

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA

ESCOLA NORMAL SUPERIOR – ENS

LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARJORY MICHELY MARTINS DE SOUZA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS POSSÍVEIS EFEITOS ANTIVIRAL E  
IMUNOMODULADOR DE *Pleurotus eryngii* EM LINHAGEM DE HEPATÓCITOS  
INFECTADOS PELO DENV-2.

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

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA

ESCOLA NORMAL SUPERIOR – ENS

LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARJORY MICHELY MARTINS DE SOUZA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS POSSÍVEIS EFEITOS ANTIVIRAL E  
IMUNOMODULADOR DE *Pleurotus eryngii* EM LINHAGEM DE HEPATÓCITOS  
INFECTADOS PELO DENV-2.

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

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

## Ficha Catalográfica

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

Martins de Souza, Marjory Michely

M386a Avaliação *IN VITRO* dos possíveis efeitos antiviral e imunomodulador de *Pleurotus eryngii* em linhagem de hepatócitos infectados pelo Denv-2. / Marjory Michely Martins de Souza. 2017

34 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Dra. Larissa de Souza Kirsch

Coorientador: Dr. Raimundo Sousa Lima Junior

TCC de Graduação (Licenciatura Plena em Ciências Biológicas) - Universidade do Estado do Amazonas.

1. exopolissacarídeos. 2. IL8. 3. NS1. 4. citotoxicidade. 5. fungo. I. Kirsch, Larissa de Souza II. Universidade do Estado do Amazonas III. Título

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dra. Larissa de Souza Kirsch

---

Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen

---

Prof. Dra. Rosilene Gomes da Silva Ferreira

---

Prof. Dra. Ieda Hortêncio Batista (Suplente de Banca)

Á Deus em primeiro lugar e à minha família, em especial minha Filha Agnes Abigail Martins por ter renunciado tantas vezes minha presença para a conclusão do curso.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, por ter me presentear com o dom da vida, que me ajudou a superar cada momento difícil vivido nesses cinco anos, e em toda minha vida tem me dado força, saúde e vigor para continuar a caminhada.

A minha mãe Maria Zélia que me incentivou desde inscrição do vestibular até a conclusão do curso, meus irmãos e em especial minha filha por ter sido tão guerreira e esforçada quanto eu ao longo do curso e através de suas atitudes me amou, me encorajou e me apoiou, a amo incondicionalmente.

Ao meu namorado Alex Nascimento e sua família que apareceram em um momento único na minha vida me incentivando e me fazendo acreditar que em meio às dificuldades da vida, coisas boas acontecem e pessoas maravilhosas cruzam nosso caminho quando menos esperamos.

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, professores que ao longo desses cinco anos tornaram-se mais que mestres, tornaram-se amigos, em especial Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sônia Maciel, que para mim foi um canal de Deus para me direcionar espiritualmente e a todos meus amigos da minha igreja Comunidade Viva+; à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elizabeth Santos pela oportunidade de receber conselhos na minha vida pessoal quando mais precisei; à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Larissa de Souza Kirsch que além de Orientadora também foi uma amiga que nos momentos de desespero me acalmou e tranquilizou, dando sempre soluções as situações difíceis tanto no âmbito pessoal quanto profissional, bem como pelo apoio na elaboração deste trabalho; à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Astrid Liberato que coordenou o curso durante metade dele e ao Paulo Estevam pelos socorros e auxílios para com os alunos de Biologia, no início do curso e no final dele meu agradecimento á Gena Antony. Ao Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen e Escola Superior de Saúde da UEA – ESA, por disponibilizar os laboratórios de Biotecnologia para parte do projeto, bem como minha colega de turma Cleudiane Andrade por auxiliar nos procedimentos laboratoriais para execução de boa parte dos ensaios com fungos.

Ao meu professor e co-orientador Dr. Raimundo Sousa Lima Júnior 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.

A minha amiga que se tornou uma irmã ao longo desse tempo, Aldiane Passos de Oliveira, pela ajuda nos experimentos e companheirismo sempre em tudo.

Aos meus queridos amigos do curso que também me ajudaram nessa caminhada que estiveram juntos de mim e nos momentos desafiadores se fizeram presentes com conselhos e braços abertos para consolo. Obrigado pelo enorme companheirismo. Ao meu amigo de laboratório Carlos Eduardo Alves, por me socorrer sempre que precisei de auxílio, você foi demais querido! Obrigada.

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. Ao Dr. Carlos Cleomir por disponibilizar os equipamentos do seu laboratório para parte da pesquisa.

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

“Não haverá borboletas se a vida não passar por longas e silenciosas metamorfoses”

Rubem Alves



## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. <i>Pleurotus eryngii</i> .....   | 16 |
| Figura 2. Exopolissacarídeos diluído em diluente orgânico (DMSO).....  | 23 |
| Figura 3. Avaliação da citotoxicidade dos exopolissacarídeos de <i>Pleurotus eryngii</i> (MPE) nas Huh-7 após 24h, 48 h e 72 h de tratamento. ....                               | 24 |
| Figura 4. Avaliação da atividade antiviral dos exopolissacarídeos de <i>Pleurotus eryngii</i> em Huh-7 infectadas pelo DENV-2 realizada pela dosagem do antígeno viral NS1. .... | 26 |
| Figura 5. Efeito modulador dos exopolissacarídeos de <i>Pleurotus eryngii</i> (MPE) sobre a produção de IL-8 em Huh-7 infectadas pelo DENV-2. ....                               | 27 |
| Grafico 1: Representação das etapas da Metodologia. Fluxograma de processo ilustrando as etapas da metodologia .....   | 33 |

## RESUMO

A dengue é um grave problema de saúde pública, provocando altos índices de morbidade e mortalidade, gerando impactos econômicos na sociedade na tentativa de minimizar esses índices. O vírus tem como alvo algumas células do sistema imunológico como células dendríticas, macrófagos, monócitos, células endoteliais e hepatócitos também são atingidas. Não existe ainda nenhuma opção terapêutica eficaz para tratar e/ou atenuar os sintomas causados pelo dengue. Trabalhos científicos com fungos do gênero *Pleurotus* vêm demonstrando excelentes resultados terapêuticos como ações antivirais, antiartrítica e anticancerígena, utilizando os exopolissacarídeos (EPS) produzidos por eles. Desta forma o objetivo deste foi avaliar “in vitro” o possível efeito antiviral e imunomodulador de *Pleurotus eryngii* em linhagem de hepatócitos HUH- 7 infectados pelo vírus dengue. A pesquisa consistiu em duas etapas: na primeira foi realizado o cultivo do fungo por fermentação submersa para obter a biomassa micelial e o extrato bruto de onde foram extraídos os exopolissacarídeos. Na segunda etapa, o objetivo foi avaliar quais e quantas concentrações de EPS não eram tóxicas para célula para em seguida infectar as mesmas e tratá-las com as concentrações viáveis. Após esse tratamento foi medida a quantidade de IL8 para os resultados de imunomodulação, e medidas as dosagens NS1 com o intuito de evidenciar um possível efeito antiviral. A extração dos EPS foi realizada com sucesso a partir da fermentação submersa e todas as concentrações testadas foram viáveis à célula. Os ensaios antiviral e imunomodulador não demonstraram efeito antiviral e imunomodulador contra o vírus dengue e por ter sido feito apenas uma vez, não foram conclusivos, deverão ser repetidos pelos menos duas vezes para estarem estatisticamente confiável.

Palavras chave: exopolissacarídeos ; IL8; NS1; citotoxicidade; fungo

## ABSTRACT

Dengue is a serious public health problem, causing high rates of morbidity and mortality, generating economic impacts on society in an attempt to minimize these indices. The virus targets some cells of the immune system such as dendritic cells, macrophages, monocytes, endothelial cells and hepatocytes are also reached. There is still no effective therapeutic option to treat and / or alleviate the symptoms caused by dengue. Scientific studies with fungi of the *Pleurotus* genus have shown excellent therapeutic results as antiviral, antiarthritic and anticancer actions using the exopolysaccharides produced by them. Thus, the objective of this study was to evaluate in vitro the possible antiviral and immunomodulatory effect of *Pleurotus eryngii* in a strain of HUH-7 hepatocytes infected with dengue virus. The research consisted of two stages: in the first one the fungus was cultivated by submerged fermentation to obtain the mycelial biomass and the crude extract from which the exopolysaccharides were extracted. In the second step, the objective was to evaluate the concentrations of exopolysaccharides that were not toxic to the cell and then to infect them and to treat them with the viable concentrations. After this treatment the amount of IL8 was measured for the immunomodulation results, and the NS1 dosages were measured in order to evidence a possible antiviral effect. EPS extraction was successfully performed from submerged fermentation and all concentrations tested were viable to the cell. The antiviral and immunomodulatory assays did not demonstrate antiviral and immunomodulatory effect against dengue virus and because it was done only once, were not conclusive, should be repeated at least twice to be statistically reliable.

Key words: exopolysaccharides; IL8; NS1; fungus cytotoxicity;

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>  | <b>12</b> |
| <b>2. OBJETIVO GERAL</b>  | <b>17</b> |
| <b>3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>   | <b>17</b> |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>  | <b>18</b> |
| 4.1- Isolamento e Manutenção da cultura de <i>P. eryngii</i>                | 18        |
| 4.2 - Cultivo de <i>P. eryngii</i> por fermentação submersa                 | 18        |
| 4.3 - Avaliação da produção da biomassa micelial e exopolissacarídeos (EPS) | 18        |
| 4.4 - Extração e quantificação dos EPS                                      | 19        |
| 4.5 - Linhagens de Huh-7 e DENV-2   | 19        |
| 4.6 - Avaliações de viabilidade celular                                     | 19        |
| 4.7 - Infecção e tratamento das linhagens de Huh-7                          | 20        |
| 4.8 - Atividades Antiviral  | 20        |
| 4.9 – Atividade Imunomoduladora   | 21        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>  | <b>23</b> |
| 5.1 - Biomassa Micelial, extração e quantificação dos EPS                   | 23        |
| 5.2 - Avaliações de viabilidade celular                                     | 23        |
| 5.3 – Avaliação da Atividade Antiviral                                      | 25        |
| 5.4– Avaliação da atividade imunomoduladora                                 | 27        |
| <b>6. CONCLUSÃO</b>   | <b>29</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS</b>   | <b>30</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

O Dengue é uma das arboviroses mais comuns entre os seres humanos, transmitida pelo mosquito *Aedes*, cujas espécies de maior importância são *A. albopictus* e *Aedes aegypti*, sendo esta última a principal responsável pelas grandes epidemias. Ambas as espécies são encontradas nas áreas tropicais e subtropicais do mundo (GUBLER, 2006).

A estrutura do vírus Dengue é constituída por uma fita simples de RNA e possui quatro sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (SANTOS et al, 2008). No homem o vírus tem preferência por se replicar dentro de macrófagos, monócitos e células B, no entanto sabe-se também que ocorre infecção de mastócitos, células dendríticas e células endoteliais. O vírus pode infectar os leucócitos do sangue periférico, fígado, baço, linfonodos, medula óssea, coração, rins, estômago, pulmões (SUNIT et al, 2007). As principais células afetadas, segundo Dias (2010), são as de linhagem monocítica-macrofágica, pulmões e fígado.

A infecção por dengue pode ser assintomática ou causar doença cujo espectro inclui desde formas oligossintomáticas até quadros graves com choque com ou sem hemorragia, podendo evoluir para o óbito (BRASIL, 2017).

A forma grave acontece geralmente após reinfecções com dengue, mas pode acontecer após infecções primárias.

O extravasamento plasmático se dá pela liberação aumentada das citocinas, (moléculas proteicas, que enviam diversos sinais estimulatórios, modulatórios ou mesmo inibitórios para as diferentes células do sistema imunológico), que atuam em concentrações baixíssimas e sua síntese habitualmente ocorre após estimulação antígenica como resposta imune ao ataque viral (VARELLA; FORTE, 2001). Além disso, há evidências que mostram que as células endoteliais também sofrem apoptose, causando ruptura da barreira destas células e levando à síndrome de extravasamento vascular generalizado (SUNIT et al, 2007).

No Brasil, a dengue é considerada um dos principais problemas de saúde pública entre os anos de 2000 e 2016 foram registrados no Brasil 11.100,213 casos de dengue clássica, com destaque para o ano de 2015, onde foram notificados 1.688,688 casos da doença, em 2016 foram 1.500.535 casos (BRASIL, 2017).

Em um panorama atual, segundo dados do Boletim de epidemiologia até setembro de 2017 foram registrados 219.040 casos prováveis de dengue no país, sendo confirmados 184 casos de dengue grave e 1.913 casos de dengue com sinais de alarme, confirmados 88 óbitos (BRASIL, 2017).

Podem ocorrer morbidade e mortalidade significativas caso não houver identificação precoce e monitoramento das formas graves. A dengue é um grave problema de saúde pública mundial que causa elevados gastos por causa da falta temporária ao trabalho o que prejudica o desenvolvimento regional e nacional, sendo que não há medicação específica para combater o vírus Dengue (SUNIT et al, 2007).

Segundo Rocha e Tauil (2009) o único elo vulnerável para reduzir a sua transmissão é o mosquito *Aedes aegypti*, seu principal vetor. As dificuldades de combater este mosquito são muitas, pois há facilidades para sua proliferação e limitações para reduzir seus índices de infestação.

Segundo Oliveira et al. (2011) inúmeros esforços têm sido realizados na tentativa de avaliar atividade antiviral a partir de substâncias naturais, as quais poderiam ser isoladas para inibir a replicação viral. Nesse sentido, tais substâncias naturais poderiam ser oriundas de espécies de fungos. Os fungos, de um modo geral, além de participarem ativamente na área ambiental, como decompositores e bioindicadores (poluição do ar e/ou solo, por exemplo) possuem uma grande importância econômica, tanto no ramo alimentício como terapêutico. Os basidiomicetos, conhecidos popularmente como cogumelos, têm sido alvo de muitos estudos farmacológicos nos últimos anos, visto que suas ações terapêuticas já são, empiricamente, utilizadas e reconhecidas, há muito tempo, principalmente no Oriente (WASSER, 2002).

Segundo Rathee et al. (2012), houve um aumento recente do interesse em cogumelos não só como um alimento saudável, de elevado teor proteico, mas também como uma fonte de compostos biologicamente ativos de valor medicinal, com atividade anticancerígena, antiviral, hepatoprotetora, imunomoduladora e hipocolesterolêmica.

A morfologia dos cogumelos consiste basicamente em um emaranhado de hifas, que formam o micélio, que na reprodução sexuada origina os chamados basidiomas ou corpos de frutificação. A partir dessas estruturas podem ser obtidos extratos para estudos biomédicinas e afins, a exemplo dos polissacarídeos (BARBOSA et al, 2004).

Os polissacarídeos são macromoléculas naturais encontradas em todos os organismos vivos, constituindo um grupo de compostos dos mais abundantes e

importantes da biosfera, com ênfase nos exopolissacarídeos (EPS) que são definidos como polissacarídeos extracelulares, produzidos por alguns fungos e bactérias, os quais são encontrados ligados à superfície das células ou excretados para o meio (BARBOSA et al., 2004). Nos fungos, os EPS constituem uma importante percentagem da biomassa, participando em mais de 75% dos polissacarídeos constituintes da parede das hifas (GUTIÉRREZ; PIETRO; MARTINEZ, 1996).

Os EPS possuem aplicações nas indústrias de alimentos, farmacêutica e de cosméticos (ANDRADE et al., 2015). Muitos, se não todos cogumelos contêm polissacarídeos biologicamente ativos em basidiomas, micélio cultivado e caldo de cultura. Assim, é evidente que os cogumelos representam uma importante e ainda largamente inexplorada fonte de novos e poderosos produtos farmacêuticos (WASSER, 2002). Apesar de muitos cogumelos possuírem grande relevância clínica na medicina natural, poucas delas são estudadas e têm suas ações terapêuticas comprovadas cientificamente. Alguns exemplos de espécies mais estudadas, segundo Meletis e Barker (2005), são *Cordyceps sinensis*, conhecido como maitake; *Grifola frondosa* conhecido como reishi; *Ganoderma lucidum*; e *Coriolus versicolor* ou *Trametes versicolor*. Além das espécies referidas acima, outras se encontram relativamente bem estudadas, uma delas é o *Phellinus rimosus* (AJITH; JANARDHANAN, 2007).

As espécies *Pleurotus florida* e *Pleurotus pulmonaris* apresentam elevada atividade antioxidante e antitumoral quer por atividade anticarcinogênica quer por antimutagênica, no entanto menos estudadas. Os cogumelos do gênero *Pleurotus* apresentam essencialmente atividades antioxidantes (JAYAKUMAR et al., 2006). No estudo de Roupas et al. (2012) são evidenciados também os benefícios do gênero *Pleurotus* em diversas patologias, com ação anticarcinogênica no carcinoma do fígado, do pulmão e cervical. Apresenta também ação antiartrítica, ao nível ósseo evitando a perda de massa óssea, além de prevenir a formação de cataratas nos testes *in vivo*.

O gênero *Pleurotus* (Fr.) classificado no filo Basidiomycota, classe Basidiomycetes, Ordem Agaricales e família Pleurotaceae constitui um grupo de cogumelos cosmopolitas, comumente encontrado em regiões de clima temperado e tropical, cujas espécies são sapróbias, desenvolvendo-se em troncos de árvores em decomposição (COHEN et al, 2002; PUTZKE, 2004b). Segundo revisão de Putzke et al. (2002) ocorrem pelo menos 15 espécies do gênero *Pleurotus* consideradas nativas no Brasil. As espécies de *Pleurotus* compõem um grupo de cogumelos distribuído em

praticamente todo o mundo, sendo frequentemente encontrado nas matas brasileiras. Segundo Komura (2006) até a década de 70, o seu consumo era feito basicamente pela coleta destes cogumelos diretamente na natureza, a partir de então foi iniciado o cultivo em escala comercial. O aumento do consumo destes basidiomicetos se deve também, aos efeitos benéficos à saúde que têm sido difundidos na mídia, além disso, trabalhos científicos têm demonstrado a presença de carboidratos que podem levar a modificações de respostas biológicas, tais como, atividade antitumoral, imunomoduladora, hipoglicemiante, entre outras.

O gênero já citado acima tem se tornado muito interessante do ponto de vista comercial, não só pelas suas características organolépticas e nutricionais das espécies, mas também pela sua fácil adaptação e manutenção, crescimento rápido e relativo baixo custo de cultura (RAMOS et al., 2011), porém um dos maiores desafios é a conservação, por se tratar de um alimento perecível. Alguns pesquisadores realizaram um trabalho executando ensaios de produção de três espécies do gênero *Pleurotus*, cultivadas em palha de trigo, com a finalidade de determinar a espécie mais produtiva e avaliar a qualidade dos mesmos durante a conservação quando processados e embalados em atmosfera modificada (RAMOS et al., 2011). Segundo os autores os resultados permitiram concluir que a terceira espécie mais produtiva foi a *P. eryngii* e que demonstrou também maior resistência à degradação no período de conservação estabelecido.

Além da atividade antitumoral, imunomoduladora, hipoglicemiante, provenientes do gênero *Pleurotus* citadas acima, segundo KIM et al. (2006) observaram que o extrato do basidioma da espécie *Pleurotus eryngii* aumentava o metabolismo ósseo, estimulando a formação de osteoblastos em ratos com osteoporose, no entanto, os componentes que estariam atuando neste processo não foram ainda descritos. Apesar de não existirem trabalhos que evidenciem com mais ênfase atividades medicinais do *P. eryngii* o mesmo foi escolhido para o desenvolvimento desta pesquisa.





Fig 1: *Pleurotus eryngii*

Dessa maneira uma opção terapêutica almejada seria a evidenciação de medicamentos que possam intervir diretamente na multiplicação viral e/ou na resposta inflamatória, atenuando os sintomas clássicos, evitando a evolução das formas graves da dengue, minimizando assim o número de óbitos relacionados à doença. Com isso, neste projeto buscou-se estudar a espécie *Pleurotus eryngii* cujo gênero já possui muitas ações terapêuticas, demonstrando grande importância medicinal.

## 2. OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* a possível atividade antiviral e/ou imunomoduladora de *Pleurotus eryngii* em linhagem de hepatócitos humanos (Huh-7) infectada pelo DENV-2.

## 3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Cultivar o micélio de *P. eryngii* em cultura submersa.

Extrair os exopolissacarídeos do caldo fermentativo, para avaliar a citotoxicidade do extrato de *P. eryngii* na cultura de hepatócitos (Huh-7);

Infectar a linhagem de Huh-7 com as alíquotas de DENV-2 e em seguida tratá-las com as concentrações de *P. eryngii* que foram viáveis a célula Huh-7.

Avaliar a atividade imunomoduladora dos polissacarídeos de *P. eryngii*, por meio de Ensaio Imunoenzimático (ELISA), com a finalidade de dosar a citocina IL-8 nos sobrenadantes das Huh-7 infectadas pelo DENV-2;

Avaliar a atividade antiviral de *P. eryngii* através da dosagem, por ELISA, do antígeno viral NS1 nos sobrenadantes de Huh-7 infectadas pelo DENV-2.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1- Isolamento e Manutenção da cultura de *P. eryngii*

Uma linhagem comercial de *P. eryngii* foi a espécie utilizada neste estudo. O isolamento foi realizado em 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).

### 4.2 - Cultivo de *P. eryngii* por fermentação submersa

Cultivo de *P. eryngii* foi realizado em frascos Erlenmeyer (125 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 ( $\varnothing = 1\text{cm}$ ) para serem 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. eryngii* por fermentação submersa

| Componentes                       | Quantidade |
|-----------------------------------|------------|
| Glicose                           | 40g/L      |
| Peptona                           | 1g/L       |
| Extrato de levedura               | 2g/L       |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>   | 1g/L       |
| MgSO <sub>4</sub>                 | 0,2g/L     |
| (NH) <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> | 0,2g/L     |
| Água destilada                    | 1000 mL    |
| pH                                | 6,0        |

### 4.3 - Avaliação da produção da biomassa micelial e exopolissacarídeos (EPS)

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., 2015). O meio líquido recuperado foi utilizado para avaliação da produção de EPS.

#### 4.4 - Extração e quantificação dos EPS

Com a finalidade de recuperar os EPS, foi concentrado o caldo fermentativo, adicionado etanol 3:1. Após a mistura foi colocado em um concentrador á vácuo e depois liofilizada. Esses dois equipamentos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Carlos Cleomir da Coordenação de pesquisas em produtos Naturais do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA.

#### 4.5 - Linhagens de Huh-7 e DENV-2

Todos os ensaios celulares foram realizados no Laboratório de Virologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. A linhagem de hepatocarcinoma humano (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 cm<sup>2</sup>) 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 CO<sub>2</sub> 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, onde era observada a formação de uma monocamada confluyente dos hepatócitos. Quando a monocamada estava confluyente, as células eram passadas para novos frascos de cultura (expansão celular) com auxílio de Tripsina-EDTA, seguido de centrifugação a 250 G por 7 minutos. Após a centrifugação, o *pellet* formado foi ressuspensão em meio fresco suplementado e depois transferido para novos frascos de 25 cm<sup>2</sup>. Quando necessário, para manter um estoque celular, as Huh-7 eram congeladas em criotubos contendo solução de DMSO a 10% numa temperatura inicial de -80°C (por 24h), e depois eram repassadas para contêineres contendo nitrogênio líquido.

#### 4.6 - Avaliações de viabilidade celular

Os EPS de *Pleurotus eryngii* foram avaliados quanto à sua citotoxicidade nas Huh-7 através de ensaios colorimétricos quantitativo MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-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 ao meio de cultura (DMEM, mais 10% SFB, 1% de antibiótico e antifúngico), numa concentração de 105 células por poço. As placas foram

armazenadas em estufa (37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>) por 48h, período necessário para formação da monocamada. Depois que a monocamada foi formada, o sobrenadante foi retirado e as células foram lavadas cuidadosamente com PBS para não remover a monocamada celular. Depois foi adicionado 200 µL de meio de cultura fresco com 2% de SFB em cada poço, sendo que em alguns poços as Huh-7 foram tratadas com diferentes concentrações dos polissacarídeos de *P. eryngii* (75 µg/ mL, 50 µg/ mL, 10 µg/mL e 1 µg/ mL).

Após os períodos de 24hs, 48hs e 72hs de tratamento, o possível efeito citotóxico das diferentes concentrações dos EPS de *P. eryngii* sobre a linhagem Huh-7 foi determinado utilizando método o MTT Molecular Probes cat. # M-6494), onde foram seguidas as recomendações do fabricante. As leituras das densidades ópticas de cada placa foram realizadas na leitora de ELISA Robonik (Robonik India PVT), nos comprimentos de onda de 540-570 nm.

#### **4.7 - Infecção e tratamento das linhagens de Huh-7**

Para os ensaios de infecção da linhagem de Huh-7 foi utilizada uma cepa asiática padrão universal (16681). Primeiramente, foram semeadas  $1 \times 10^5$  células por poço da placa de cultura de 24 poços, completando com meio de cultura DMEM-F12 até o volume final de 1000 µL por poço. As placas foram incubadas em estufa 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> 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% CO<sub>2</sub> por 2h. Posteriormente o sobrenadante foi retirado e adicionado 800 µL/poço de DMEM contendo 2% de SFB, sendo que alguns poços infectados foram tratados com diferentes concentrações dos MPE. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, sendo que a cada 24h, durante 3 dias, os sobrenadantes foram aliqüotados, etiquetados e armazenados em freezer - 80 °C para posterior dosagem do antígeno viral NS1 e da citocina IL-8.

#### **4.8 - Atividades Antiviral**

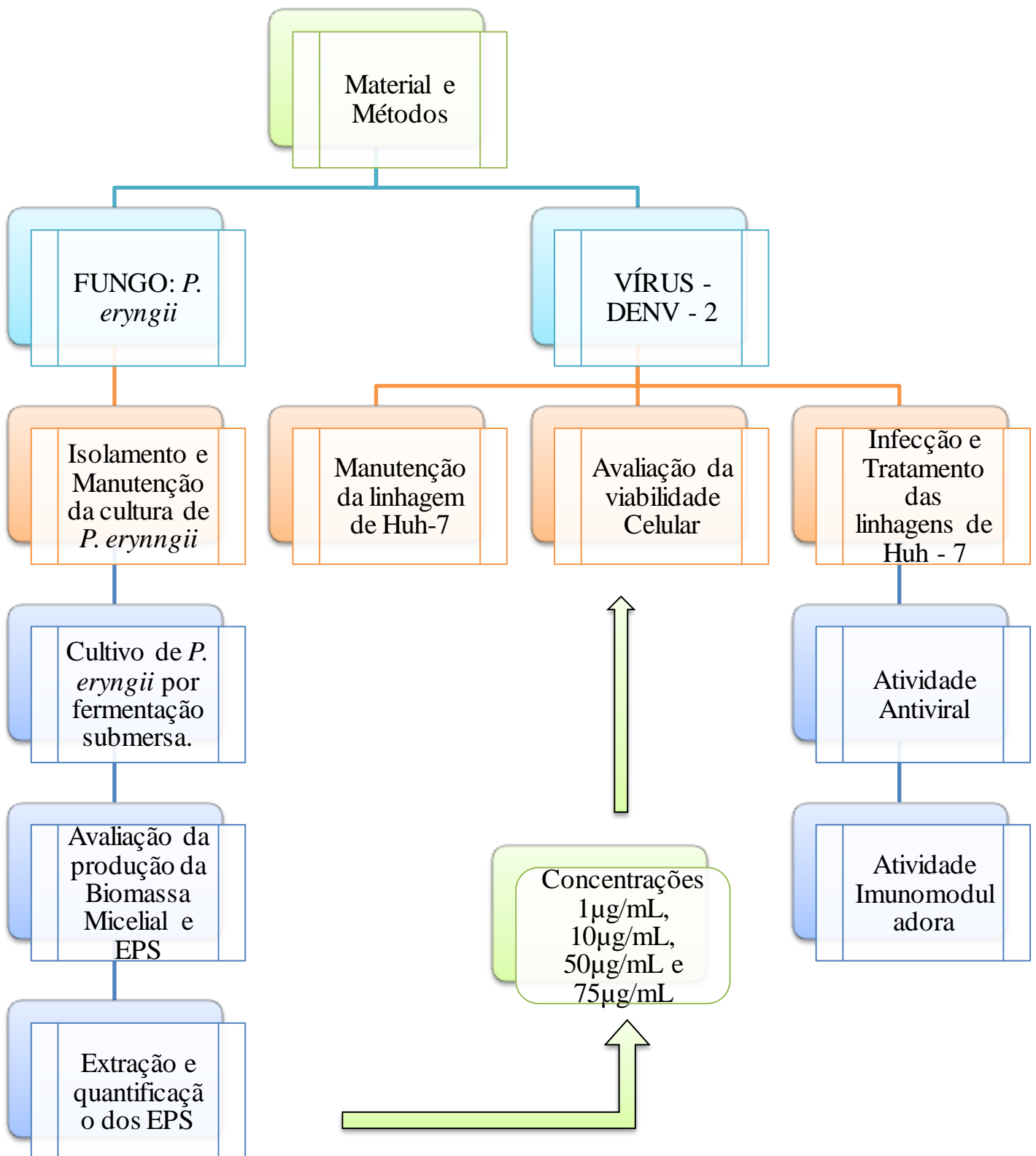
A possível atividade antiviral dos exopolissacarídeos de *P.eryngii* foi determinada usando o Kit de ELISA Platelia Dengue NS1 Ag (BioRad), que é um ensaio imunoenzimático rápido e confiável para a quantificação relativa de antígeno NS1 no soro de pacientes (SILVA et al., 2011) e no sobrenadante células em cultura (LUDERT et al., 2008; CEBALLOS-OLVERA et al., 2010). Para tanto, em cada poço

adicionou-se 50µL de solução Diluente, 50µL de amostra 1:40 ou controle, 100µL de Conjugado diluído, seguidamente, depois adesivou-se e incubou-se durante 90 minutos após esse período, lavou-se a placa 6 vezes. Preparou-se a solução TMB e foram distribuídos 160µL por poço incubou-se por mais 30 minutos em temperatura ambiente, e por fim adicionou-se por poço 100µL de solução de paragem (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N) para estancar a reação colorimétrica. Essa leitura foi realizada na leitora de ELISA Robonik (Robonik India PVT), nos comprimentos de onda recomendados.

#### **4.9 – Atividade Imunomoduladora**

A possível atividade imunomoduladora das diferentes concentrações dos exopolissacarídeos de *P. eryngii* (MPE) foi avaliada através da dosagem da citocina IL-8 sobrenadantes dos hepatócitos infectados, conforme descrito previamente (LIMA-JÚNIOR et al, 2013, MELLO et al., 2015). Vale ressaltar que essas citocinas foram escolhidas para a dosagem por apresentarem relação com os casos graves de dengue (CHEN et al, 2006; CHUANG et al., 2015). Para tanto, foi utilizado o kit de ELISA padrão para IL-8 humana (PeproTech cat. # 900-k18), em que foram seguidos estritamente as instruções dos fabricantes. Com isso, uma placa de 96 poços foi sensibilizada com anticorpo de captura (100 µL em cada poço), sendo que depois foi deixada incubando a 4 °C (Over-night). No dia seguinte, a placa foi lavada 4 vezes com solução de lavagem para, em seguida, ser acrescentado solução de bloqueio. A solução de bloqueio ficou agindo por 1h em temperatura ambiente (TA) e depois novamente a placa foi lavada 4 vezes. Depois as amostras e IL-8 da curva padrão foram distribuídas na placa, que depois foi deixada incubando em TA por 2h. Fez-se nova lavagem (quatro vezes) para depois acrescentar o anticorpo de detecção (100µL em cada poço). Depois de um período de 2h incubando em TA, a placa foi novamente lavada (quatro vezes) para depois ser acrescentado estreptavidina peroxidase em cada poço. Depois de 30 minutos incubando em TA, a placa foi lavada (4 vezes) e depois acrescentado o substrato TMB. Este substrato ficou agindo por 20 minutos, onde imediatamente depois foi acrescentado a solução de paragem (HCl 1M). As leituras das densidades ópticas foi realizada na leitora de ELISA Robonik (Robonik India PVT), nos comprimentos de onda recomendados.

Abaixo o gráfico 1 demonstra em forma de fluxograma as etapas da metodologia para melhor visualização dos processos da pesquisa.



**Gráfico 1: Representação das etapas da Metodologia.** Fluxograma de processo ilustrando as etapas da metodologia.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 - Biomassa Micelial, extração e quantificação dos EPS

Ao término do processo fermentativo a biomassa micelial de *P. eryngii* foi de 9,36g/L e o EPS adquirido foi diluído em 100% de diluente orgânico (DMSO) para obtenção de alíquotas de todas as concentrações (100 µg/mL, 75 µg/mL, 50 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL e 0,1 µg/mL) previamente definidas na metodologia deste.

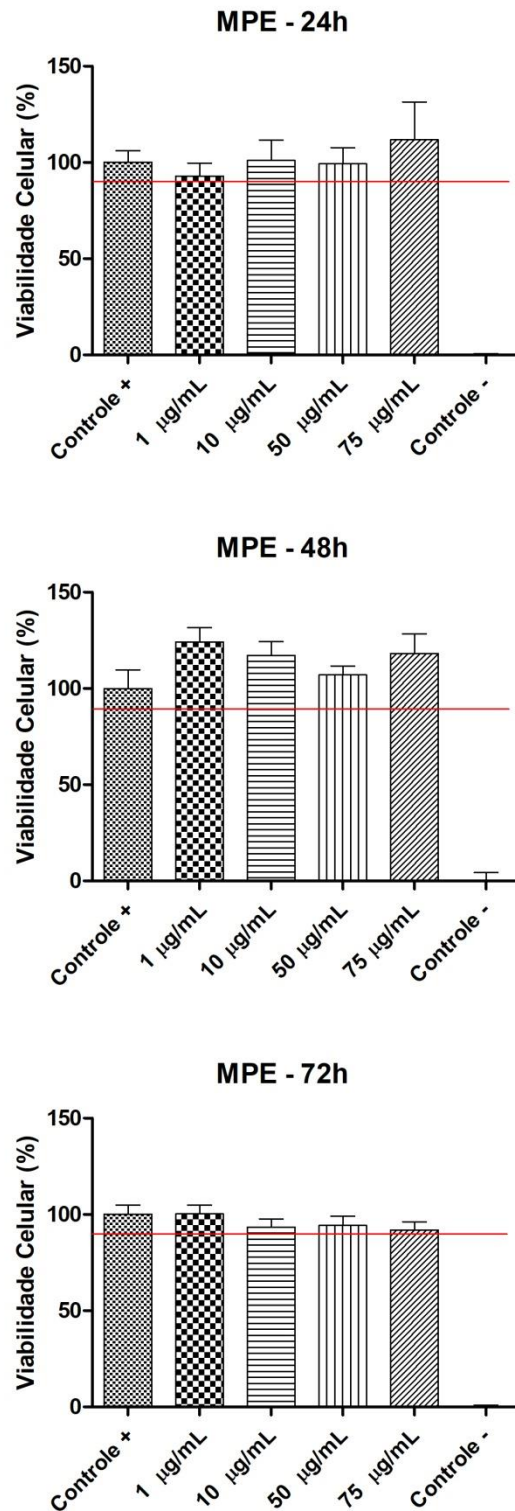


Fig. 2 – EPS diluído em 3mL DMSO

### 5.2 - Avaliações de viabilidade celular

A viabilidade celular das 4 concentrações foram avaliadas por meio do ensaio colorimétrico quantitativo MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)diphenyl tetrazolium bromide) (MOSMANN, 1983), sendo comparadas com controle positivo e negativo, o controle positivo refere-se aos poços contendo Huh-7 (sem tratamento) e o controle negativo continha somente meio (sem células) . Após 24 h, 48 h e 72 h de tratamento os resultados foram expressos na Figura 3 e Tabela 2:





**Figura 3. Avaliação da citotoxicidade dos exopolissacarídeos de *Pleurotus eryngii* (MPE) 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 MPE. 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.

A linha vermelha indica uma Redução > 10% na produção de Cristais de Formazan comparado com o controle + (REIS et al., 2008; LIMA-JÚNIOR et al., 2013; MELLO et al., 2017). Controle positivo (+) são os poços contendo células, porém não tratadas com MPE (Viabilidade de 100%) o controle negativo (-) são os poços que não continham células.

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

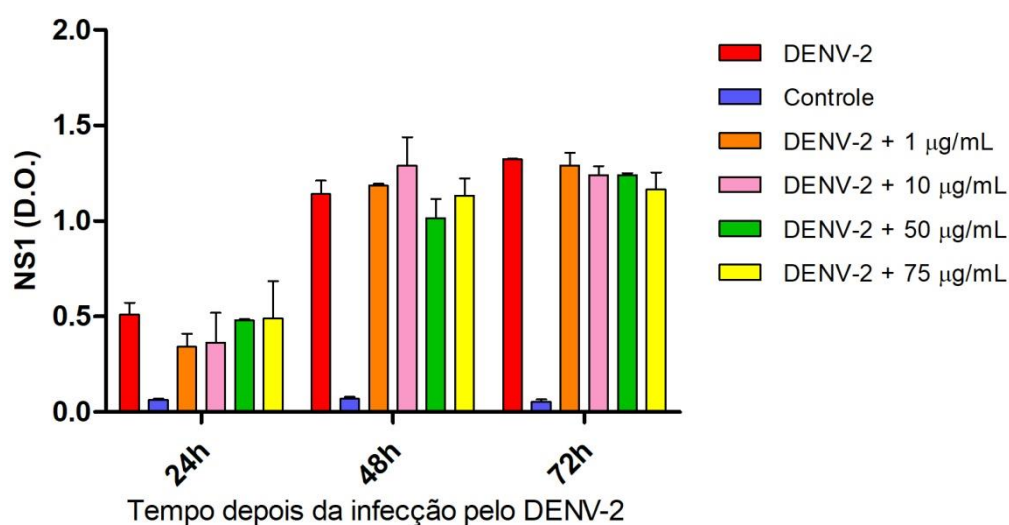
|          | Controle + | Controle - | MPE<br>1 µg/mL | MPE<br>10 µg/mL | MPE<br>50 µg/mL | MPE<br>75 µg/mL |
|----------|------------|------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 24 h (%) | 100        | 0          | 92,92          | 101,09          | 99,35           | 111,87          |
| 48 h (%) | 100        | 0          | 124,20         | 117,12          | 107,11          | 118,13          |
| 72 h (%) | 100        | 0          | 100,28         | 93,47           | 94,26           | 91,93           |

Portanto todas as concentrações mostram-se viáveis a célula, visto que estiveram em valores acima dos 90% de viabilidade, ou seja, estiveram dentro da redução permitida de > 10% da produção de Cristais de Formazan.

### 5.3 – Avaliação da Atividade Antiviral

A NS1 trata-se de uma proteína não estrutural do vírus dengue, porém ajuda na formação de seu capsídeo infectante. Portanto, quanto maior a concentração de NS1 no sobrenadante, maior será o grau de infecção pelo DENV-2, ou seja, sua dosagem no soro ou no sobrenadante relaciona-se diretamente com a taxa de infecção celular (LUDERT et al., 2008).

Os valores obtidos das densidades ópticas gerou um gráfico expresso na figura 4 que nos permite analisar a atividade antiviral nos três dias da cinética (24h, 48h e 72h).



**Figura 4. Avaliação da atividade antiviral dos exopolissacarídeos de *Pleurotus eryngii* (MPE) 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 MPE 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.

As concentrações de 1µg/mL e 10µg/mL tiveram uma pequena redução de NS1 em dois dias da cinética, 24hs e 72hs e em destaque as concentrações de 50µg/mL e 75µg/mL apresentaram redução nos três dias (24h, 48h e 72h). Mas apesar desse destaque esse resultado não pode ser considerado estatisticamente significativo, por ter sido realizado apenas uma vez.

Portanto, apesar de ter apresentado redução na dosagem de NS1 não podemos relatar efeito antiviral estatisticamente comprovado, até mesmo porque foi realizado somente um experimento. Seriam necessários, no mínimo, mais dois experimentos.

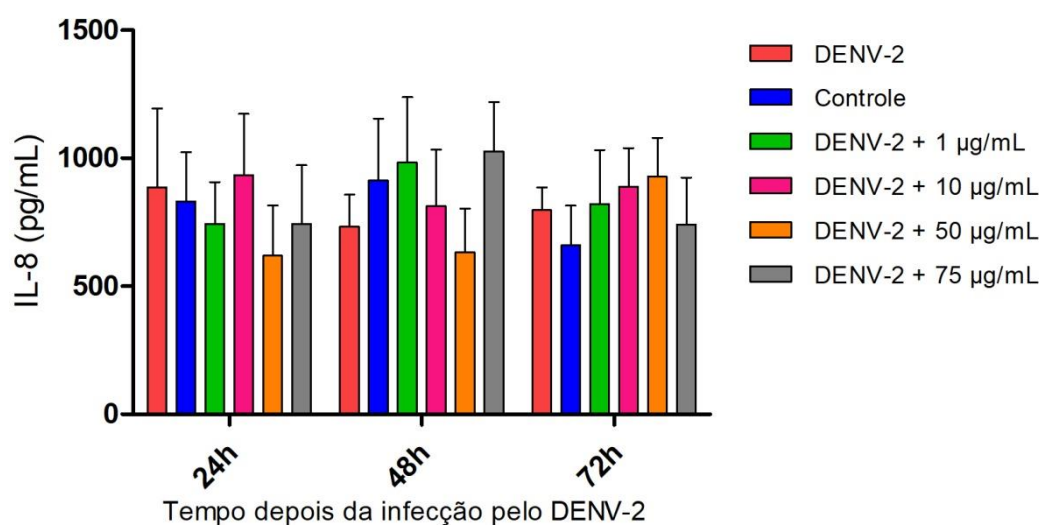
Apesar de não ter evidenciado efeito antiviral nesses ensaios, os experimentos feitos com extratos obtidos de fungos basidiomicetos, em muitos casos mostraram atividade antiviral, um dos exemplo podemos citar contra o vírus influenza A, *in vitro* e *in vivo* (Kabanov et al., 2011). Embora não tenham trabalhos mostrando atividade antiviral de fungos especificamente contra o vírus da dengue, algumas plantas ao redor do mundo apresentam potencial de atividade antiviral contra o DENV (Kadir et al., 2013), com destaque para os trabalhos com *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis* (LIMA-JÚNIOR et al., 2013; MELLO et al., 2017). O que pode também explorar um grande universo de fungos endofíticos que são os fungos que se associam as plantas sem lhe causar dano algum, estudos revelam que esses também possuem atividade

anticancerígena, antioxidante, antimicrobiana e antiviral (SILVA, 2014). Liu et al. (2004) confirmaram a atividade antiviral de um cogumelo, contra HSV-1 e HSV-2, em células Vero.

#### **5.4– Avaliação da atividade imunomoduladora**

As citocinas são mediadores necessários para conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão. No entanto, a produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias a partir da lesão pode manifestar-se sistemicamente com instabilidade hemodinâmica ou distúrbios metabólicos (Oliveira et al., 2011). Segundo Varella (2001), são moléculas protéicas ,glicosiladas ou não, que enviam diversos sinais estimulatórios, modulatórios ou mesmo inibitórios para as diferentes células do sistema imunológico, sua síntese habitualmente ocorre após estimulação antigênica. Segundo Talavera et al.(2004) e Brasier et al.,(2012) a IL-8 é uma das citocinas encontradas em níveis altos nos pacientes diagnosticados com dengue hemorrágica. A sua principal ação é o grande estímulo migratório para as células do sistema imune, principalmente neutrófilos, determinando ainda um aumento da expressão de moléculas de adesão por células endoteliais (VARELLA, 2001).

A dosagem da citocina IL-8 foi realizada por meio de ELISA durante três dias de cinética (24h, 48h e 72h). As concentrações de 1µg/mL, 50µg/mL e 75µg/mL se destacaram por apresentarem redução nos níveis de IL-8 na cinética de 24hs. Em 48hs foi observado que a concentração de 50µg/mL que demonstrou uma pequena redução, sendo que em 72h observamos a redução somente para a concentração de 75µg/mL (Figura 5).



**Figura 5. Efeito modulador dos exopolissacarídeos de *Pleurotus eryngii* (MPE) 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 MPE 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.

Um ponto importante a ser observado é que os poços controle se encontram no mesmo padrão quantitativo dos poços contendo apenas o vírus DENV-2 nas cinéticas de 24h e 72h, sendo que na cinética de 48h está em nível maior o que deveria ser ao contrário já que o controle não possui vírus, não tendo que produzir tanto IL-8 comparado aos poços infectados DENV-2, isso pode ser explicado devido à produção basal normal das células se encontrarem no limiar em torno de 1000pg/mL, corroborando com o observado recentemente por pesquisadores da FIOCRUZ (MELLO et al., 2017).

## 6. CONCLUSÃO

A extração dos EPS foi realizada com sucesso, a partir do cultivo do micélio de *P. eryngii*.

Após a infecção da linhagem das células do hepatócito humano Huh-7 com as alíquotas de DENV-2 pôde-se concluir que as concentrações 1µg/mL, 10µg/mL, 50µg/mL e 75µg/mL dos EPS de *P. eryngii*, através do teste de MTT, foram viáveis às células do hepatócito humano (Huh-7), ou seja, não possuem toxicidade para as mesmas.

Os ensaios antivirais e imunomodulador deverão ser repetidos pelos menos duas vezes para estarem estatisticamente confiável não demonstrando, nos ensaios realizados, efeito antiviral e imunomodulador contra o vírus dengue, ou seja, não foram conclusivos, devido ter sido feito apenas um teste para cada atividade. Porém novos testes serão realizados para definir estatisticamente os resultados.

Já em relação ao fungo estudado a revisão bibliográfica foi assertiva em comprovar que há um vasto universo de produtos biológicos bem como substâncias extraídas dos mesmos que está sendo estudada e testada cientificamente e na verdade já é utilizada empiricamente no mundo todo há muitos anos.

Portanto, este trabalho abriu portas para futuras pesquisas com a espécie de fungo estudada.

## 7. REFERÊNCIAS

ALVES, C.E.C. **Avaliação do efeito imunomodulador de espécies vegetais da família Lauraceae e Myristicaceae em modelo “in vitro” de infecção em linhagem de hepatócitos Huh-7 pelo vírus Dengue-2**, com vista á sua disponibilização no acervo bibliográfico da Escola Normal Superior – UEA. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2015. [ orientador, Prof. Dr. Raimundo Sousa Lima Junior].

AJITH,T.A.; JANARDHANAN, K.K. – Indian Medicinal Mushrooms as a Source of Antioxidant and Antitumor Agents – **Journal of Clinical biochemistry and nutrition**; 40(3): 157-162, May, 2007.

ANDRADE, et al. **Produção de exopolissacarídeos utilizando fungos filamentosos**. Cad. Prospec., Salvador, v.8, n.2, p.311-318, Abr./Jun. 2015.

BARBOSA, et al. Produção e Aplicações de exopolissacarídeos fungicos. **Semina: Ciências Exatas e tecnológicas**, Londrina, v.25, n.1, p.29-42, jan./jun. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2017. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 35**, 2017. Boletim Epidemiológico, v. 48, nº 29.

BRASIL. Portal da Saúde, SUS – **Casos de dengue. Brasil, grandes Regiões e Unidades Federativas. 1990 a 2016**.

BRASIL. Portal da Saúde, SUS - **Orientações Gerais prevenção e combate**. Acesso em 16/04/2016 - <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/perguntas-e-respostas-dengue>.

BRASIER, A.R. , JU H., GARCIA J., SPRATT, H.M., VICTOR, S.S, FORSHEY, B.M., et al. A three-component biomarker panel for prediction of dengue hemorrhagic fever. **The American journal of tropical medicine and hygiene**. 2012;86(2):341-8.

BUTTHEP, P., CHUNHAKAN , S., YOKSAN, S., TANGNARARATCHAKIT , K., CHUANSUMRIT , A., 2012. 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

CEBALLOS-OLVERA I, et.al. **JNK phosphorylation, induced during dengue virus infection, is important for viral infection and requires the presence of cholesterol**. **Virology**. 2010;396(1):30-6.

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

CHEN, L.C.; LEI, H.Y.; LIU, C.C.; SHIESH, S.C.; CHEN, S.H.; LIU, H.S.; LIN, Y.S.; WANG, S.T.; SHYU, H.W.; YEH, T.M. 2006. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, 74, 142-147.

CHUANG, Y.C. CHEN, H.R. YEN, T.M. **Pathogenic Roles of Macrophage Migration Inhibitory Factor during Dengue Virus Infection** Hindawi Publishing Corporation, Taiwan, 2015.

DIAS, L. B. A.; ALMEIDA, S. C. L.; HAES, T. M.; MOTA, L. M.; JARBAS, RORIZ-FILHO, J. S. **Dengue: transmissão, aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento**. Medicina (Ribeirão Preto), 2010 43(2): 143-52.

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

GUTIÉRREZ, A.; PIETRO, A.; MARTÍNEZ, A. T. **Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus***. *Carbohydrate Research*, Kidlington, v.281, p.143-154, 1996.

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.

KABANOV, A. S., et al. **Study of antiviral activity of extracts obtained from basidial fungi against influenza viruses of different subtypes in experiments in vitro and in vivo**. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2011; (1):40-3.

KADIR, S. L.; YAAKOB, H.; MOHAMED, Z. R. **Potential anti-dengue medicinal plants: a review**. J Nat Med. 2013; 67(4):677-89.

KOMURA, D. L. ***Pleurotus eryngii*: ISOLAMENTO, CULTIVO E EXOPOLISSACARÍDEOS**. Trabalho de Conclusão do curso de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006. [ orientador: Professor Doutor Guilherme Lanzi Sasaki]

KIM, H.O.; LIM, J.M.; JOO, J.H.; KIM, S.W.; HWANG, H.J.; CHOI, J.W.; YUN, J.W. **Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass**



**and exopolysaccharides** by *Agrocybe cylindracea* Bioresource Technology, v. 96, p. 1175-1182, 2005.

KIM, S.; KIM, H.; LEE, B.; HWANG, H.; BAEK, D.; KO, S. **Effects of mushroom, *Pleurotus eryngii*, extracts on bone metabolism.** Clinical nutrition, v. 25, p. 166-170, 2006.

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, L.S.; MACEDO, A.J.P.; TEIXEIRA, M.F.S. . Production of mycelial biomass by the Amazonian edible mushroom *Pleurotus albidus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2015.

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, 2013, 117 pp. [Orientadora: Dra. Claire Fernandes Kubelka].

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

LUDERT JE, et al . **Use of a commercial enzyme immunoassay to monitor dengue virus replication in cultured cells.** Virology journal. 2008;5:51.

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

MELETIS, C.D; BARKER, J.E; **Medicinal Mushrooms, a selective overview – Alternative and Complementary Therapies**, 11(3):141-145, v 11. Issue 3: June 14, 2005.

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 de mestrado, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015 [Orientadora: Dra. Claire Fernandes Kubelka].

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

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

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do sul: EDUNISC. 829 p. V. 2, 2002.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. **O Reino dos Fungos**. 2ed. Rio Grande do Sul: EDUNISC, 2004. 605p.

RAMOS, C.;SAPATA, M.;FERREIRA, A.; ANDRADA, L.; CANDEIAS, M.; **Produção de três espécies de cogumelos *Pleurotus* e avaliação da qualidade em atmosfera modificada**, Instituto Nacional dos Recursos Biológicos ( INRB) – Ver. De Ciências Agrárias v. 34 n.1 Lisboa jan./jun. 2011.

RATHEE et al. **Mushrooms as therapeutic agents**. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 459-474, Abril 2012.

ROCHA, L.A.; TAUIL, P.L. Dengue em criança aspectos clínicos e epidemiológicos, Manaus, Estado do Amazonas, no período de 2006 e 2007 – **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 42(1): 18-22 Jan-fev 2009

ROUPAS et al. The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence – **Journal of functional foods**, volume 4, issue 4, october 2012, pages 687-709.

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

SILVA, A. M. **Caracterização molecular dos vírus dengue circulantes em Pernambuco: implicações epidemiológicas**. (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Ageu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

SILVA, I.P.; **Fungos endofíticos: Fonte alternativa a metabólitos secundários de plantas**. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia, v10, n.18; p. 3894-3899; 2014

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. 2011;8(91):14-26.

SUNIT el al. Dengue e dengue hemorrágico: aspectos do manejo na unidade de terapia intensiva - ARTIGO DE REVISÃO - **Jornal de Pediatria**, volume 83, maio 2007, Porto Alegre.

TALAVERA, D., CASTILHO, A.M., DOMINGUEZ, M.C, GUTIERREZ, A.E, , MEZA, I. I. IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to

permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. **The Journal of general virology**. 2004;85(Pt 7):1801-13.

VARELLA , 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**, (2002) 60: 258-274.