irmãs, Geisiane e Keliane, por me amarem, pelos encorajamentos e apoio que sempre tive deles. Eu os amo incondicionalmente.

A Universidade do Estado do Amazonas – UEA e todo o corpo docente do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas pela construção do meu caráter profissional, principalmente ao Prof. Dr. Raimundo Júnior pela administração do curso pelo companheirismo que teve para com nossa turma, assim como pela oportunidade dada a mim ao participar do Projeto de Iniciação Científica (PAIC), por seus ensinamentos e experiências, suportes, repreensões, paciência e pelo apoio na elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Hector da Unidade de Saúde (ESA), por disponibilizar o laboratório de biotecnologia para realização parcial do projeto.

A Prof.^a Dr.^a Larissa Kirsch por seus ensinamentos, suportes, repreensões, dedicação, conselhos, disposição e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

A minha grande amiga e colega de trabalho Marjory Martins pela ajuda nos experimentos, apoio e companheirismo.

Aos meus queridos amigos, principalmente aos que estiveram comigo do decorrer de toda essa jornada de descobertas, especialmente Cleudiane Andrade e Carlos Eduardo nos acompanhamentos laboratoriais. Obrigada pelo enorme companheirismo e colaboração.

Ao Dr. Cristovão Alves da Costa e Dr. Gemilson Pontes Soares por disponibilizarem o Laboratório de Virologia do Instituto de Pesquisas da Amazônia - INPA para elaboração dos experimentos e também pelo auxílio dado.

E a todos que de alguma forma, seja ela direta ou indiretamente, ajudaram na realização dessa etapa tão significativa na minha vida. Obrigada!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”

Marthin Luther King

LISTA DE ABREVIACÕES

APO - Exopolissacarídeos de *Pleurotus ostreatus*

BDA - gar batata dextrose

BSA - Albumina sérica bovina

DENV – Dengue vírus

DMSO – Dimetilsufóxido

DMEM – (do inglês Dulbecco`s modified Eagle`s médium)

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática ou Ensaio Imunoenzimático (do inglês: Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

EPS- Exopolissacardeo

Huh-7 – Linhagem celular de hepatocarcinoma humano (do inglês: *hepatocarcinoma cell line*)

HRP - Do inglês *Horseradish Peroxidase*

IL-8 – Interleucina-8

MIF - Fator Inibitório de migração de Macrófagos (do inglês: *Factor Macrophage Migration Inhibitor*).

MTT – (do inglês: *3-(4,5-dimethylthiazol-. 2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*)

OMS – Organização Mundial da Saúde

RNA - cido desoxirribonucleico

TNF- α - Fator de Necrose tumoral- T (do inglês *tumor necrosis factor- α*)

TMB - Tetrametilbenzidina

SFB – Soro fetal bovino

RESUMO

Nas últimas décadas a dengue tem se tornado um dos principais problemas de saúde pública. Dados da Organização Mundial da Saúde estimam que anualmente os casos atingem entre 50 a 100 milhões de indivíduos em todo o globo. Os vetores da doença são mosquitos do gênero *Aedes*, tendo como principal vetor a espécie *Aedes aegypti*. Quando ocorre a infecção, algumas células como as dendríticas, macrófagos, linfócitos B e linfócitos T estão envolvidas no processo da resposta imune do hospedeiro para combater o vírus, em seguida haverá a ativação imunológica, pois tem-se a produção de várias citocinas, tais como MIF e IL-8. Essas citocinas são encontradas em altos níveis geram o quadro grave da doença. Devido não haver até o momento nenhuma droga antiviral e/ou imunomoduladora contra a dengue surge a necessidade de se descobrir um produto natural que interfira na infecção ou na resposta inflamatória dos sintomas clássicos da doença. E para encontrar respostas a esse problema, alguns estudos são direcionados aos fungos, buscando conhecimento de suas ações terapêuticas. Sendo assim, o fungo escolhido na pesquisa foi o *Pleurotus ostreatus* que de acordo com a literatura, ele apresenta atividade biológica comprovada. Para isso, uma linhagem celular de hepatócitos humanos (Huh-7) foi infectada com DENV-2 e tratadas com diferentes concentrações (1 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml e 75 µg/ml) de exopolissacarídeos de *P. ostreatus* (APO) para verificação da viabilidade celular, a qual foi realizada pelo ensaio colorimétrico de MTT, que demonstrou que nenhuma das concentrações de APO analisadas foi considerada citotóxica sobre a linhagem Huh-7. Para verificação das possíveis atividades antivirais foi utilizado o Kit de ELISA Platelia Dengue NS1 Ag para dosar o antígeno NS1 e na atividade imunomoduladora realizou-se a quantificação da citocina IL-8, ambas atividades foram verificadas nos sobrenadantes das Huh-7 infectados. Nos testes realizados, nenhuma concentração de APO apresentou atividade antiviral ou imunomoduladora.

Palavra-chave: NS1, IL-8, *Pleurotus ostreatus*, DENV-2

ABSTRACT

In recent decades, dengue has become a major public health problem. Data from the World Health Organization estimate that every year cases reach between 50 and 100 million individuals across the globe. The vectors of the disease are mosquitoes of the genus *Aedes*, having as main vector the species *Aedes aegypti*. When infection occurs, some cells such as dendritic cells, macrophages, B lymphocytes and T lymphocytes are involved in the immune response process of the host to fight the virus, then there will be the immunological activation, since the production of several cytokines such as such as MIF and IL-8. These cytokines are found at high levels generating the serious picture of the disease. Because there is no antiviral and/or immunomodulatory drug against dengue so far, there is a need to discover a natural product that interferes with the infection or the inflammatory response of the classic symptoms of the disease. And to find answers to this problem, some studies are directed to fungi, seeking knowledge of their therapeutic actions. Therefore, the fungus chosen in the research was the *Pleurotus ostreatus*, which, according to the literature, has a proven biological activity. A human hepatocyte cell line (Huh-7) was infected with DENV-2 and treated with different concentrations (1 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml and 75 µg/ml) of exopolysaccharides of *P. ostreatus* (APO) to verify cell viability, which was performed by the MTT colorimetric assay, which showed that none of the analyzed APO concentrations was considered cytotoxic on the Huh-7 lineage. In order to verify the possible antiviral activities, the NS1 Ag Plague Dengue ELISA Kit was used to quantify the NS1 antigen and in the immunomodulatory activity the IL-8 cytokine was quantified, both activities were verified in the supernatants of infected Huh-7. In the tests performed, no APO concentration showed antiviral or immunomodulatory activity.

Keyword: NS1, IL-8, *Pleurotus ostreatus*, DENV-2

SUMÁRIO

1. Introdução	11
2. Objetivo Geral	15
2.1 Objetivos Específicos	15
3. Material e Métodos	16
3.1 Reativação e manutenção da cultura de <i>P. ostreatus</i>	16
3.2 Cultivo <i>P. ostreatus</i> por fermentação submersa	16
3.3 Extração	17
3.4 Linhagem celular e DENV-2	17
3.5 Avaliação de viabilidade celular	17
3.6 Infecção e tratamento da linhagem de hepatócitos (Huh-7).....	18
3.7 Atividade antiviral	19
3.8 Atividade imomoduladora	19
4. Resultados e Discussão	21
4.1 Extração	21
4.2 Avaliação da viabilidade celular de Huh-7 pelo ensaio de MTT	21
4.3 Avaliação da atividade antiviral.....	24
4.4 Avaliação da atividade imomoduladora.....	25
5 Conclusão	27
6 Referências	28

1. Introdução

A dengue é uma doença que possui uma ampla distribuição entre a faixa abaixo e acima do Equador, 35° N a 35° S. Até a metade da década de 1990, o Sudeste Asiático era considerada a região do mundo mais atingida por dengue. Porém, logo depois os países das Américas Central e do Sul começaram a se destacar nesse cenário e passaram a contribuir com muito mais da metade dos casos notificados dessa doença no mundo (TEIXEIRA et al., 2008).

Nas últimas décadas verificou-se que, devido ao elevado número de casos da doença em vários países, a dengue se tornou um dos principais problemas de saúde pública mundial (WYSE, 2011). Dados da Organização Mundial da Saúde estimam que anualmente a doença atinja entre 50 a 100 milhões de indivíduos em todo o globo (WHO, 2009), sendo que atualmente mais de 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco para doença em mais de 100 países (WHO, 2014). No Brasil, até agosto de 2017, foram registrados 214.990 casos prováveis de dengue, e destes foram confirmados 169 casos de dengue grave e 1.821 casos de dengue com sinais de alarme. Contudo, foram confirmados 83 óbitos por dengue, no entanto, ao comparar os dados com o mesmo período de 2016 tem-se uma redução, pois neste mesmo período foram confirmados 675 óbitos (BRASIL, 2017).

O vírus Dengue pertence à família Flaviviridae e ao gênero *Flavivirus*, contendo em seu interior um genoma de RNA de fita simples e envelopado (SANTOS et al., 2008; MUKHOPADHYAY et al., 2005). Sabe-se que hoje há quatro sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, sendo que qualquer um destes apresenta a capacidade para causar as formas graves da doença. Os vetores da doença são mosquitos do gênero *Aedes*, tendo como principal vetor a espécie *Aedes aegypti*, frequentes em áreas tropicais e subtropicais do mundo (GUBLER, 2006).

Durante o repasto sanguíneo, os vírus contidos nas glândulas salivares das fêmeas do mosquito são injetados na corrente sanguínea do homem a partir daí, vão se multiplicar em diversas células do organismo. Os principais locais de replicação dos vírus ocorrem nos monócitos, macrófagos e células dendríticas (SRIKIATKHACHORN, 2009), no entanto, células endoteliais, células neuronais e hepatócitos também são consideradas sítios importantes na multiplicação do vírus (ANDERSON, 2003).

Referente ao avanço da doença no organismo humano, a infecção pelo vírus da dengue ataca principalmente células do sistema reticuloendotelial (baço, fígado e medula

óssea), assim como monócitos, linfócitos, células de Kupffer e macrófagos alveolares (JESSIE et al., 2004). No entanto, segundo Shah (2008) e Franca e Zucoloto (2010), o fígado também é um dos principais órgãos envolvidos na infecção pelo vírus Dengue.

Quando ocorre a infecção, algumas células como as dendríticas, macrófagos, linfócitos B, linfócitos T, células NK e mastócitos, rapidamente envolvem-se no processo da resposta imune do hospedeiro para combater o vírus (ROBERTSON, 2002; GREEN e ROTHMAN, 2006). Depois de ocorrer a infecção pelo vírus Dengue, haverá a ativação imunológica, pois tem-se a produção de várias citocinas, num fenômeno conhecido como "tempestade de citocinas" (BUTTHEP et al., 2012). Depois de instalada a resposta imune contra o Dengue, fatores como MCP-1, MMP, IL-8, MIF e TNF- α são produzidos e vão desempenhar um papel fundamental na desregulação do endotélio e, portanto, devido essa ação tendem a serem encontradas em altos níveis em pacientes com as formas graves da doença (BASU; CHATURVEDI, 2008; RAGHUPATHY et al., 1998; DALRYMPLE e MACKOW, 2012).

Nos casos graves da dengue se faz necessário a reposição de fluidos, podendo ser por via oral ou por via parental, sendo esta a única recomendação medicamentosa, visto que nenhuma droga com ação antiviral tem sido indicada na rotina do tratamento de pacientes com dengue devido não existir até o momento uma que represente as propriedades em eliminar ou controlar os sintomas da doença (WHO, 2009; SIMMONS et al., 2012).

Devido a dengue ser considerada um dos principais problemas de saúde pública mundial, e por não haver até o momento nenhuma droga antiviral e/ou imomoduladora com eficácia na eliminação e ou controle dos sintomas no tratamento de pacientes com dengue, surge a necessidade de se descobrir um produto natural que interfira na infecção ou na resposta inflamatória dos sintomas clássicos da dengue (HASAN et al., 2016).

Atualmente não existe um tratamento específico para a infecção por dengue, pois os esforços de prevenção e controle não são suficientes. Porém, de acordo com Lee et al. (2015) está em progresso o desenvolvimento da vacina contra a dengue o que pode reduzir significativamente o ônus da doença e alguns países como Vietnã, Tailândia e Colômbia são candidatos para se tornarem adotadores precocemente desta vacina por apresentarem maior incidência de casos. Sendo assim, uma boa vacina para a prevenção da dengue em países endêmicos, deve ser: eficaz contra todos os sorotipos, segura, de longa duração e econômica (WHO, 2009).

E ainda para encontrar respostas a esse problema, fazem-se estudos relacionados a certos fungos que apresentam ações terapêuticas, o pode ser verificado graças aos produtos

naturais ou bioativo que produzem. Estes são encontrados na natureza e, geralmente, tem atividade biológica ou farmacológica que podem ser usadas na descoberta ou concepção de produtos farmacêuticos (CUTLER; HORACE, 2000; NEWMAN; CRAGG, 2007).

No contexto geral, fungos são indivíduos eucariontes, alguns são unicelulares outros pluricelulares, heterotróficos, alguns são decompositores e outros são parasitas. Podem reproduzir-se tanto de forma sexuada quanto assexuada. Na classificação dos fungos, há aqueles filamentosos os quais são formados por hifas, que corresponde à filamentos de células formando uma rede chamada de micélio. E há as leveduras, sendo unicelulares (SILVA; COELHO, 2006). Os fungos filamentosos chamados cogumelos pertencem ao filo Basidiomycota e formam estruturas de reprodução sexuada chamada basidioma ou corpo de frutificação. A partir dessas estruturas podem ser obtidos extratos utilizados nos estudos biomédicinas, a exemplo dos polissacarídeos. Muitos cogumelos contêm esses compostos ativos em basidiomas, micélio cultivado e caldo de cultura. Dessa forma, os cogumelos representam uma importante e ampla fonte de conteúdo que até o momento não foram explorados como novos produtos farmacêuticos (WASSER, 2002). A exemplo, tem-se os exopolissacarídeos (EPS) que são definidos como polissacarídeos extracelulares, produzidos por alguns fungos, os quais são encontrados ligados à superfície das células ou são excretados para o meio extracelular, na forma de limo. São produzidos quando o micro-organismo se encontra em condições ambientais desfavoráveis, e assim ele responde apresentando uma estratégia metabólica para sua sobrevivência e crescimento (SUTHERLAND, 1996).

Os cogumelos, devido sua textura e o aroma agradável são amplamente apreciados na culinária mundial, e ainda apresentam variadas concentrações de nutrientes, como proteínas e carboidratos (BONATTI et al., 2004), além de possuírem em sua composição minerais como K, P, Mg e Na, em menor concentração (STURION; RANZANI, 2000). Entre os cogumelos mais consumidos no Brasil se destacam *Agaricus bisporus* (Champignon de Paris), *Lentinula edodes* (Shiitake) e *Pleurotus ostreatus* (Hiratake e Shimeji) (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004).

Os cogumelos do gênero *Pleurotus* pertencem ao filo Basidiomycota, classe Basidiomycetes, Ordem Agaricales, família Pleurotaceae e constitui um grupo de cogumelos cosmopolitas, conhecidos popularmente como cogumelos ostras e são comumente encontrados em regiões de clima temperado e tropical, cujas espécies são saprófitas, suas linhagens apresentam variadas cores, que vão do branco ao cinza-escuro (NEVES, 2007), estes se desenvolvendo em troncos de árvores em decomposição (COHEN et al., 2002). Além

disso, Ranadivé (2012) informou que *Pleurotus* são ricos em vitamina C, B e sais minerais complexos os quais são exigidos pelo corpo humano.

Além da importância nutricional, alguns cogumelos produzem compostos com efeitos farmacológicos e por isso são chamados de cogumelos medicinais (FACCIN et al., 2007). Pesquisas realizadas com *Pleurotus ostreatus* demonstraram atividade antitumoral e antioxidativa (JAYAKUMAR; RAMESH; GERALDINE, 2006). Em outra pesquisa, foi observado que coelhos que consumiam o cogumelo *Pleurotus ostreatus* na sua dieta alimentar tiveram a incidência e tamanho de placas ateroscleróticas reduzidas significativamente. Além disso, outra ação deste fungo foi vista em ratos, verificando uma diminuição da toxicidade de ciclofosfamida nesses indivíduos. Assim como, uma redução das alterações patológicas do cancro do cólon induzida por dimetil-hidrazina em ratos (LINDEQUIST et al., 2005), e com essas ações terapêuticas esse fungo pode responder significativamente ao estudo com o vírus dengue.

Dessa forma, o objetivo geral do presente trabalho foi avaliar *in vitro* uma espécie de *Pleurotus* quanto a atividade antiviral e/ou imunomoduladora em linhagem de hepatócitos Huh-7 infectada pelo vírus dengue sorotipo 2 (DENV-2).

2. Objetivo Geral

Avaliar as possíveis atividades antivirais e imunomoduladora de exopolissacarídeos de *Pleurotus ostreatus* em linhagem de hepatócitos infectados pelo vírus DENV-2.

2.1 Objetivos Específicos

- Isolar o micélio de *Pleurotus ostreatus*, cultivando o fungo por fermentação submersa com a finalidade de obter extrato bruto;
- Extrair a partir do extrato bruto os exopolissacarídeos de *Pleurotus ostreatus*;
- Avaliar a citotoxicidade do extrato de *P. ostreatus* na cultura de hepatócitos (Huh-7);
- Avaliar a atividade imunomoduladora dos exopolissacarídeos de *P. ostreatus*, por meio de Ensaio Imunoenzimático (ELISA), com a finalidade de dosar a citosina IL-8 nos sobrenadantes de Huh-7 infectadas pelo DENV-2;
- Avaliar a atividade antiviral de *P. ostreatus* através da dosagem, por ELISA, do antígeno viral NS1 nos sobrenadantes de Huh-7 infectadas pelo DENV-2.

3. Material e Métodos

3.1 Reativação e manutenção da cultura de *P. ostreatus*

Para a realização desta pesquisa foi utilizada uma linhagem comercial de *P. ostreatus*. O isolamento foi realizado em meio ágar batata dextrose (BDA) com extrato de levedura 0,5% (p/v) em placas de Petri. Os cultivos foram incubados a 25 °C na ausência de luz por oito dias (KIRSCH et al., 2011).

3.2 Cultivo *P. ostreatus* por fermentação submersa

O cultivo de *P. ostreatus* foi realizado em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL do meio de cultura, cuja formulação está descrita na Tabela 1 (MAZZIERO, 1996). A partir das culturas mantidas em BDA + YE (item 4.1) foram retirados 3 fragmentos de micélio ($\varnothing= 1\text{cm}$) e adicionados ao meio de cultura, previamente esterilizado a 121 °C por 15 minutos. A fermentação submersa foi conduzida durante 15 dias a 25 °C sob agitação constante de 150 rpm (KIRSCH et al., 2011).

Tabela 1. Formulação do meio de cultura para cultivo de *P. ostreatus* por fermentação submersa

Componentes	Concentração
Glicose	40g/L
Peptona	1g/L
Extrato de levedura	2g/L
K ₂ HPO ₄	1g/L
MgSO ₄	0,2g/L
(NH) ₄ SO ₄	0,2g/L
Água destilada	1000 MI
Ph	6,0

Ao término do processo fermentativo a biomassa micelial obtida foi separada por filtração a vácuo em papel de filtro (Whatman No.1), lavada com água destilada esterilizada e desidratada a 60 °C, até peso constante (KIRSCH et al, 2016). O meio líquido recuperado foi utilizado para avaliação da produção de exopolissacarídeos (EPS).

3.3 Extração

Com a finalidade de recuperar os EPS o meio líquido do experimento anterior foi tratado com etanol 95% a 8 °C (3:1, v/v). Após esse procedimento, colocou-se a mistura em um concentrador à vácuo, e em seguida foi levado a um liofilizador, para eliminar o meio aquoso deixando somente os compostos orgânicos. O uso de tais equipamentos foi cedido pelo Dr. Carlos Cleomir, responsável da Coordenação de pesquisas em produtos Naturais (INPA).

3.4 Linhagem celular e DENV-2

Os ensaios celulares foram realizados no Laboratório de Virologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. A linhagem celular de hepatócitos (Huh-7) e as alíquotas do DENV-2 foram fornecidas pela Dra. Claire Fernandes Kubelka, chefe do Laboratório de Imunologia Viral da FIOCRUZ-RJ. As células Huh-7 foram cultivadas em frascos de cultura (25 cm²) com 10 ml de meio de cultura DMEM (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2 mM de L-glutamina, 100 µg/mL de Estreptomicina e 100U/mL de Penicilina e 1 µg/mL de fungisona, em estufa com 37 °C e 5% de CO₂ em um período de 24 e 48h. A partir daí a multiplicação celular foi acompanhada diariamente com auxílio de microscópio invertido de contraste de fase, observando a formação de uma monocamada confluenta, os hepatócitos foram passados para novas garrafas (expansão celular) com auxílio de Tripsina-EDTA, seguido de centrifugação a 250 G por 7 minutos. Após a centrifugação, o pellet formado foi ressuspenso em meio fresco suplementado e depois transferido para novos frascos de 25 cm². Quando necessário, para manter um estoque, as células eram congeladas em criotubos contendo solução de DMSO a 10% numa temperatura inicial de -80 °C (por 24h), e depois em nitrogênio líquido.

3.5 Avaliação de viabilidade celular

Os exopolissacarídeos do *Pleurotus ostreatus* foi diluído em DMSO 100%, aliquotado e posteriormente avaliado quanto à sua citotoxicidade.

Os exopolissacarídeos de *Pleurotus ostreatus* foram avaliados quanto à sua citotoxicidade nas Huh-7 através de ensaios colorimétricos quantitativo MTT (3-(4,5dimethylthiazol-2-yl) diphenyl tetrazolium bromide) (MOSMANN, 1983). Para tal, foi realizada a contagem das células em Câmara de Neubauer e a suspensão celular foi distribuída em 3 placas de 96 poços junto 200 µL de meio DMEM-F12, mais 10% SFB, 1% de antibiótico e antifúngico), numa concentração de 10^5 células por poço. As placas foram armazenadas em estufa (37 °C e 5% de CO₂) por cerca de 24h a 48h, período necessário para formação da monocamada. Depois que a monocamada se formou, o sobrenadante foi retirado e foi acrescentado 200 µL de meio de cultura fresco com 5% de SFB nos poços de controle e nos demais poços, 200 µL das amostras em diferentes concentrações dos polissacarídeos de *P. ostreatus* (1 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml e 75 µg/ml).

As placas ficaram incubadas na estufa por 24h à 72h. Depois de cada período da cinética retirou-se 180µL de sobrenadante dos poços e adicionou-se 100 µL de Meio RPMI e 10µL de MTT (12mM) em todos. Ainda foi adicionado um controle negativo com apenas MTT e Meio RPMI. Cada placa ficou protegida da luz e incubada por 4 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, retirou-se o sobrenadante por poço de maneira que restasse apenas 25 µL. Por fim, acrescentou-se 50 µL de DMSO por poço, homogeneizando 3x. Incubou-se por 10 min. a 37 °C e 5% de CO₂. Seguidamente, homogeneizou-se por mais 3x. ao final, fez-se a leitura na leitora de microplacas Robonik (Robonik India PVT), nos comprimentos de onda de 540-570 nm. Os resultados foram projetados no Programa GraphPad Prism 6.

3.6 Infecção e tratamento da linhagem de hepatócitos (Huh-7)

Para os ensaios de infecção da linhagem de Huh-7 utilizou-se uma cepa asiática padrão universal (16681). Primeiramente, foram semeadas 1×10^5 células por poço de cultura de 24 poços, completado com meio de cultura DMEM até o volume final de 1.000 µL por poço. As placas foram incubadas em estufa 37 °C com 5% de CO₂ por 48h. Passado esse período, o sobrenadante substituído por 300 µL de inóculo viral diluído 1:5 em meio de cultura sem SFB. A adsorção viral ocorreu em estufa em 37 °C com 5% CO₂ por 2h. Posteriormente o sobrenadante foi retirado e adicionado 800 µL/poço de DMEM-F12 contendo 2% de SFB, sendo que alguns poços infectados foram tratados com diferentes concentrações dos polissacarídeos de *P. ostreatus* (1 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL e 75 µg/mL). Em seguida, as placas foram incubadas em estufa 37 °C com 5% de CO₂, sendo que

a cada 24h, durante 3 dias, os sobrenadantes foram aliquotados, etiquetados e armazenados em freezer - 80 °C para posterior dosagem do antígeno viral NS1 e da citocina IL-8.

3.7 Atividade antiviral

A possível atividade antiviral dos exopolissacarídeos de *P. ostreatus* foi determinada usando o Kit de ELISA Platelia Dengue NS1 Ag (BioRad), que é um ensaio imunoenzimático rápido e confiável para a quantificação relativa de antígeno NS1 no soro de pacientes (SILVA et al., 2011) e no sobrenadante células em cultura (LUDERT et al., 2008; CEBALLOS-OLVERA et al., 2010). Para tanto, adicionou-se por poço da placa 50µL de Solução Diluente, 50µL de amostra diluída 1:40 ou controle, 100µL de Conjugado diluído, seguidamente. Depois, a placa foi adesiva e levada para incubação na condição de 37 °C/5%CO₂ por 90 minutos. Após este período, lavou-se a placa 6 vezes com Solução de Lavagem do kit para depois ser adicionado o substrato TMB (160µL/poço). A placa ficou incubando em temperatura ambiente por 30 minutos para imediatamente depois ser acrescentada solução de paragem (H₂SO₄ 1N) com a finalidade estancar a reação colorimétrica. Por fim, foi realizada a leitura das densidades ópticas na leitora de ELISA Robonik (Robonik India PVT), nos comprimentos de onda recomendados.

3.8 Atividade imunomoduladora

A possível atividade imunomoduladora das diferentes concentrações dos exopolissacarídeos de *P. ostreatus* (APO) foi avaliada através da dosagem da citocina IL-8 nos sobrenadantes dos hepatócitos infectados, conforme descrito previamente (LIMA-JÚNIOR et al., 2013; MELLO et al., 2015). Vale ressaltar que essa citocina foi escolhida para a dosagem por apresentar relação com os casos graves de dengue (RAGHUPATHY et al., 1998). Para tanto, foi utilizado um kit comercial de ELISA padrão para IL-8 humana (PeproTech cat. # 900-k18). Previamente, as soluções a serem utilizadas foram preparadas: Solução de Lavagem (0,05% de Tween 20 em PBS 1X), Reagente de Bloqueio (diluir 1g de BSA em 100mL de PBS 1X filtrado, pH 7,2-7,4) e solução de paragem (HCl 1M).

Após o preparo de tais soluções, o Anticorpo de Captura foi diluído em PBS 1X (1/180). Após, adicionou-se 100µL por poço de uma placa de 96 poços. Em seguida a placa ficou incubando *overnight* a 4 °C. No dia seguinte, a placa foi lavada 4x para depois ser

acrescentado 280µL da solução de bloqueio em cada poço. Incubou-se a placa por 1h em temperatura ambiente (TA). Após esse período a mesma foi lavada 4x. Em seguida, preparou-se a Curva Padrão com a diluição do IL-8 padrão do kit em solução diluente (concentrações da curva: 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62 e 0 pg/mL). Foram distribuídos 100µL das amostras (sobrenadantes) e da Curva Padrão na placa, que depois ficou incubando por 2h em TA. Após, lavou-se 4x a mesma, e adicionou-se 100µL de Anticorpo de Detecção (1/180). Mais uma vez a placa foi deixada incubando por 2h em TA. Em seguida, foi lavada 4x e acrescentou-se 100µL por poço de Estreptavidina-HRP (1/200) em ambiente escuro. Ocorreu incubação por 30min em TA. Lavou-se 4x e adicionou-se 100µL por poço do substrato TMB, também no escuro. Depois, incubou-se por mais cerca de 20min em TA para imediatamente depois ser acrescentado 50µL de Solução de Paragem (HCL 1M), homogeneizando-a suavemente. A leitura das densidades ópticas da placa de ELISA foi realizada na leitora de ELISA Robonik (Robonik India PVT), nos comprimentos de onda de 450 e 630nm.

4. Resultados e Discussão

4.1 Extração

A partir da extração foram preparadas diferentes concentrações de EPS (75 µg/mL, 50 µg/mL, 10 µg/mL e 1 µg/mL e 0,1 µg/mL), conforme descrito na metodologia que posteriormente foram utilizadas para as atividades abaixo.

4.2 Avaliação da viabilidade celular de Huh-7 pelo ensaio de MTT

A avaliação da viabilidade celular dos hepatócitos humanos (Huh-7) tratados com diferentes concentrações dos extratos de exopolissacarídeos de *Pleurotus ostreatus* foi realizada através do ensaio colorimétrico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). O MTT é um teste muito utilizado que serve para quantificar espectrofotometricamente o crescimento celular, a viabilidade e proliferação, sendo também utilizado como indicador direto de citotoxicidade e apoptose (TUTIDA et al., 2006). O ensaio de MTT corresponde em medir a atividade da redutase mitocondrial em células vivas, ele se baseia na clivagem do sal amarelo tetrazólio (membrana permeável) para cristais de formazan azuis/ púrpura por células metabolicamente ativas, sendo a produção de formazan refletida no estado funcional da cadeia respiratória (BERRIDGE; TAN, 1993).

As quatro diferentes concentrações dos extratos dos exopolissacarídeos de *Pleurotus ostreatus* (APO) foram avaliadas quanto sua citotoxicidade em relação às Huh-7, e, tal como fizeram Reis et al. (2008), Lima-Júnior et al. (2013) e Mello et al., (2015), foram consideradas tóxicas aquelas concentrações que induziram nas linhagens de hepatócitos uma redução > 10% na produção da enzima formazan, comparado com o controle positivo (+) de viabilidade 100% (poços contendo apenas Huh-7 não tratadas com nenhuma das concentrações do extrato). Sendo assim, após uma cinética de 3 dias (24h, 48h e 72h) foram usadas todas as concentrações (75, 50, 10, 1,0 µg/mL) devido todas terem apresentado um resultado significativo no que diz respeito a viabilidade celular, ou seja, não foram consideradas citotóxicas (Figura 1 e Tabela 2).

Tabela 2. Citotoxicidade celular dos exopolissacarídeos de *Pleurotus ostreatus* (APO) em Huh-7 durante 24, 48 e 72 h. Nesta tabela estão os valores das percentagens dos ensaios de MTT mostrados nos gráficos abaixo acima. Foram consideradas citotóxicas as concentrações de APO que reduziram em mais de 10% a produção do formazan, comparado com o controle positivo.

	Controle +	Controle -	APO 1 µg/mL	APO 10 µg/mL	APO 50 µg/mL	APO 75 µg/mL
24 h (%)	100	0	94,95	104,24	114,98	117,52
48 h (%)	100	0	104,91	111,52	106,65	91,47
72 h (%)	100	0	108,05	117,34	98,00	98,81

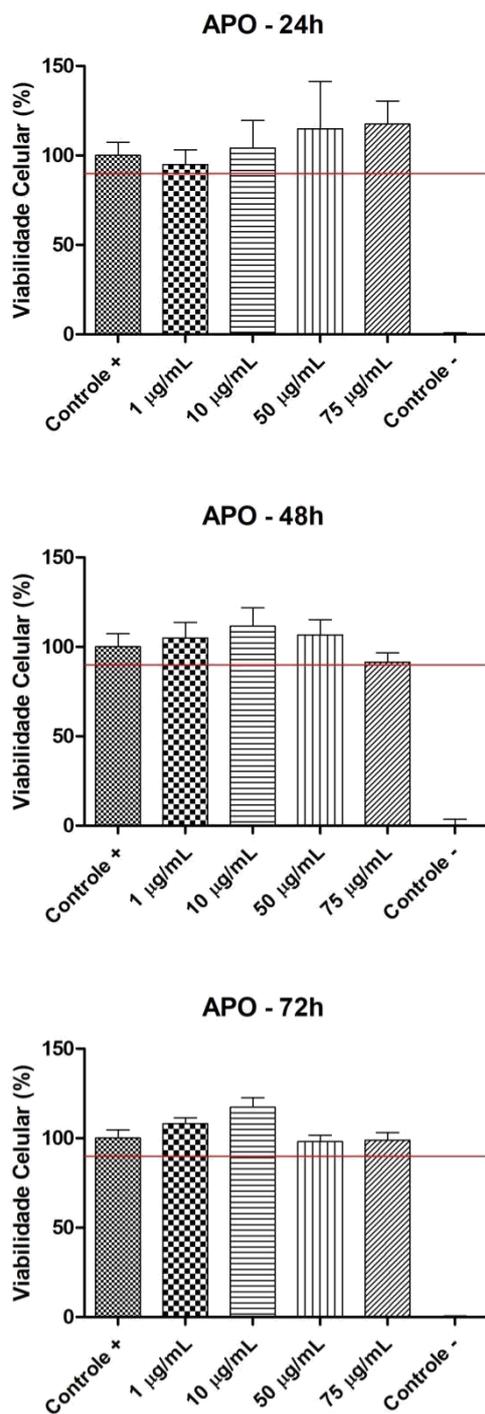


Figura 1. Avaliação da citotoxicidade dos exopolissacarídeos de *Pleurotus ostreatus* (APO) nas Huh-7 após 24h, 48 h e 72 h de tratamento. A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de MTT usando diferentes concentrações do extrato de APO. Os dados foram normalizados utilizando-se como referência o controle positivo de células sem o tratamento (100% viabilidade celular) e o controle negativo (poços que não continham células). Cada gráfico representa a média de 2 experimentos independentes em triplicata.

4.3 Avaliação da atividade antiviral

A NS1 é uma proteína não-estrutural presente no DENV que é secretada pela célula e, também, pode estar relacionada com a lise de células infectadas, mediada pelo sistema complemento (BARROS, 2007). A sua detecção comprova a infecção ocasionada pelo DENV na cultura celular. A detecção de NS1 nos sobrenadantes da cultura infectada foi progressiva ao longo dos períodos de incubação e ausente nos sobrenadantes de células controle (Figura 2), indicando assim a presença de replicação viral. As diferentes concentrações foram comparadas ao controle, o qual continha células não infectadas pelo DENV-2. No tempo de 24 horas a produção do antígeno viral NS1 foi mais baixa na concentração de 75µg/mL. Porém, ao comparar as diferentes concentrações aos controles de seus tempos correspondentes, 48 e 72 horas, pode-se verificar que não houve atividade antiviral, pois a dosagem do antígeno viral NS1 se encontra próximo ou acima dos poços com as células infectadas (DENV-2).

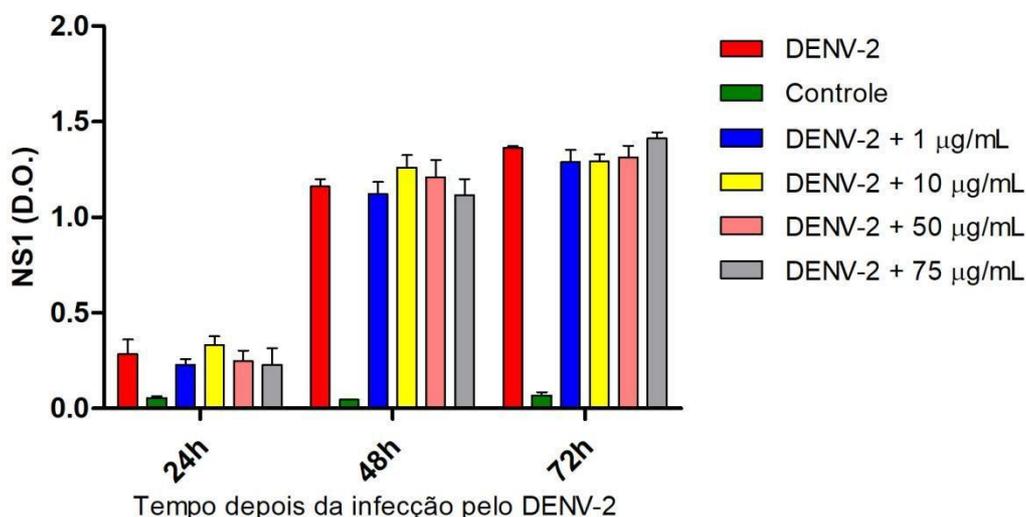


Figura 2. Avaliação da atividade antiviral dos exopolissacarídeos de *Pleurotus ostreatus* (APO) em Huh-7 infectadas pelo DENV-2 realizada pela dosagem do antígeno viral NS1. As Huh-7 foram infectadas com DENV-2 e depois tratadas com diferentes concentrações de APO durante 24 h a 72 h. A atividade antiviral foi determinada pela quantificação do antígeno NS1, por ELISA, no sobrenadante das Huh-7 infectadas. DO = densidade óptica em 630 nm. O gráfico representa 1 experimento em triplicata.

4.4 Avaliação da atividade imonomoduladora

As citocinas são mediadores necessários para conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão. Porém, a produção exagerada de citocinas a partir da lesão pode manifestar-se de forma sistêmica com levando a distúrbios metabólicos (OLIVEIRA et al., 2011). As citocinas podem ser liberadas diretamente por monócitos e macrófagos durante a infecção pelo vírus Dengue como resultado da infecção ou após interações entre células imunes e infectadas, ou ambas. Tais células possui a capacidade de induzir extravasamento de plasma, aumento de IFN- γ , IL-2 em casos de dengue hemorrágica. Esses fatores estão envolvidos no desencadeamento das síndromes hemorrágicas pelo DENV (CRUZ, 2005).

Os pacientes diagnosticados com a forma grave da dengue apresentam altos níveis de citocinas, como a IL-8, em relação aqueles com sintomas de dengue clássica ou moderada. A principal ação da IL-8 é proporcionar alto estímulo migratório para as células do sistema imune, principalmente neutrófilos, determinando ainda um aumento da expressão de moléculas de adesão por células endoteliais (VARELALL; FORTE, 2001). Dessa forma, a IL-8 tem sido implicada no aumento da permeabilidade vascular e no choque durante as infecções da dengue (MUSTAFA; ELBISHBISHI et al., 2001).

A dosagem da citocina IL-8 no sobrenadante de células Huh-7 infectadas pelo DENV-2 foi realizada através de ELISA padrão durante uma cinética de 3 dias (24h, 48h e 72h). Para tanto, alguns poços foram tratados e outros não com diferentes concentrações dos exopolissacarídeos de *Pleurotus ostreatus* (APO).

Observamos que na cinética de 24 horas todas as concentrações apresentaram uma redução de secreção de IL-8. Porém, a concentração de 1 μ g/mL foi a que reduziu mais expressivamente a secreção IL-8 pela célula neste período (Figura 3). Certamente isso não corresponde à realidade, pois foi observada uma superprodução de IL-8 nos poços do controle positivo (os quais continham o vírus, DENV-2) da cinética de 24h, sendo bem maior que os controles positivos de 48h e 72h. Durante a cinética espera-se que a IL-8 seja produzida de forma cumulativa no sobrenadante, ou seja, esperava-se que nos poços de 48h e 72h a produção desta citocina fosse maior e crescente, fato que ocorreu somente na concentração de 1 μ g/mL. Provavelmente, para as outras concentrações ocorreu um erro de leitura dos poços, o que até então não pôde ser comprovado devido falta de recurso e tempo.

Em 48 e 72h, as concentrações de 10 μ g/mL foram capazes de reduzir a produção de IL-8, de forma significativa. Pôde-se ainda observar que no tempo de 72 horas não foi

expresso o resultado para a concentração de 75 $\mu\text{g/mL}$, isso se deu devido os valores ficarem acima da curva padrão, não sendo possível utilizá-lo em comparação com os demais.

Ao observar a cinética de 48 horas, o poço controle se encontra acima do padrão quantitativo dos poços que contém o DENV-2, no entanto, no controle não há a presença do vírus e assim, esperava-se que não produzisse tanto IL-8. De acordo com Mello (2015), isso pode ser explicado devido às células Huh-7 possuírem uma produção basal de IL-8 em torno de 1000 $\mu\text{g/mL}$, o que pode ser verificado no gráfico.

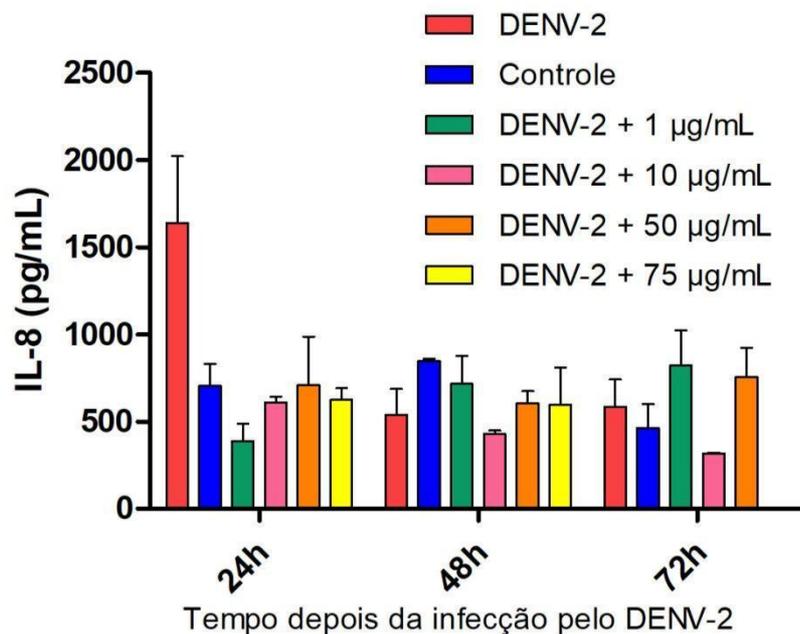


Figura 3. Efeito modulador dos exopolissacarídeos de *Pleurotus ostreatus* (APO) sobre a produção de IL-8 em Huh-7 infectadas pelo DENV-2. As Huh-7 foram infectadas com DENV-2 e depois tratadas com diferentes concentrações da APO durante 24 h a 72 h. A quantificação da IL-8 foi realizada por ELISA no sobrenadante de Huh-7 infectadas. O gráfico representa 1 experimento em triplicata.

5 Conclusão

Através do teste de MTT verificou-se que as diferentes concentrações 75, 50, 10, 1 µg/mL apresentaram eficácia em relação a viabilidade celular dos hepatócitos humanos (Huh-7). E dessa forma, todas as concentrações foram utilizadas nas atividades antiviral e imunomoduladora.

Diante dos resultados obtidos no ensaio antiviral, não foi observada atividade do APO pela quantificação relativa de antígeno NS1, realizada pelo ELISA, no sobrenadante das Huh-7 infectadas.

Para o teste imunomodulador, pôde-se verificar uma redução mais expressiva de secreção IL-8 pela célula na cinética de 24 horas na concentração de 1µg/mL. Verificou-se também que nas três cinéticas as concentrações de 10µg/mL foram capazes de reduzir a produção de IL-8, de forma significativa. No entanto, os resultados obtidos não são conclusivos para atividade imunomodulada, visto que são necessários no mínimo dois testes para que se tenha uma confirmação.

Como foi visto na literatura, *P. ostreatus* possui atividade biológica comprovada e para confirmar a possível atividade antiviral e imunomoduladora dessa espécie são necessários mais testes. Os resultados aqui obtidos abrem perspectivas para que outros estudos sejam realizados, pois se sabe que ainda há mais o que descobrir sobre seus compostos com efeitos farmacológicos.

6 Referências

ANDERSON, R. Manipulation of cell surface macromolecules by flaviviruses. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 229-274, 2003.

BASU A, CHATURVEDI UC. **Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses**. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 53, 287-299. 2008.

BARROS, M.C.E.S. **Expressão de proteínas do vírus da dengue em células de inseto utilizando o Sistema Baculovírus de Expressão**. Universidade de Brasília. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2017. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2017.

Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 33, Boletim Epidemiológico, v. 48, nº 27. 2017.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S. **Characterization of the cellular reduction of (3(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) – Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction**. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 303, n. 2, p. 474-482. 1993.

BONATTI, M.; KARNOPP, P.; SOARES, H. M., FURLAN, S. A. **Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes**. Food Chemistry, v.88, p.425-428, 2004.

BUTTHEP, P., CHUNHAKAN, S., YOKSAN, S., TANGNARARATCHAKIT, K., CHUANSUMRIT, A., Alteration of cytokines and chemokines during febrile episodes associated with endothelial cell damage and plasma leakage in dengue hemorrhagic Fever. **The Pediatric infectious disease journal**. (31) 232-238, 2012.

CEBALLOS-OLVERA I, CHAVEZ-SALINAS S, MEDINA F, LUDERT JE, DEL ANGEL RM. JNK phosphorylation, induced during dengue virus infection, is important for viral infection and requires the presence of cholesterol. **Virology**. 396(1):30-6, 2010.

COHEN, R.; PERSKY, L.; HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.58, p.582-594, 2002.

CRUZ, A. C. R. **Caracterização molecular e biológica do vírus dengue circulante no Brasil; Molecular and biological characterization of dengue virus circulating in Brazil.** Dissertação (doutorado) Biologia Parasitária. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2005.

CUTLER, S.J.C; HORACE, G. **Biologically active natural products: pharmaceuticals.** In: Stephen J. 2000.

DALRYMPLE NA, MACKOW ER. Roles for endothelial cells in dengue virus infection. **Advances in Virology**. 2012.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.** Caxias do Sul, RS: EDUCS, 2004.

FACCIN , L.C. BENATI, F. RINCÃO, V. P. MANTOVANI, M.S. SOARES , S.A. GONZAGA , M.L., NOZAWA, C. CARVALHO LINHARES , R.E. Antiviral activity of aqueous and ethanol extracts and of an isolated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* against poliovirus type 1. **Journal compilation.** The Society for Applied Microbiology. 24–28, 2007.

FRANCA, R. F.; ZUCOLOTO, S.; da FONSECA, B. A. A BALB/c mouse model shows that liver involvement in dengue disease is immune-mediated. **Experimental and molecular pathology**;89(3):321-6, 2010.

GREEN, S.; ROTHMAN, A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. **Current Opinion in Infectious Diseases**; 19:429-436, 2006.

GUBLER, D. J. **Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status.** Novartis Found Symp, v. 277, p. 3-16; discussion 16-22, 71-13, 251-253, 2006.

HASAN, S; JAMDAR, S. F; ALALOWI M; Al Beaiji, S.M.A. Dengue virus: A global human threat: Review of literature. **Journal Int Soc Prevent Communit Dent**;6:1-6. 2016.

JAYAKUMAR, J; RAMESH, E.; GERALDINE, P. Antioxidant activity of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on CCL4-induced liver injury in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 44, p. 1989-1996, 2006.

JESSIE, K.; FONG, M. Y.; DEVI, S. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. **Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 8, p. 1411-1418, 2004.

KIRSCH, L.S. et al. The influence of different submerged cultivation conditions on mycelial biomass and protease production by *Lentinus citrinus* Walley et Rammeloo DPUA 1535 (Agaricomycetidae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 13, n. 2, 2011

KIRSCH, et al. Production of mycelial biomass by the Amazonian edible mushroom *Pleurotus albidus*. **Brazilian journal of microbiology**. 2016.

LEE, J-S; MOGASALE, V; LIM, J.K; CARABALI, M; SIRIVICHAYAKUL, C; ANH, D.D; et al. A Multi-country Study of the Household Willingness-to-Pay for Dengue Vaccines: Household Surveys in Vietnam, Thailand, and Colombia. **PLOS Neglected Tropical Diseases**: 10.1371. 2015.

LINDEQUIST, U., NIEDERMEYER, T.H.J. JUNG, W.D. The Pharmacological Potential of Mushrooms. **Evid Based Complement Alternat Med** 2, 285–299, 2005.

LIMA-JUNIOR, R.S. **Efeito antiviral, imunomodulador e atenuante da permeabilidade endotelial de uma fração alcaloide de *Uncaria tomentosa* em células infectadas pelo DENV-2**. Tese de Doutorado, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 117 pp. 2013.

LIMA-JÚNIOR, R.S; MELLO, C.S.; SIANI, A.C.; VALENTE, L.M.M.; KUBELKA, C.F. ***Uncaria tomentosa* alkaloidal fraction reduces paracellular permeability, IL-8 and NS1 production on human microvascular endothelial cells infected with dengue virus**. Natural Product Communications, 8, 1547-1550. 2013.

LUDERT JE, MOSSO C, CEBALLOS-OLVERA I, DEL ANGEL RM. Use of a commercial enzyme immunoassay to monitor dengue virus replication in cultured cells. **Virology journal**.;5:51. 2008.

MAZIERO, R. **Produção de exopolissacarídeos por basidiomicetos em cultura submersa: screening, caracterização química preliminar e estudo de produção utilizando *Irpex lacteus* (Fr.:Fr) Fr.**. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 181p. 1996.

MELLO, C. S. **Atividade antiviral e imunomoduladora de extratos originados de *Uncaria* sp. em infecção in vitro de linhagem contínua de hepatócitos humanos pelo vírus Dengue.** Dissertação Mestrado em Ciências). Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2015.

MOSMANN, T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological Methods**, 65, 55-63. 1983.

MUKHOPADHYAY S, KUHN RJ, ROSSMANN MG. A structural perspective of the *flavivirus* life cycle. **Nat Rev Microbiol**. 3(1):13-22. 2005.

MUSTAFA, A.; ELBISHBISHI, E.; AGARWAL, R. Elevated levels of interleukin-13 and IL-18 in patients with dengue hemorrhagic fever. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 229-233. 2001.

NEVES, J. C. S. **Caracterização estrutural dos polissacarídeos obtidos do basidioma de *Pleurotus ostreatus* variedade florida.** 2007. 57f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

NEWMAN, D.J; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of natural products**. 70(3):461-77. 2007.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. **Citocinas e Dor.** Ver. Bras. Anesthesiol, 61: 2: 255-265. 2011.

RAGHUPATHY, R. CHATURVEDI, U.C. AL-SAYER, H; ELBISHBISHI, E.A; AGARWAL, R; NAGAR, R; KAPOOR, S; MISRA, A. MATHUR, A. NUSRAT, H;

AZIZIEH, F; KHAN, M.A; MUSTAFA, A.S. Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. **Journal of medical virology**. 56(3):280-5. 1998.

RAGHUPATHY, R; CHATURVEDI, U.C; AL-SAYER, H; ELBISHBISHI, E.A; AGARWAL, R.;NAGAR, R, Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. **Journal of medical virology** ;56(3):280-5. 1998.

RANDIVE, S.D. **Cultivation and study of growth of oyster mushroom on different agricultural waste substrate and its nutrient analysis**. Advances in Applied Science Research, v.3, p.1938-1949, 2012.

REIS, S. R.; VALENTE, L. M.; SAMPAIO, A. L.; SIANI, A. C.; GANDINI, M. AZEREDO, E. L.; D'AVILA, L. A.; MAZZEI, J. L.; HENRIQUES, M.; KUBELKA, C. F.. **Immunomodulating and antiviral activities of *Uncaria tomentosa* on human monocytes infected with Dengue Virus-2**. International immunopharmacology, 8, 468-476. 2008.

ROBERT, A. Manipulation of cell surface macromolecules by flaviviruses. **Advances in virus research**.;59:229-74. 2003.

ROBERTSON, M. J. **Role of chemokines in the biology of natural killer cells**. J Leukoc. Biol. Rev.; 71: 173-183. 2002.

SANTOS, N.S.O, ROMANOS, M.T.V, WIGG M.D. **Introdução à virologia humana**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 532 p. 2008.

SHAH, I. Dengue and liver disease. **Scandinavian journal of infectious diseases**. 40(11-12):993-4. 2008.

SILVA, R.R. COELHO, G.D. **Fungos principais grupos e aplicações biotecnológicas**. Instituto de botânica – Ibt. São Paulo, 2006.

SILVA, F.G, SILVA, S.J.S; ROCCO I.M; SILVEIRA V.R; SUZUKI A, KATZ G, et al. **Avaliação de kits comerciais para detecção de antígenos NS1-dengue** – São Paulo. Bepa.;8(91):14-26. 2011.

SIMMONS, C.P; FARRAR, J.J; NGUYEN, V; WILLS B. Dengue. **The New England journal of medicine**.366(15):1423-32. 2012.

SRIKIATKHACHORN A. **Plasma leakage in dengue haemorrhagic fever.** Thrombosis and haemostasis.;102(6):1042-9. 2009.

STURION, G. L.; RANZANI, M. R. T. C. **Composição em minerais de cogumelos comestíveis cultivados no Brasil – *Pleurotus* spp. e outras espécies desidratadas.** Archivos Latinoamericanos de Nutrición, Caracas, v. 50, n. 1, p. 102-108, 2000.

SUTHERLAND, I. W. **Extracellular polysaccharides.** In: Rhem HJ, Reed G, editors. Biotechnology, v. 6, p. 615–57, 1996.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L. **Porque devemos, de novo, erradicar o *Aedes aegypti*.** Ciência & Saúde Coletiva, v.1, n.1, p.122-35, 2008.

TUTIDA, L. A.; PERES, L. A. B.; FAVERO, M. E.; DELFINO, V. D. A. **Padronização do MTT como um teste de viabilidade celular em fragmentos corticais de rins de ratos.** Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC - Florianópolis, SC. 2006.

VARELLAL, P. P. V.; FORTE, W. C. N. **Citocinas: revisão.** Rev. bras. alerg. imunopatol; 24(4):146-154. 2001.

WASSER, S.P. **Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides.** Appl microbiol Biotechnol, 60: 258-274, 2002.

WHO. World Health Organization. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control.** p. 3. 2009.

WHO. **Dengue and severe dengue.** 117. 2014.

WYSE, A. P.P; GEMAQUE, A.O; CHAMILCO, G. E. I. **Modelo Matemático da Transmissão de Dengue. Grupo de Biomatemática IMECC – UNICAMP,** 21: 153–162, 2011.