

Carlos Guillermo Quiroz Carrillo

Triagem anti-herpética de amostras da biodiversidade marinha e terrestre: fracionamento biomonitorado da esponja *Petromica citrina*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial, para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências  
Orientadoras: Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões e Dra. Caroline Rigotto Borges

Florianópolis  
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Carrillo, Carlos Guillermo Quiroz

Triagem anti-herpética de amostras da biodiversidade marinha e terrestre: fracionamento biomonitorado da esponja Petromica citrina [dissertação] / Carlos Guillermo Quiroz Carrillo ; orientadora, Cláudia Maria Oliveira Simões ; co-orientadora, Caroline Rigotto Borges. - Florianópolis, SC, 2013.

105 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Biotecnologia . 3. Compostos naturais. 4. HSV-1. 5. Agentes antivirais. I. Oliveira Simões , Cláudia Maria . II. Rigotto Borges, Caroline . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.



*Este trabalho é dedicado a Deus, aos meus amados pais e familiares que sempre me apoiam a todo momento, a meus companheiros de LVA, a Dra. Caroline por todo o suporte nestes dois anos e em especial à Professora Cláudia pela oportunidade, confiança, sabedoria e paciência outorgadas.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar sempre comigo e permitir ter a sabedoria e paciência para completar mais esta etapa importante em minha vida.

Aos meus amados pais e irmã, por confiarem e torcerem muito por mim durante toda minha vida. Mesmo longe fisicamente, sempre recebi suas forças do Perú, graças a vocês eu tive muita paciência, força e coragem para que este objetivo fosse alcançado. Muito obrigado por acreditarem e apoiarem sempre minhas decisões. Adoro vocês!.

Aos meus queridos Avós por estarem ao meu lado por toda minha vida, vocês foram imensamente importantes em meu desenvolvimento humano e profissional. Amo vocês.

Aos meus primos e tios, especialmente à minha tia Teresa e meu Tio Pedro, dos quais não tive oportunidade de me despedir durante minha estadia. Vocês foram bons demais comigo, sempre me lembrarei de vocês.

À Vanessa, por estar todos estes dias a meu lado sendo uma grande parceira, torcendo e demonstrando seu grande amor e paciência. Amo-te “tadela”.

À Prof<sup>a</sup> Cláudia Maria Oliveira Simões, pela oportunidade e valiosa orientação. Obrigado por permitir que eu fizesse parte do grupo de pesquisa sob sua coordenação. Sempre lhe serei agradecido por acreditar em mim!

À Dra. Caroline Rigotto, pela valiosa orientação e ensinamentos no laboratório. Obrigado, você me ensinou tudo o que sei, sem você teria sido impossível realizar meu trabalho de mestrado. Obrigado por sua orientação dentro e fora do laboratório, teus conselhos são muito importantes para mim.

À Dra. Eliana de Faria Garcia, orientada pelo Prof. Dr. Fernão Castro Braga (UFMG), à Doutoranda Tatiana da Rosa Guimarães, orientada pelo Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto (UFSC), e à empresa alemã Dr. Willmar Schwabe Pharmaceuticals pelo fornecimento de todas as amostras testadas, permitindo a realização deste trabalho.

Às valiosas amigas e amigos do Laboratório de Virologia Aplicada, à professora Célia, Anne, Clari, Gis, Vane, Mari N., Mari R., Fran, Iza, Naira, Fabi, Marina, Débora, Dóris, Ariadne, Lucas M., Lucas A, Jadel, Ricardo e Thiago, vocês fizeram meus dias no Brasil muito mais interessantes e divertidos. Vocês vão ficar sempre em meu coração.

Aos meus amigos e amigas do Perú: Alejandra, Alonso, Alvaro, Bruno, Claudia, Diana D. Diana I. Giuliana, Hajime, Juan, Lore, Luigi, Lulu, Manuel, Maria Ines e Ruy pela sincera amizade, construída e mantida mesmo a distancia. Obrigado!

Agradeço especialmente ao Raul, à Susane e a todos que me incentivaram e acreditaram em mim, os quais sempre me deram muita força, ajuda e incentivo, principalmente nos momentos mais difíceis.

Aos membros da banca por avaliarem e melhorarem a qualidade deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, e ao CNPq, que através do Programa de Estudante-Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG) concederam a bolsa de Mestrado por 24 meses.

E a todos que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho, muito obrigado!

*"A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável."*

*Galileu Galilei*

## RESUMO

A pesquisa por novos compostos biologicamente ativos obtidos a partir de produtos naturais, nos últimos anos, tem sido incentivada em todo o mundo, pois são considerados muito importantes na descoberta de novos fármacos para várias doenças. Diversas estratégias, baseadas em diferentes tipos de observações, juntamente com triagens randomizadas, têm sido usadas na investigação da biodiversidade com o intuito de contribuir para o aumento do arsenal terapêutico anti-herpético. As infecções causadas pelos vírus herpéticos são um grave problema de saúde pública, devido à capacidade dos mesmos de causarem infecções agudas e recorrentes, além do aparecimento de cepas resistentes ao aciclovir, fármaco de primeira escolha disponível. Diante deste quadro, o Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC avalia, há vários anos, a atividade antiviral de produtos naturais e sintéticos, tendo encontrado resultados promissores para muitas das amostras testadas. Inicialmente, a citotoxicidade ( $CC_{50}$ ) e a atividade anti-HSV ( $CI_{50}$ ) foram avaliadas através do ensaio colorimétrico do MTT e do ensaio de redução do número de placas de lise, respectivamente. De acordo com os resultados obtidos através da triagem dos representantes oriundos da biodiversidade terrestre e marinha, três amostras (a fração rica em trissulfato de halistanol: TSH e os compostos TSH-A e TSH-C) foram selecionadas devido aos seus promissores índices de seletividade ( $IS = CC_{50}/CI_{50}$ ) de 15,33; 2,46 e 1,95 frente ao HSV-1 (cepa KOS). O mecanismo de ação foi avaliado através de uma sequência de ensaios, que visou avaliar a possível interferência destas amostras nas diversas etapas do ciclo de replicação viral. Na avaliação do tempo de adição, estas amostras inibiram significativamente a replicação viral, quando foram adicionadas simultaneamente ou até 3h pós-infecção. As amostras avaliadas apresentaram atividade virucida e inibiram a entrada dos vírus nas células Vero (adsorção e penetração). A análise da expressão proteica viral por *Western blotting* mostrou que as amostras TSH-A e TSH-C inibiram a expressão das proteínas  $\alpha$  (ICP27) e  $\gamma$  (gB), em diferentes intensidades e a TSH foi a única amostra que inibiu a expressão de todas as proteínas virais. Ao serem combinadas com o aciclovir, elas também demonstraram efeito sinérgico, em concentrações equivalentes a 2x seus valores de  $CI_{50}$ . O conjunto destes resultados indica a potencialidade destas amostras como compostos antivirais, mas ainda são necessários estudos mais aprofundados.

**Palavras-chave:** *Petromica citrina*, trissulfato de halistanol e derivados, Herpes Simplex Vírus, atividade anti-herpética, mecanismo de ação.

## ABSTRACT

The search for new biological active compounds derived from natural products in recent years has been stimulated throughout the world, because they are still considered a very important source to find new medicines against some diseases. Several strategies based in different types of observations and randomized screenings have been used to evaluate the biodiversity in order to increase the number of available anti-herpes drugs. The infections caused by herpesvirus are a serious worldwide public health problem, because these viruses are able to cause acute and persistent infections, besides the emergence of strains resistant to acyclovir, the available drug of choice. In this context, the Laboratory of Applied Virology from UFSC has been evaluating, for several years, the antiviral activity of natural and synthetic products, and found promising results for many of the samples tested. Initially, the cytotoxicity ( $CC_{50}$ ) and anti-HSV activity ( $IC_{50}$ ) were assessed by MTT and viral plaque number reduction assays, respectively. According to the results obtained through the anti-HSV screening of different taxons from the terrestrial and marine biodiversity, three samples (fraction rich in halistanol trisulphate: TSH and the compounds TSH-A and TSH-C) were selected due to their promising selectivity indices ( $SI=CC_{50}/IC_{50}$ ) of 15.33, 2.46 and 1.95 against HSV-1 replication (KOS strain). The mechanism of action was evaluated through different methodological strategies, which aimed to detect the possible interference of these samples at various stages of the viral replication cycle. The evaluation of these samples in the addition time assay showed a significant viral replication inhibition when they were added simultaneously or up to 3h post-infection. These samples were virucidal and also inhibited viral entry into Vero cells (adsorption and penetration). In addition, the analysis of viral protein expression by *Western blotting* showed that the samples TSH-A and TSH-C inhibited the expression of  $\alpha$  (ICP27) and  $\gamma$  (gB) proteins, at different levels of intensity and a TSH was the unique sample who inhibited all virus protein expression. When combined with acyclovir, they also demonstrated synergistic effects at concentrations equivalent to 2x their  $IC_{50}$  values. Taken together, these results indicate the potential of these samples as antiviral compounds, but further studies are needed.

**Keywords:** *Petromica citrina*, halistanol trisulfate and derivatives, Herpes Simplex Virus, anti-herpes activity, mechanism of action.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama do vírions dos HSV. ....	25
<b>Figura 2.</b> Ciclo de replicação dos HSV.....	27
<b>Figura 3.</b> Estrutura de alguns análogos acíclicos de guanosina. ....	30
<b>Figura 4.</b> Foto da Esponja Petromica citrina. ....	33
<b>Figura 5.</b> Esquema de obtenção de extratos e frações de <i>Petromica citrina</i> .....	66
<b>Figura 6.</b> Representação das substâncias TSH-A e TSH-C identificadas por estudos de RMN (Ressonância Magnética Nuclear).....	67
<b>Figura 7.</b> Resultados da avaliação do efeito virucida frente ao vírus HSV-1 (cepa KOS) das amostras TSH, TSH-A e TSH-C. ....	69
<b>Figura 8.</b> Efeito do tempo de adição das amostras fração TSH, TSH-A e TSH-C ( 2 x CI <sub>50</sub> ) no ciclo de replicação do HSV-1 (cepa KOS), em células Vero. ....	71
<b>Figura 9.</b> Resultados da avaliação do efeito das amostras fração TSH, TSH-A e TSH-C na adsorção do vírus HSV-1 (cepa KOS), em células Vero. Sulfato de dextrana (SD).....	74
<b>Figura 10.</b> Estrutura da suramina. ....	75
<b>Figura 11.</b> Resultados da avaliação do efeito das amostras TSH, TSH-A e TSH-C na penetração do vírus HSV-1 (cepa KOS), em células Vero.....	77
<b>Figura 12.</b> Efeitos das amostras fração TSH, TSH-A e TSH-C na expressão das proteínas ICP27, UL42, gD e gB do HSV-1 (cepa KOS), em células Vero, e da proteína constitutiva $\beta$ -actina, detectados por <i>Western Blotting</i> . ....	79

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Títulos infecciosos dos estoques virais utilizados. ....	59
<b>Tabela 2.</b> Resultados da avaliação da citotoxicidade em células Vero e da atividade anti-HSV-1 (cepa KOS) dos extratos e frações testados, oriundos da biodiversidade terrestre. ....	62
<b>Tabela 3.</b> Resultados da avaliação da citotoxicidade em células Vero e da atividade anti-HSV-1 (cepas KOS) de alguns compostos testados, isolados de espécies oriundas da biodiversidade terrestre.....	63
<b>Tabela 4.</b> Resultados da avaliação da citotoxicidade em células Vero e da atividade anti-HSV-1 (cepa KOS) dos extratos e frações testados, oriundos da biodiversidade marinha. ....	64
<b>Tabela 5.</b> Resultados da avaliação da citotoxicidade, em células Vero e da atividade anti-HSV-1 (cepa KOS) dos diferentes derivados testados do halistanol.....	67
<b>Tabela 6.</b> Resultados da avaliação do efeito virucida frente ao vírus HSV-1 (cepa KOS), expressos como valores de $CV_{50}$ (concentração de amostra virucida para 50% dos vírions) das amostras TSH, TSH-A e TSH-C.....	69
<b>Tabela 7.</b> Resultados do ensaio de inibição da adsorção viral, expressos como valores de $CA_{50}$ (concentração que reduziu em 50% a adsorção viral nas células) das amostras TSH, TSH-A e TSH-C.....	74
<b>Tabela 8.</b> Resultados do ensaio de inibição da penetração viral, expressos como valores de $CP_{50}$ (concentração que reduziu em 50% a penetração viral nas células) das amostras TSH, TSH-A e TSH-C.....	76
<b>Tabela 9.</b> Efeitos da combinação das amostras TSH, TSH-A e TSH-C com o aciclovir e entre si, em relação à ação anti-herpético das mesmas. ....	82

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Denominação dos vírus herpéticos humanos e características relativas às células alvo e latência.....	24
<b>Quadro 2.</b> Informações sobre os táxons da biodiversidade terrestre, que foram avaliados na triagem anti-herpética. ....	31
<b>Quadro 3.</b> Informações sobre a esponja <i>Petromica citrina</i> , que foi avaliada na triagem anti-herpética. ....	32
<b>Quadro 4.</b> Extratos e frações de <i>Echinodorus grandiflorus</i> , <i>Wilbrandia ebracteata</i> e <i>Ginkgo biloba</i> testados na triagem anti-herpética. ....	38
<b>Quadro 5.</b> Compostos isolados de <i>Echinodorus grandiflorus</i> , <i>Wilbrandia ebracteata</i> e <i>Ginkgo biloba</i> testados na triagem anti-herpética.....	39
<b>Quadro 6.</b> Extrato e frações de <i>Petromica citrina</i> testados na triagem anti-herpética. ....	40
<b>Quadro 7.</b> Compostos esteroidais de <i>Petromica citrina</i> testados na triagem anti-herpética. ....	41
<b>Quadro 8.</b> Proteínas do HSV-1 (cepa KOS) analisadas por <i>Western blotting</i> .....	56
<b>Quadro 9.</b> Valores quantitativos dos índices combinatórios (IC), calculados com o <i>software</i> Calculusyn™, que quantificam as interações entre as amostras testadas. ....	82

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
ACA	Ácido cis-aconítico
ACV	Aciclovir
AGK	Ácido ginkgólico
ATA	Ácido trans-aconítico
ATCC	American type culture collection
BCC	Blocos completamente casualizados
BOB	Bilobalídeo
CA <sub>50</sub>	Concentração que inibe 50% da adsorção viral
CC	Controle celular
CC <sub>50</sub>	Concentração que reduz em 50 % a viabilidade celular
CI <sub>50</sub>	Concentração que inibe 50% da infecção viral
CMC	Carboximetilcelulose
CMV	Citomegalovírus
CP <sub>50</sub>	Concentração que reduz em 50% a penetração do vírus nas células
CV <sub>50</sub>	Concentração virucida para 50% dos vírions
DAT	Derivados do ácido tartárico
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSH	Dissulfato de halistanol
EG	<i>Echinodorus grandiflorus</i> (Cham. & Schltldl.) Micheli
EG1	Fração de <i>Echinodorus grandiflorus</i> (Cham. & Schltldl.) Micheli

EG2	Fração de <i>Echinodorus grandiflorus</i> (Cham. & Schltdl.) Micheli
EG3	Fração de <i>Echinodorus grandiflorus</i> (Cham. & Schltdl.) Micheli
EG4	Fração de <i>Echinodorus grandiflorus</i> (Cham. & Schltdl.) Micheli
EG5	Fração de <i>Echinodorus grandiflorus</i> (Cham. & Schltdl.) Micheli
EG6	Fração de <i>Echinodorus grandiflorus</i> (Cham. & Schltdl.) Micheli
EBV	Epstein-Bar vírus
ECP	Efeito citopático viral
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EtOAc	Acetato de etila
GB	<i>Ginkgo biloba</i> L.
GNG-A	Ginkgolídeo A,
GNG-B	Ginkgolídeo B
GNG-C	Ginkgolídeo C
HD	Halistanol dessulfatado
HHV-6	Herpes humano vírus tipo 6
HHV-7	Herpes humano vírus tipo 7
HHV-8	Herpes humano vírus tipo 8
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSV	Herpes simplex Vírus
HSV-1	Herpes simplex Vírus tipo 1
HSV2	Herpes simplex Vírus tipo 2
HVEM	Herpes Vírus Entry Mediator
ICP-	<i>Infected cell protein</i>
IDU	Idoxuridina
IMA	Isoramnetina
IS	Índice de seletividade
IVA	Isovitexina

KOS	Cepa KOS do HSV
KPF	Canferol
LVA	Laboratório de virologia aplicada
MEM	<i>Minimal essencial medium</i>
MHC	Complexo de histocompatibilidade
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
MSH	Monossulfato de halistanol
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil brometo de tetrazólio, sal de tetrazólio
P.I.	Pós-infecção
PBS	Solução de tampão fosfato
P&D	Pesquisa e desenvolvimento
PM	Peso molecular
QDT	Quercetina
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RP-1	Frações 1-8 da amostra TSH
RP-2	Frações 9-13 da amostra TSH
RP-3	Frações 19-22 da amostra TSH
RP-4	Frações 23-28 da amostra TSH
RP-5	Frações 59-70 da amostra TSH
SH	Sulfato de heparana
SD	Sulfato de dextrana
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SPA	Espinosina
SWA	Esvertisina
TK	Timidina quinase
TSH	Trissulfato de halistanol
TSH-A	Trissulfato de halistanol-A

TSH-C	Trissulfato de halistanol-C
UFP	Unidades formadoras de placas
VERO	Fibroblastos de rins de macaco verde da África ( <i>Cercopithecus aethiops</i> )
VZV	Varicella Zoster Vírus
WE	<i>Wilbrandia ebracteata Cogn.</i>

## Sumario

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	23
2.1	Vírus herpéticos.....	23
2.1.1	Classificação.....	23
2.1.2	Herpes Simplex Vírus (HSV).....	24
2.1.3	Estrutura dos HSV .....	25
2.1.4	Ciclo de multiplicação dos HSV .....	25
2.2	Arsenal terapêutico anti-herpético.....	29
2.3	Amostras testadas .....	30
2.3.1	Amostras oriundas da biodiversidade terrestre.....	30
2.3.2	Amostras oriundas da biodiversidade marinha.....	32
3	OBJETIVOS.....	35
3.1	Objetivo Geral .....	35
3.2	Objetivos específicos.....	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	37
4.1	Materiais de estudo.....	37
4.2	Culturas celulares .....	42
4.2.1	Células .....	42
4.2.2	Meio de cultura e reagentes.....	42
4.3	Vírus.....	43
4.3.1	Origem das cepas virais.....	43

4.3.2	Preparo das suspensões-estoques virais.....	43
4.3.3	Determinação dos títulos infecciosos virais .....	44
4.4	Avaliação da citotoxicidade .....	46
4.4.1	Avaliação da viabilidade celular através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazólio (MTT).....	46
4.5	Avaliação da potencial atividade antiviral – triagem anti-herpética.....	48
4.5.1	Método de redução do número de placas de lise .....	48
4.6	Avaliação do provável mecanismo da ação anti-herpética dos extratos e frações obtidos a partir de <i>Petromica citrina</i> .....	49
4.6.1	Avaliação da ação virucida direta.....	49
4.6.2	Avaliação do efeito do tempo de adição das amostras no ciclo de replicação viral .....	51
4.6.3	Avaliação do efeito das amostras na adsorção viral .....	52
4.6.4	Avaliação do efeito das amostras na penetração viral ...	53
4.6.5	Avaliação do efeito das amostras na expressão das proteínas virais .....	54
4.7	Avaliação da potencial atividade sinérgica das amostras... ..	57
4.8	Delineamento experimental e análise estatística .....	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	59
5.1	Determinação dos títulos infecciosos virais .....	59
5.2	Triagem da potencial atividade antiviral .....	59
5.2.1	Avaliação da citotoxicidade .....	59

5.2.2	Triagem anti-herpética: ensaio de redução do número de placas de lise .....	60
5.3	Fracionamento biomonitorado de <i>Petromica citrina</i> .....	65
5.4	Avaliação do provável mecanismo de ação anti-herpética. ....	68
5.4.1	Avaliação da ação virucida direta.....	68
5.4.2	Avaliação do efeito do tempo de adição das amostras no ciclo de replicação viral .....	70
5.4.3	Avaliação do efeito das amostras na adsorção viral .....	72
5.4.4	Avaliação do efeito das amostras na penetração viral ...	76
5.4.5	Avaliação do efeito das amostras na expressão das proteínas virais.....	78
5.4.6	Avaliação da potencial atividade sinérgica das amostras.....	81
5.5	Proposta do mecanismo de ação dos derivados do halistanol.....	84
6	CONCLUSÕES.....	85
7	PERSPECTIVAS .....	87
	REFERÊNCIAS.....	89



## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a indústria farmacêutica tem investigado diversos organismos terrestres e marinhos, uma vez que eles são importantes na pesquisa e no desenvolvimento (P&D) de novos fármacos (BUTLER, 2008; KINGSTON, 2011; NEWMAN; CRAGG, 2012; ZHU et al., 2012).

Há vários anos, o Laboratório de Virologia Aplicada ([www.lvapli.ufsc.br](http://www.lvapli.ufsc.br)) da UFSC (Universidade Federal de Santa Catarina), sob a coordenação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Maria Oliveira Simões, vem avaliando a citotoxicidade e a potencial atividade antiviral de produtos naturais e compostos obtidos por síntese ou semissíntese (ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al., 2003; BETTEGA et al., 2004; ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al., 2005; CARRIEL-GOMES et al., 2006; DA SILVA et al., 2006; SAVI et al., 2006; CARRIEL-GOMES et al., 2007; MÜLLER et al., 2007; KRATZ et al., 2008a; KRATZ et al., 2008b; SAVI et al., 2010; SILVA et al., 2010; BERTOL et al., 2011; CARDOZO et al., 2011; SILVA et al., 2011; CARVALHO et al., 2012; LÜCKEMEYER et al., 2012).

Embora a pesquisa e o desenvolvimento (P&D) de novos fármacos com atividade antiviral seja intensa, os avanços são poucos, pois a maioria deles tem aplicações limitadas. O atual arsenal terapêutico disponível compreende em torno de 50 fármacos, sendo a metade utilizada no tratamento de infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Os demais antivirais são utilizados contra os vírus das hepatites B e C, vírus influenza, vírus respiratórios e vírus herpéticos, incluindo nesse último grupo o vírus da varicela zoster, o citomegalovírus e os Herpes Simplex Vírus tipos 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) (ROTTINGHAUS; WHITLEY, 2007; DE CLERCQ, 2009a, 2009b, 2009c, 2010).

Diversos análogos do nucleosídeo guanosina, tais como aciclovir, penciclovir, valaciclovir e outros, foram aprovados para o uso clínico em infecções causadas pelos HSV, e atuam inibindo a síntese do DNA viral, com alta especificidade, uma vez que estes só se tornam ativos após fosforilação pela enzima timidina

## 22 Introdução

quinase (TK) viral (PIRET et al., 2002; ROTTINGHAUS; WHITLEY, 2007; TUSET et al., 2010).

O surgimento de cepas virais resistentes a estes análogos, através de mutações em seus genes, onde a enzima TK é mais seletiva ou a DNA polimerase sofre modificações estruturais, tem sido observado em pacientes imunocomprometidos ou naqueles sob tratamentos prolongados (GILBERT et al., 2002), corroborando a necessidade da P&D de novos fármacos anti-herpéticos, com mecanismos de ação diferenciados, que atuem em outras etapas da replicação viral, ou em sinergismo com os fármacos já disponíveis (BACON et al., 2003).

Sabe-se que os produtos naturais são uma fonte inesgotável de compostos com atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória e para o tratamento de doenças neurológicas, cardiovasculares, metabólicas, imunológicas, e oncológicas. Inúmeras plantas medicinais possuem constituintes químicos, que atuando independentemente ou sinergicamente com o aciclovir e/ou outros fármacos têm capacidade de inibir o ciclo de replicação de vários tipos de vírus, com genoma DNA ou RNA (BUTLER, 2008; BERTOL et al., 2011; CARDOZO et al., 2011; MISHRA; TIWARI, 2011; ZHU et al., 2012), tais como os pertencentes aos grupos dos polissacarídeos, flavonóides, taninos, quinonas, terpenos, lignanas, alcalóides e outros (KHAN et al., 2005; CHATTOPADHYAY; KHAN, 2008).

Desta forma, este trabalho objetivou avaliar a potencial ação anti-herpética de alguns táxons da biodiversidade marinha e terrestre, e de compostos deles isolados.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Vírus herpéticos**

#### **2.1.1 Classificação**

Os vírus são partículas infecciosas de 120-200 nm (ROBERTS, 1997) constituídas por um material genético composto de DNA ou RNA, o qual pode estar coberto ou não por um envelope de natureza lipídica com proteínas ancoradas. Eles são capazes de utilizar a maquinaria da célula hospedeira para sua replicação, podendo causar diferentes patologias (CONDIT, 2007). Dentre os inúmeros vírus existentes, encontram-se os vírus herpéticos, família Herpesviridae, os quais foram documentados primeiramente por Hipócrates na Grécia (WHITLEY et al., 1998).

Os membros da família Herpesviridae podem ser classificados segundo suas similitudes biológicas, suas diferenças nas sequências gênicas e nos diferentes nichos ecológicos, em função de suas características epidemiológicas, e de acordo com seus hospedeiros naturais em três subfamílias:  $\alpha$ -neurotróficos,  $\beta$ -linfotróficos e  $\gamma$ -herpes vírus (Quadro 1) (KLEYMANN, 2005; KNIPE et al., 2007).

## 24 Revisão Bibliográfica

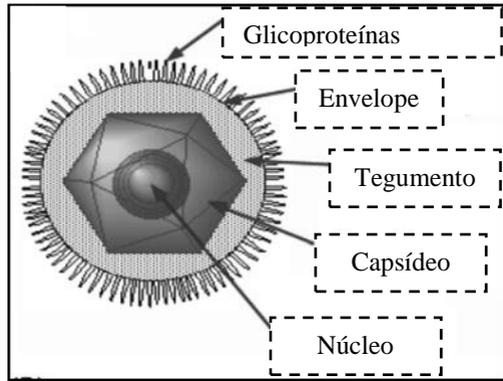
**Quadro 1.** Denominação dos vírus herpéticos humanos e características relativas às células alvo e latência.

<b>Nome Sigla</b>	<b>Subfamília</b>	<b>Nome Oficial</b>	<b>Células- alvo</b>	<b>Latência</b>
<b>Herpes Simplex Vírus tipo 1 HSV-1</b>	$\alpha$ - neurotróficos	Herpesvírus humano-1	Muco- epiteliais	Gânglios sensoriais
<b>Herpes Simplex Vírus tipo 2 HSV-2</b>	$\alpha$ - neurotróficos	Herpesvírus humano-2	Muco- epiteliais	Gânglios sensoriais
<b>Varicella Zoster vírus VZV</b>	$\alpha$ - neurotróficos	Herpesvírus humano-3	Muco- epiteliais	Gânglios sensoriais
<b>Epstein-Bar Vírus EBV</b>	$\gamma$ - herpes vírus	Herpesvírus humano-4	Linfócitos B Epiteliais	Linfócitos B Gânglios salivares
<b>Citomegalovírus CMV</b>	$\beta$ - limfotróficos	Herpesvírus humano-5	Epiteliais Monócitos Linfócitos	Monócitos Linfócitos
<b>Herpes Humano Vírus tipo 6 HHV-6</b>	$\beta$ - limfotróficos	Herpesvírus humano-6	Linfócitos T	Linfócitos T
<b>Herpes Humano Vírus tipo 7 HHV-7</b>	$\beta$ - limfotróficos	Herpesvírus humano-7	Linfócitos T	Linfócitos T
<b>Herpes Humano Vírus tipo 8 HHV-8</b>	$\gamma$ - herpes vírus	Herpesvírus humano-8	Endoteliais	Desconhecida

Fonte: adaptado de Kleymann, (2005) e Hunt (2010).

### 2.1.2 Herpes Simplex Vírus (HSV)

A infecção com os HSV em humanos pode ocorrer via superfícies com mucosa ou por ferimentos na pele. Os HSV-1 e HSV-2 apresentam 70% de homologia genômica, mas apesar disso afetam áreas diferentes do corpo. O HSV-1 costuma causar gengivomastites, queratoconjuntivites, herpes cutâneo, herpes genital e encefalites, sendo transmitido primariamente via secreções orais. Por outro lado, o HSV-2 é frequentemente transmitido por via sexual, causando infecções genitais e retais, herpes cutâneo, gengivomastites, meningoencefalites e herpes neonatal (COEN; SCHAFFER, 2003; STEINER, 2013).



**Figura 1.** Diagrama do vírions dos HSV.  
Fonte: (WATANABE, 2010).

### 2.1.3 Estrutura dos HSV

Os HSV-1 e HSV-2 possuem DNA de fita dupla como material genético, no interior de um capsídeo icosaédrico, constituído por 162 capsômeros e envelopado com uma matéria amorfa denominada tegumento, que se encontra protegido por uma bicamada, que está intimamente associada à superfície externa, contendo poliaminas, lipídeos e glicoproteínas virais (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM e gN). Estas conferem diferentes propriedades a cada um dos vírus e outorgam os antígenos para que o hospedeiro possa ser capaz de responder (Figura 1) (WATANABE, 2010; STEINER, 2013).

### 2.1.4 Ciclo de multiplicação dos HSV

O ciclo de multiplicação dos HSV envolve basicamente as etapas abaixo descritas (Figura 2) (COEN; SCHAFFER, 2003):

Entrada ou penetração: é um processo complexo, envolvendo cinco das 12 glicoproteínas de superfície. Pode ser dividido em três fases: adsorção, ligação e fusão. A entrada dos

## 26 Revisão Bibliográfica

HSV no interior celular pode ocorrer de duas maneiras distintas. A principal via de entrada ocorre através da adsorção e fusão do envelope viral à membrana plasmática, sendo dependente de interações com receptores celulares específicos e independente do pH. A segunda forma de entrada dos vírus nas células envolve a endocitose do capsídeo envelopado e é dependente do pH. Embora os HSV-1 costumem penetrar na célula pela via pH independente (fusão), tem sido observado que a rota de entrada pode ser a endocitose nas células HeLa (NICOLA et al., 2003; NICOLA; STRAUS, 2004).

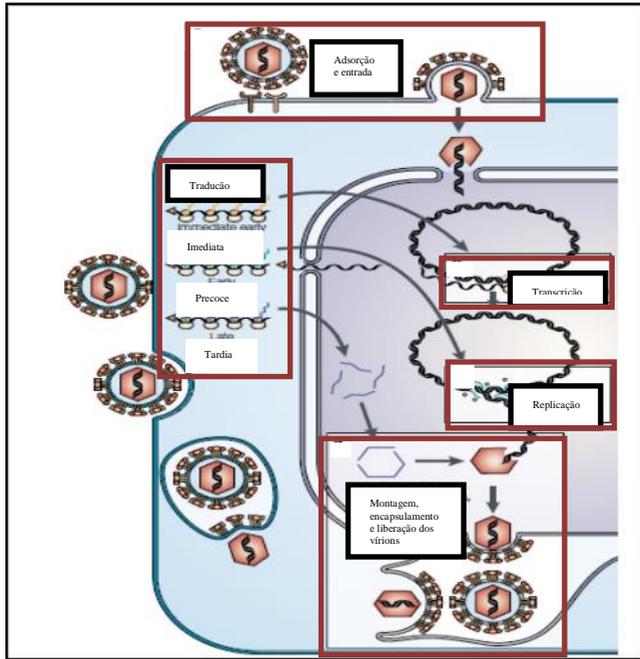
A fusão se inicia pela interação das cadeias de glicosaminoglicanas dos vírions com as proteoglicanas da superfície celular. Na **adsorção**, o sulfato de heparana é preferencialmente a molécula que interage com as glicoproteínas virais (BENDER et al., 2005; JOHNSON et al., 2011).

Na etapa de **ligação**, ocorre essencialmente a interação da gD com um dos seus receptores, que incluem nectina-1 e nectina-2, o mediador específico da entrada dos herpes vírus [*Herpes Virus Entry Mediator* (HVEM)], ou o sulfato de heparana, especificamente modificado (BENDER et al., 2005) o HVEM (também conhecido como HveA, ATAR, TR2 ou TNFRSF-14) é considerado um membro da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral, sendo expresso em vários tecidos, incluindo linfócitos T e B, células epiteliais, endoteliais e fibroblastos. As nectinas-1 e 2 são membros da superfamília de receptores de imunoglobulinas, sendo expressas em vários tecidos e tipos celulares, incluindo células epiteliais, fibroblastos e neurônios (SPEAR, 2004).

A ligação da gD a um dos seus receptores provoca uma mudança conformacional na sua cadeia polipeptídica, liberando o segmento carboxi-terminal. Este, por sua vez, pode interagir com a gB, ou com o complexo gH/gL, desencadeando rearranjos moleculares e, finalmente, a **fusão** (SPEAR, 2004; HELDWEIN et al., 2006).

Após entrar na célula, o nucleocapsídeo é transportado via microtúbulos do citoesqueleto, por meio da interação da proteína do tegumento UL34 com a dineína celular, até um poro

nuclear, por onde o genoma viral é liberado no núcleo celular e o capsídeo vazio é deixado no citoplasma. Neste momento, o DNA altera sua forma de fita dupla para a forma circular, para posteriormente ocorrer a transcrição, a replicação e a montagem de novos capsídeos (YE et al., 2000; COEN; SCHAFFER, 2003).



**Figura 2.** Ciclo de replicação dos HSV. (a) O vírus adsorve, liga-se e funde-se à membrana celular, liberando o capsídeo e as proteínas do tegumento no citoplasma; (b) O DNA viral se circulariza, é transcrito pela RNA polimerase celular formando os  $\alpha$ -RNA; (c) As proteínas  $\alpha$  estimulam a transcrição dos genes  $\beta$ , e se formam as proteínas  $\beta$ , as quais estão envolvidas na replicação do DNA viral e sua síntese; (d) Os DNAs recém-sintetizados são empacotados no interior dos capsídeos recém-montados e, finalmente são liberados no espaço extracelular, onde infectarão células adjacentes. Fonte: adaptado de COEN (2003).

Transcrição, tradução e replicação: o processo de transcrição, no qual a RNA polimerase celular sintetiza RNAm a partir do DNA viral, além de aproximadamente 84 proteínas, acontece de forma coordenada e regulada em três fases: **imediate ou alfa**, que tem início no momento em que a proteína do tegumento viral  $\alpha$ -TIF ou VP16, associada a fatores nucleares, se liga ao genoma viral, formando o complexo de pré-iniciação viral. Inicia-se então, a transcrição viral imediata a partir da síntese de proteínas da fase alfa, denominada de proteínas de células infectadas (ICP - *Infected Cell Protein*), tais como ICP0, ICP4, ICP22 ICP27, ICP47 e  $\alpha$ 22/US1.5 (ADVANI et al., 2000), responsáveis pela regulação positiva das fases seguintes, além de inibir a ação das proteínas de apresentação de antígenos virais pelo MHC de classe I. Esta fase ocorre de 2 a 4h pós-infecção (PI). Após a fase alfa, inicia-se a fase **precoce ou beta**, na qual são sintetizadas enzimas análogas às celulares e que possibilitam a replicação do DNA, como a timidina quinase (TK) e a UL30/UL42 (DNA polimerase viral). A síntese de  $\beta$ -proteínas ocorre em torno de 5 a 7h PI. A síntese do DNA viral começa logo após o aparecimento das  $\beta$ -proteínas e já pode ser detectado nas primeiras 3h e continua até 15h PI. A replicação termina com o aparecimento das  $\gamma$ -proteínas, na fase **tardia ou gama**. Com o início da replicação e conseqüentemente com o acúmulo do DNA viral, ocorre a sinalização para que os genes tardios codifiquem as proteínas estruturais do capsídeo, do tegumento e outras proteínas, que formarão os vírions, tais como as glicoproteínas do envelope viral (BOEHMER; LEHMAN, 1997; COEN; SCHAFFER, 2003; ROIZMAN; KNIPE, 2007).

Montagem e liberação dos vírions: após a síntese das proteínas estruturais do capsídeo no citoplasma, essas são transportadas ao núcleo das células infectadas, e se unem para a montagem de pró-capsídeos vazios, que posteriormente serão preenchidos com DNA viral, formando os nucleocapsídeos. Estes se ligam a porções modificadas da membrana nuclear interna, que contém as proteínas do tegumento, e são temporariamente envelopados e liberados no espaço nuclear intermembranário. Posteriormente, eles são conduzidos ao citoplasma, onde ocorre a

adição das proteínas do tegumento e sua introdução em vesículas derivadas do complexo de Golgi, nas quais também há glicoproteínas virais inseridas. Após o envelopamento, os vírions maduros migram para a superfície celular, fundem-se com a membrana plasmática, e finalmente, são liberados no espaço extracelular por exocitose (HENAFF et al., 2012).

Após a infecção primária, os HSV podem estabelecer latência em nervos sensoriais e autonômicos, que enervam os tecidos onde ocorreu tal infecção, podendo ser reativados por estímulos extremamente variados (STEINER, 2013).

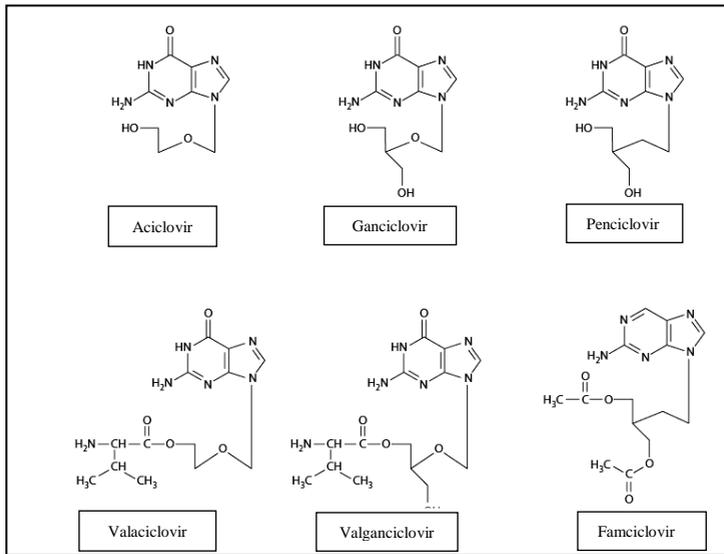
As infecções causadas pelos HSV estão entre as mais comuns em humanos, sendo estimado que 60-95% da população mundial adulta esteja infectada, pelo menos, por um dos tipos de HSV (GUPTA et al., 2007; NICOLL et al., 2012; STEINER, 2013).

## **2.2 Arsenal terapêutico anti-herpético**

O desenvolvimento de fármacos antivirais teve início na década de 50. Entre as principais razões das dificuldades encontradas nesta área específica está a natureza intrínseca dos vírus, os quais são totalmente dependentes da maquinaria celular para sua multiplicação e sobrevivência (JONES, 1998; GILBERT et al., 2002).

Os primeiros fármacos utilizados clinicamente para o tratamento tópico do herpes e para o tratamento de encefalites herpéticas foram a idoxuridina e a vidarabina, respectivamente. Atualmente, os fármacos anti-herpéticos são principalmente análogos acíclicos de guanosina, tais como aciclovir (ACV) (9-(2-hidroxi-etoximetil) guanina), ganciclovir, penciclovir e seus pró-fármacos valaciclovir; valganciclovir e famciclovir, respectivamente (Figura 3). Além desses, também podem ser utilizados trifluridina, docosanol, cidofovir e foscarnet. A maioria destes análogos pode ser monofosforilada pela enzima viral timidina quinase (TK), e essa é convertida pelas quinases celulares para a sua forma ativa: o fármaco trifosforilado, que interrompe a replicação herpética por inibição competitiva pela

DNA polimerase viral e, conseqüentemente, ocorrerá a inibição do alongamento da síntese da cadeia do DNA viral (BRADY; BERNSTEIN, 2004; KLEYMANN, 2005; MAMIDYALA; FIRESTINE, 2006; DE CLERCQ, 2009a, 2011; RAZONABLE, 2011).



**Figura 3.** Estrutura de alguns análogos acíclicos de guanosina. Fonte: adaptado DE CLERCQ (2011).

## 2.3 Amostras testadas

### 2.3.1 Amostras oriundas da biodiversidade terrestre

As plantas avaliadas neste estudo [*Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltl.) Micheli & *Wilbrandia ebracteata* Cogn.] foram escolhidas com base em avaliações preliminares realizadas no LVA (ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al., 2005). Além dessas, foi testado também *Ginkgo biloba* L., por

ser uma planta que apresenta inúmeros efeitos farmacológicos (BOONKAEW; CAMPER, 2005) e uma composição química rica em metabólitos secundários, reconhecidos por apresentarem ação antiviral, tais como os flavonoides (NIJVELDT et al., 2001).

O quadro 2 apresenta informações sobre os diferentes táxons da biodiversidade terrestre testados no presente estudo, assim como, a título ilustrativo, algumas de suas propriedades farmacológicas, que foram detectadas cientificamente.

**Quadro 2.** Informações sobre os táxons da biodiversidade terrestre, que foram avaliados na triagem anti-herpética.

Família	Espécie (farmacógeno)	Nomes Populares	Propriedades farmacológicas	Fonte
Alismataceae	<i>Echinodorus grandiflorus</i> (Cham. & Schlttdl.) Micheli (folhas)	Chapéu-de-couro, Chá-mineiro, Erva-do-brejo	Anti-inflamatória	(TANUS-RANGEL et al., 2010)
			Antiedematogênica	(GARCIA et al., 2010)
			Vasodilatadora	(TIBIRICA et al., 2007)
			Diurética	(DE SOUZA et al., 2004)
			Anti-hipertensiva	(YAMAHARA et al., 1986)
			Analgésica	(DUTRA et al., 2006)
Cucurbitaceae	<i>Wilbrandia ebracteata</i> Cogn. (raízes)	Taiuiá	Citotóxica	(LANG et al., 2011)
			Anti-herpética	(ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al., 2005)
			Anti-ulcerogênica	(GONZALEZ; DI STASI, 2002)
			Analgésica	(GONZALEZ; DI STASI, 2002; SIQUEIRA JR et al., 2007)
			Anti- inflamatória	
Ginkgoaceae	<i>Ginkgo biloba</i> L. (folhas)	Ginkgo	Anti-herpética	(HAYASHI et al., 1992).

### 2.3.2 Amostras oriundas da biodiversidade marinha

O quadro 3 mostra o táxon da biodiversidade marinha testado no presente estudo, assim como, a título ilustrativo, algumas de suas propriedades farmacológicas, que foram detectadas cientificamente. Esta esponja foi escolhida, pois em triagens realizadas no LVA, ela apresentou resultados preliminares promissores (DA SILVA et al., 2006; BIANCO et al., 2013, submetido).

**Quadro 3.** Informações sobre a esponja *Petromica citrina*, que foi avaliada na triagem anti-herpética.

Família	Espécie	Propriedades farmacológicas
Halichondriidae	<i>Petromica citrina</i>	Antibacteriana (MONKS et al., 2002; MARINHO et al., 2010; LAPORT et al., 2012; MARINHO et al., 2012) - Anti-herpética (DA SILVA et al., 2006)

#### 2.3.2.1 Aspectos gerais de esponjas

As esponjas são animais invertebrados ancestrais, sésseis, os quais podem filtrar eficientemente a água, e dos quais se têm provas de sua existência desde a era pré-cambriana tardia (TURQUE et al., 2010).

Atualmente, existe um grande interesse na pesquisa de novos compostos bioativos de esponjas, devido à sua capacidade de combater diferentes patógenos e predadores e, ainda, de aperfeiçoar suas funções biológicas quando existe um déficit de recursos oferecidos pelo meio ambiente. As esponjas sintetizam

compostos químicos muito diferentes aos encontrados em organismos terrestres, e estudos recentes relataram propriedades antitumorais, antivirais, antifúngicas e antibacterianas para vários compostos delas isolados (DA SILVA et al., 2006; NICHOLAS; PHILLIPS, 2006; MORA CRISTANCHO et al., 2008; YASUHARA-BELL; LU, 2010).

### 2.3.2.2 *Petromica citrina*

#### 2.3.2.2.1 Características morfológicas

A espécie *Petromica citrina* (Figura 4), que pertence à família Halichondriidae, é uma esponja incrustante maciça com projeções aguçadas, de morfologia digitiforme, coloração laranja-amarelada e textura compressível. A base larga, aproximadamente 3-9 x 1,6-6 cm, apresenta consistência friável e fixa-se diretamente a substratos duros. Possui uma superfície hispida (produzida pelas escleras, que se projetam para o exterior do ectossoma), quase sempre coberta por sedimento fino, permanecendo à mostra somente as projeções (MURICY et al., 2001; LIST-ARMITAGE; HOOPER, 2002; RIFFEL; CARRARO, 2010).



**Figura 4.** Foto da esponja *Petromica citrina*. Fonte: (TURQUE et al., 2010).

### 2.3.2.2.2 Características químicas

Sobre sua constituição química, Marinho et al. (2012) isolaram o trissulfato de halistanol. De igual maneira, foi isolado de outra espécie do mesmo gênero (*Petromica ciocalyptoides*), coletada no nordeste brasileiro, o sulfato de halistanol (KOSSUGA et al., 2007).

### 2.3.2.2.3 Propriedades farmacológicas

Do ponto de vista farmacológico, foi relatado recentemente que o trissulfato de halistanol, isolado de *P. citrina*, coletada em Rio de Janeiro, foi capaz de inibir o crescimento de bactérias, entre elas cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium fortuitum*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Escherichia coli* (MARINHO et al., 2010; MARINHO et al., 2012). No entanto, outro estudo mostrou que esta esponja, coletada em Santa Catarina, não apresentou tal atividade contra *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermis*, *Bacillus subtilis*, e *Micrococcus luteus* (MONKS et al., 2002). Uma provável explicação é que a técnica utiliza por Monks et al. (2002) não foi suficientemente sensível para detectar tal atividade (MARINHO et al., 2010). Estudos prévios relataram as atividades anti-HSV-1, anti-adenovírus e anti-rotavírus da fração aquosa da esponja *P. citrina* (DA SILVA et al., 2006).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a potencial ação anti-herpética *in vitro* de alguns representantes da biodiversidade marinha e terrestre.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a citotoxicidade de extratos, frações purificadas e compostos obtidos a partir da esponja *Petromica citrina*, e das plantas *Ginkgo biloba*, *Echinodorus grandiflorus* e *Wilbrandia ebracteata*, através do ensaio colorimétrico do MTT, em células Vero;

- Avaliar a potencial atividade anti-herpética (anti-HSV-1, cepa KOS) destas amostras, por meio do ensaio de redução do número de placas de lise viral;

- Selecionar a amostra mais ativa para avaliar seu mecanismo de ação anti-herpética, por meio de diferentes estratégias metodológicas;

- Avaliar o possível sinergismo entre os diferentes compostos testados.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais de estudo

Várias amostras da biodiversidade terrestre foram testadas, e dessas o extrato padronizado EGb761 da *Ginkgo biloba* e todos os compostos dele isolados foram gentilmente cedidos pela empresa alemã Dr. Willmar Schwabe Pharmaceuticals (Alemanha) (Quadros 4 e 5).

As amostras das plantas *Echinodorus grandiflorus* e *Wilbrandia ebracteata* foram gentilmente cedidas, respectivamente, pela Dra. Eliana de Faria Garcia, orientada pelo Prof. Dr. Fernão Castro Braga, da Faculdade de Farmácia, da UFMG e pela Doutoranda Andressa Córneo Gazola, orientada pelo Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, CIF, CCS, da UFSC (Quadros 4 e 5).

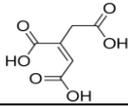
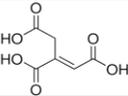
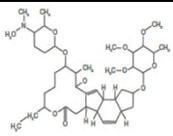
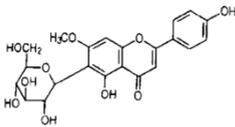
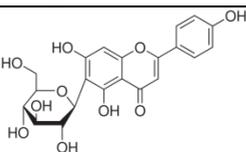
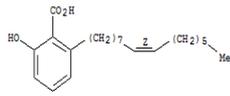
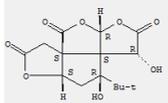
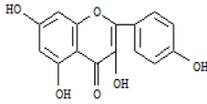
Dando continuidade às triagens realizadas por Da Silva et al. (2006) e Bianco et al. (2013), foram testadas algumas amostras da biodiversidade marinha, obtidas a partir da esponja *Petromica citrina*, que foram cedidas pela Doutoranda Tatiana da Rosa Guimarães, orientada pelo Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto do Departamento de Ciências Farmacêuticas, CIF, CCS, da UFSC (Quadros 6 e 7).

## 38 Materiais e Métodos

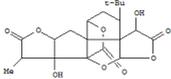
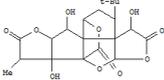
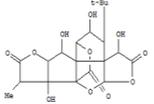
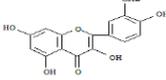
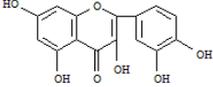
**Quadro 4.** Extratos e frações de *Echinodorus grandiflorus*, *Wilbrandia ebracteata* e *Ginkgo biloba* testados na triagem anti-herpética.

<b>Amostras</b>
<i>Extrato padronizado de Ginkgo biloba EGb761</i>
<i>Fração n-butanólica de Wilbrandia ebracteata</i>
Fração diclorometano (DCM), obtida a partir do fracionamento do extrato etanólico de <i>Echinodorus grandiflorus</i> , enriquecida em diterpenos (EG1)
Fração acetato de etila (EtOAc), obtida a partir do fracionamento do extrato etanólico de <i>Echinodorus grandiflorus</i> , rica em diterpenos (EG2)
Fração acetato de etila (EtOAc), obtida a partir do fracionamento do extrato etanólico de <i>Echinodorus grandiflorus</i> , rica em flavonóides (EG3)
Extrato diclorometano (DCM) de <i>Echinodorus grandiflorus</i> , rico em diterpenos (EG4)
Fração acetato de etila (EtOAc) de <i>Echinodorus grandiflorus</i> , rica em derivados do ácido tartárico (DAT, EG5)
Fração de <i>Echinodorus grandiflorus</i> , rica no diterpeno RX2 (EG6)

**Quadro 5.** Compostos isolados de *Echinodorus grandiflorus*, *Wilbrandia ebracteata* e *Ginkgo biloba* testados na triagem anti-herpética.

Compostos	Estrutura	Classe	Origem
Ácido cis-aconítico (ACA)		Ácido tricarboxílico	<i>Echinodorus grandiflorus</i>
Ácido trans-aconítico (ATA)		Ácido tricarboxílico	
Espinosina (SPA)		C-glicosilflavona	<i>Wilbrandia ebracteata</i>
Esvertisina (SWA)		C-glicosilflavona	
Isovitexina (IVA)		C-glicosilflavona	
Ácido ginkgólico (AGK)		Alquilfenol	
Bilobalídeo (BOB)		Terpenolactona	<i>Ginkgo biloba</i>
Canferol (KPF)		Flavonol	

## 40 Materiais e Métodos

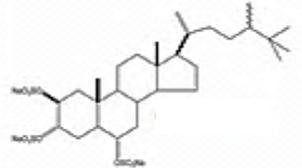
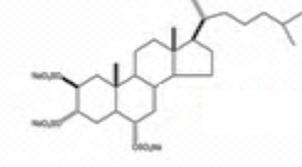
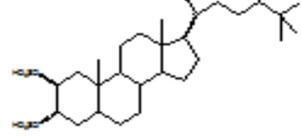
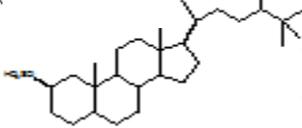
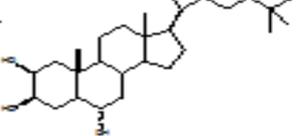
Ginkgolídeo A (GNG-A)		Terpenolactona	
Ginkgolídeo B (GNG-B)		Terpenolactona	
Ginkgolídeo C (GNG-C)		Terpenolactona	
Isoramnetina (IMA)		Flavonol	
Quercetina (QDT)		Flavonol	

**Quadro 6.** Extrato e frações de *Petromica citrina* testados na triagem anti-herpética.

Amostras	Tipo	Origem
n-butanol	Extrato	<i>P. citrina</i>
TSH	Fração	
RP-1	Fração	
RP-2	Fração	
RP-3	Fração	
RP-4	Fração	
RP-5	Fração	

RP-1 (frações 1-8 da amostra TSH); RP-2 (frações 9-13 da amostra TSH); RP-3 (frações 19-22 da amostra TSH), RP-4 (frações 23-28 da amostra TSH); RP-5 (frações 59-70 da amostra TSH). O detalhamento da obtenção destas frações consta da Figura 5, em Resultados e Discussão.

**Quadro 7.** Compostos esteroidais de *Petromica citrina* testados na triagem anti-herpética.

Compostos	Estrutura
<p>TSH-A Trissulfato de halistanol-A</p>	
<p>TSH-C Trissulfato de halistanol-C</p>	
<p>DSH Dissulfato de halistanol</p>	
<p>MSH Monossulfato de halistanol</p>	
<p>HD Halistanol dessorbatado</p>	

## 42 Materiais e Métodos

Para a preparação das soluções-estoques dos extratos e frações testados, foram pesadas as massas necessárias para a obtenção de soluções a 50 ou 25 mg/mL. Nos casos dos compostos puros, foram preparadas soluções nas concentrações de 50 ou 25 µM. Em ambos os casos, utilizou-se até 1% de dimetilsulfóxido (DMSO, Merck®).

Estas soluções foram aliquotadas em tubos de 2mL e armazenadas a -20°C até a realização dos ensaios. Posteriormente, foram diluídas em MEM 1X (*Minimal Essencial Medium* - Cultilab), contendo 1% PSA (10.000 U de penicilina G, 10.000 µg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B - Cultilab).

### 4.2 Culturas celulares

#### 4.2.1 Células

Foram utilizadas células Vero (ATCC:CCL 81), que são culturas contínuas de fibroblastos de rins de macaco verde da África (*Cercopithecus aethiops*), cultivadas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Elas foram escolhidas por serem permissivas à replicação *in vitro* do HSV-1, possibilitando sua multiplicação e demonstrando efeito citopático reprodutível e visível ao microscópio invertido (HU; HSIUNG, 1989). As células Vero utilizadas foram periodicamente submetidas aos protocolos do LVA de detecção da presença de micoplasmas a fim de descartar qualquer contaminação por estes organismos.

#### 4.2.2 Meio de cultura e reagentes

O meio utilizado para o crescimento e manutenção das células foi o MEM, acrescido de 0,22% de bicarbonato de sódio para que o pH permanecesse entre 7,25 a 7,4. O MEM foi suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB, Cultilab), na proporção de 10% para promoção do crescimento e 5% para manutenção das linhagens celulares. Com o intuito de prevenir a contaminação das células por bactérias, fungos e leveduras foram adicionados ao meio 1% de PSA. Para obtenção de subculturas

celulares, para manutenção das células e para realização dos experimentos, utilizou-se como agente dissociante a tripsina (tripsina de pâncreas de porco preparada em uma solução de EDTA 1:250, Sigma), que é uma enzima proteolítica que catalisa reações de quebra de cadeia polipeptídica em determinadas sequências de aminoácidos.

Posteriormente, a cada elaboração dos meios foram realizados controles microbiológicos com os caldos Tioglicolato e *Brain Heart Infusion* (BHI) e com os ágaros Mueller Hinton e Sabouraud para garantir a ausência de contaminantes bacterianos e fúngicos. O tempo de incubação foi de cinco dias.

### **4.3 Vírus**

#### **4.3.1 Origem das cepas virais**

O vírus utilizado foi Herpes Simplex Vírus tipo 1 (HSV-1), cepa KOS, proveniente da Faculdade de Farmácia, Universidade de Rennes I, França.

#### **4.3.2 Preparo das suspensões-estoques virais**

As suspensões-estoques virais foram preparadas conforme metodologia descrita por Simões e colaboradores (1999).

Suspensões virais já existentes foram inoculadas em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> contendo uma monocamada de células Vero, que foram tripsinizadas 24h antes da infecção. O meio de cultura foi aspirado e a monocamada celular foi lavada 3x com solução de tampão fosfato (PBS); após, a monocamada celular foi incubada com 1 mL da suspensão viral e os frascos incubados por mais 1h a 37°C, em estufa de CO<sub>2</sub> para permitir a adsorção e penetração viral e, então, o excesso de vírus foi retirado por sucção a vácuo e 10 mL de MEM sem SFB foram adicionados. As condições de incubação foram as mesmas descritas acima.

## 44 Materiais e Métodos

O efeito citopático viral (ECP) foi monitorado por microscópio invertido a cada ciclo de replicação (18h). Quando a monocamada celular se mostrou totalmente infectada pelo vírus, os frascos foram congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  e descongelados a  $37^{\circ}\text{C}$  por 3x para o rompimento total das células e liberação das partículas virais. A suspensão foi centrifugada por 10 min a 350 Xg em centrífuga refrigerada a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi aliquoteado em tubos estéreis, titulado e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até sua utilização.

O procedimento de preparação das suspensões virais foi realizado rotineiramente a fim de se obter estoques virais com altos títulos infecciosos.

### 4.3.3 Determinação dos títulos infecciosos virais

Antes de se iniciar os ensaios para avaliação da potencial atividade antiviral das amostras, foi essencial obter inóculos virais com infecciosidade conhecida. A infecciosidade dos vírus pode usualmente ser determinada como unidades formadoras de placas (UFP). O título infeccioso de todos os estoques virais foi determinado através do método de contagem de placas de lise, descrito por Burlison et al (1992).

Todos os ensaios foram realizados em placas de 24 cavidades, preparadas da seguinte maneira: suspensões de células Vero na densidade de  $2,5 \times 10^5$  células/cavidade/ 0,75 mL, foram cultivadas em meio MEM, suplementado com 5% de SFB e 1% de PSA, e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  em estufa de  $\text{CO}_2$  até a confluência (24h).

Em seguida, o meio de cultura de cada cavidade foi aspirado cuidadosamente e a monocamada celular foi lavada com PBS. As células foram infectadas com 400  $\mu\text{L}$  da suspensão estoque viral diluída em forma seriada (razão 1:10), em meio MEM sem SFB e com 1% de PSA (3 réplicas para cada diluição), e incubadas em estufa de  $\text{CO}_2$  durante 1h, sob agitação a cada 15 min, para uma melhor distribuição da suspensão viral sobre a monocamada. Após esse tempo, a suspensão viral foi aspirada e as células mais uma vez lavadas com PBS. A cada cavidade,

foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de uma solução de CMC<sup>1</sup> (Carboximetilcelulose). As placas foram novamente incubadas por 72 h. Após este período, o meio foi retirado e as células fixadas e coradas pela adição de 200  $\mu\text{L}$  do corante preto de naftaleno<sup>2</sup> por 40 min, à temperatura ambiente, em agitador horizontal. Após este tempo, o corante foi aspirado e as placas colocadas para secar, à temperatura ambiente, sendo que os focos de lise formados foram quantificados através da visualização em microscópio estereoscópio Olympus Zz51. O título viral foi obtido através da contagem dos focos de infecção na última diluição viral utilizada, que se caracterizam por áreas claras de lise celular, chamadas de placas de lise ou focos.

O título viral (T) foi calculado através da seguinte fórmula e expresso em Unidades Formadoras de Placas por mililitro (UFP/mL):

$$T = \frac{N \times d}{V}$$

Onde: N = número médio de focos da última diluição que apresentou focos;

d = recíproca da última diluição, onde foram contadas as placas de lise;

v = volume de inóculo em mL (0,4 mL).

<sup>1</sup> **Preparo da solução de carboximetilcelulose:** Meio MEM 2X + solução aquosa a 1,5% de carboximetilcelulose (Sigma), na proporção 1:1 ambos previamente esterilizados e acrescentados de 1% de PSA.

<sup>2</sup> **Preparo da solução de preto de naftaleno:** 100 mg do corante preto de naftaleno (Sigma) foram dissolvidos em 100mL de uma solução aquosa a 5% de ácido acético (v/v) (Merck) sendo o pH justado, se necessário para 2,3- 2,5. Esta mistura foi filtrada através de papel filtro e estocada a 4°C, sendo aquecida em banho-maria a 37°C antes de seu uso.

### 4.4 Avaliação da citotoxicidade

O método utilizado foi o ensaio colorimétrico do MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil brometo de tetrazólio, conforme proposto por Mosmann (1983), modificado por Sieuwerts et al. (1995), e padronizado no LVA por Freitas (2001).

#### 4.4.1 Avaliação da viabilidade celular através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazólio (MTT)

O sal de tetrazólio MTT é um composto hidrossolúvel, que em solução apresenta coloração amarelo-pálido e é facilmente incorporado por células viáveis, que o reduzem em suas mitocôndrias pelas desidrogenases. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em um composto formazana de coloração azul-escuro, não solúvel em água, que fica armazenado no citoplasma celular. O ensaio colorimétrico com MTT é um método sensível e quantitativo, pois mede a quantidade de formazana formada através de espectrofotometria, onde o valor da absorbância obtido é proporcional ao número de células viáveis.

**Procedimento:** Uma suspensão de células Vero contendo aproximadamente  $2,5 \times 10^5$  células/cavidade/0,1 mL, obtida por tripsinização de um frasco de cultura celular, foi distribuída em uma placa de 96 cavidades (100µL/cavidade). A placa foi incubada por 24h, a 37°C, em estufa de CO<sub>2</sub> até a confluência. Após 24h, o meio foi retirado por aspiração e substituído por 200 µL das amostras diluídas (razão 1:2), em diferentes concentrações, em cada cavidade. Foram feitos controles celulares (200 µL de meio MEM/cavidade). Em seguida, a placa foi incubada por 72h, e após este tempo, o meio de cada cavidade foi substituído por 50 µL de uma solução de

MTT<sup>3</sup> a 1mg/mL (preparada em meio MEM). A placa com MTT foi incubada por mais 4h, nas mesmas condições. Após, foi retirado o meio contendo MTT e foram adicionados 100 µL de DMSO (Nuclear) por cavidade para dissolver os cristais de formazana. A placa foi agitada por 10 min, à temperatura ambiente, para que toda a formazana fosse dissolvida e a absorbância foi medida em espectrofotômetro (SpectraMax®M2<sup>e</sup>) a 540nm.

Os valores de absorbância medidos para cada concentração de cada amostra foram transformados em porcentagens (%) em relação aos controles celulares, os quais são considerados 100% viáveis, através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade Celular} = \frac{A_{AM}}{Acc} \times 100\%$$

Onde: AAM e ACC correspondem às absorbâncias das amostras e dos controles celulares, respectivamente.

Em seguida, com os percentuais calculados, referentes às diferentes concentrações, foi possível calcular os valores de CC<sub>50</sub>, ou seja, a concentração de cada amostra que reduziu em 50% a viabilidade celular. Os valores de CC<sub>50</sub> calculados representam a média de três experimentos independentes ± desvio padrão.

---

<sup>3</sup> **Preparo da solução-estoque de MTT.**- foram utilizados 5mg de MTT (Sigma) para cada mL de PBS (p/v). Para uso, foi feita a diluição em meio MEM (1mg/mL).

#### 4.5 Avaliação da potencial atividade antiviral – triagem anti-herpética

##### 4.5.1 Método de redução do número de placas de lise

Este ensaio foi realizado para avaliar a potencial atividade das amostras, frente ao HSV-1 (cepa KOS), através do ensaio de redução do número de placas de lise e seguiu os procedimentos descritos por Burleson et al (1992), com algumas modificações.

**Procedimento:** Células Vero foram cultivadas em placas de 24 cavidades ( $2,5 \times 10^5$  /cavidade/0,75mL) e incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> até a confluência (24h). Após 24h, o meio foi aspirado, a monocamada celular confluenta foi lavada 3X com PBS e 400 µL da suspensão viral foram adicionados, na concentração de 100 UFP/cavidade, em cada cavidade, por 1h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após a adsorção viral, as células foram lavadas com PBS e foram adicionados 500 µL de uma solução de CMC dissolvida em meio MEM 2X (controle viral); ou esta mesma solução contendo as amostras em diferentes concentrações, ou aciclovir (10 µM - controle positivo), por 72h. Por fim, o meio foi aspirado, as células foram coradas com 200 µL de preto de naftaleno. Após 40 min, à temperatura ambiente e em agitador horizontal, o corante foi aspirado e as placas contadas através da visualização em microscópio estereoscópio. A porcentagem de inibição da replicação viral de cada amostra, com relação aos controles virais, foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = 1 - \left( \frac{\text{n}^\circ \text{ placas amostra}}{\text{n}^\circ \text{ placas controle viral}} \right) \times 100$$

Em seguida, os percentuais calculados foram inseridos em um gráfico, e através da análise de regressão linear, foi possível calcular os valores de  $CI_{50}$ , ou seja, a concentração de cada amostra que inibiu 50% a infecção viral. Os valores de  $CI_{50}$  representam a média de, no mínimo, três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão.

Com posse dos valores de  $CC_{50}$  e  $CI_{50}$  foi possível calcular o índice de seletividade (IS) de cada amostra, através da seguinte fórmula:

$$IS = \frac{CC_{50}}{CI_{50}}$$

O índice de seletividade indica quão promissora é a atividade antiviral de cada amostra, ou seja, quanto maior for o valor do IS, mais seletiva será a amostra ao vírus e não à célula hospedeira (COS et al., 2006).

#### **4.6 Avaliação do provável mecanismo da ação anti-herpética dos extratos e frações obtidos a partir de *Petromica citrina***

##### **4.6.1 Avaliação da ação virucida direta**

Este ensaio foi conduzido para determinar se as amostras que foram ativas, quando avaliadas pelo método de redução do número de placas de lise, seriam capazes de inativar os vírus na ausência de células, ou seja, para avaliar a ação direta das amostras sobre as partículas virais, e a conseqüente diminuição da capacidade infecciosa dos vírus estudados. O ensaio foi realizado conforme descrito por Ekblad et al. (2006), com algumas modificações.

## 50 Materiais e Métodos

**Procedimento:** As misturas de 50 µL das diferentes concentrações dos compostos e 50 µL de  $4 \times 10^4$  UFP/0,05 mL do HSV-1 (cepa KOS), em meio MEM sem SFB, ou 50 µL de MEM (controle viral), foram homogeneizadas e incubadas por 15 min, a 37°C, em banho-maria. Feito isto, os fluidos virais tratados foram diluídos em série (1:100), a fim de se obter concentrações não inibitórias das amostras, utilizando-se meio MEM gelado com 1% de PSA. Placas de 24 cavidades, contendo uma monocamada de células confluentes (24h), foi lavada 3x com PBS. O tampão foi aspirado e 400 µL de cada diluição (1:100) foram distribuídos nas placas que foram, então, incubadas por 60 min, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse tempo, as diluições foram retiradas, as monocamadas lavadas com PBS e recobertas com 500 µL da solução de CMC. As placas foram incubadas durante 72h. Após esse período, a solução de CMC foi retirada e as células fixadas e coradas com a solução de preto de naftaleno e as placas de lise foram contadas com auxílio de microscópio estereoscópio. De posse dos números das placas de lise, nos diferentes tratamentos e nos controles virais, foi possível determinar a infecciosidade residual (IR) percentual das diluições das amostras, através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ IR} = \frac{\text{n}^\circ \text{ placas amostra}}{\text{Média n}^\circ \text{ placas controle viral}} \times 100$$

Em seguida, os percentuais calculados foram inseridos em um gráfico, e através da análise de regressão, foi possível calcular os valores de CV<sub>50</sub>, ou seja, a concentração de cada amostra que foi virucida para 50% dos vírions.

#### 4.6.2 Avaliação do efeito do tempo de adição das amostras no ciclo de replicação viral

A atividade antiviral das amostras foi avaliada em vários períodos de tempo, de acordo com as técnicas descritas por Carlucci et al (1999) e Su et al (2008), com algumas modificações. Como controle antiviral, foi empregado o aciclovir. **Procedimento:** Células Vero foram cultivadas em placas de 24 cavidades ( $2,5 \times 10^5$ /cavidade/0,75mL) até confluência (24h), e diferentes tratamentos de adição dos compostos foram executados:

- **Pré-tratamento (3h antes da infecção viral):** as amostras, diluídas nas concentrações desejadas, foram adicionadas às células, as quais foram incubadas por 3h, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, as amostras foram aspiradas, as monocamadas lavadas com PBS e as suspensões virais contendo 100 UFP/0,4 mL do HSV-1 (cepa KOS) foram adicionadas. As placas foram incubadas por 1h para possibilitar a adsorção viral. Após este tempo, o meio com o inóculo viral foi aspirado, as células lavadas com PBS e foram adicionados 500 µL de CMC. Por fim, as placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, por 72h. Após esse período, seguiu-se o procedimento descrito no item 4.5.1.

- **Tratamento simultâneo (T<sub>0</sub>):** as amostras diluídas nas concentrações desejadas foram adicionadas às células concomitantemente com as suspensões virais contendo 100 UFP/0,4 mL do HSV-1 (cepa KOS). As placas foram incubadas por 1h, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, por 72h, e, após esse período, seguiu-se o procedimento descrito no item 4.5.1.

- **Tratamento pós-infecção (PI):** as células foram infectadas com 400 µL das suspensões virais contendo 100 UFP/0,4 mL do HSV-1(cepa KOS). Após 1h de adsorção viral, foram lavadas com PBS e receberam apenas uma solução de CMC, permanecendo incubadas em estufa por 1h com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Nos tempos subsequentes de 3, 6, 9, 12, 18 e 24h (PI), essa solução foi aspirada e as células foram tratadas com as amostras diluídas em meio e CMC. As placas foram incubadas em estufa

de CO<sub>2</sub> a 37°C até completar o período de 72h. Após esse período, seguiu-se o procedimento descrito no item 4.5.1.

### 4.6.3 Avaliação do efeito das amostras na adsorção viral

Este ensaio foi realizado para avaliar se as amostras eram capazes de inibir a adsorção viral. O ensaio foi conduzido conforme descrito por Cheng et al. (2004), com algumas modificações.

**Procedimento:** Células Vero foram cultivadas em placas de 24 cavidades (2,5 x 10<sup>5</sup>/cavidade/0,75mL) até a confluência (24h) e, após este período, foram resfriadas a 4°C por 30 min em geladeira. As amostras, nas concentrações desejadas, foram misturadas a volumes equivalentes das suspensões virais a 100 UFP e adicionadas (500 µL) às placas, as quais foram novamente incubadas a 4°C por 2h. Foram realizados controles celulares, controles virais e controles positivos (sulfato de dextrana, Sigma). Após 2h de incubação em geladeira, o meio foi aspirado e as células lavadas 2x com PBS gelado para retirar os vírus não adsorvidos e o restante das amostras. Com o intuito de controlar todos os procedimentos realizados nesta metodologia, foi realizada a lavagem de um dos controles virais com tampão citrato<sup>4</sup> (pH 3), pois neste valor de pH ocorre a desestabilização das partículas virais adsorvidas nas membranas plasmáticas, fazendo com que os vírus se desprendam e sejam eliminados após aspiração e lavagem e assim, este controle não poderá apresentar infecção viral e conseqüentemente formação de placas de lise. Para finalizar o experimento, 500 µL da solução de CMC foram adicionados cuidadosamente às monocamadas celulares e as placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, por 72h. O restante do método seguiu as orientações dispostas no item 4.5.1.

---

<sup>4</sup> **Preparo da solução tampão citrato:** 4,2 g de ácido cítrico (Carlo Erba), 0,375 g de KCl (Sigma) e 4,0 g de NaCl (Sigma) foram dissolvidos em 500 mL de água ultra-pura e filtrados com auxílio de papel filtro. O pH foi ajustado para 3,0 a solução esterilizada por autoclavação a 121°C e armazenada em geladeira a 4°C até o uso.

#### 4.6.4 Avaliação do efeito das amostras na penetração viral

Considerando que os vírus adsorvem nas células a 4°C, mas apenas as penetram quando a temperatura é aumentada (MCCLAIN; FULLER, 1994), a avaliação do efeito das amostras na penetração viral foi realizada como descrito previamente por Piret et al. (2002) e Su et al. (2008), com algumas modificações.

**Procedimento:** Células Vero foram cultivadas em placas de 24 cavidades ( $2,5 \times 10^5$ /cavidade/0,75mL) até a confluência (24h) e, após este período, foram resfriadas a 4°C por 30 min em geladeira, infectadas com HSV-1 (cepa KOS) (100 UFP) e incubadas por 2h a 4°C. Decorrido este período, as células foram lavadas 2x com PBS gelado para remover as partículas virais não adsorvidas, sendo que o PBS da segunda lavagem foi mantido em contato com as células e as placas foram incubadas para que a temperatura do experimento fosse rapidamente elevada a 37°C por 5 min, com o intuito de maximizar a penetração viral. Após este curto período, foram rapidamente adicionados 400 µL das diferentes concentrações das amostras e do sulfato de dextrana (controle positivo), todos diluídos em MEM sem SFB. Foram feitos controles virais, onde as células foram infectadas e não tratadas e os controles celulares, onde as células não foram infectadas nem tratadas. As placas foram recolocadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, durante 1h. Posteriormente, o meio com as amostras foi aspirado e as células lavadas, com tampão citrato (pH 3,0) a 37°C por 1 min para inativar os vírions, que supostamente não penetraram nas células. O pH foi neutralizado através de uma lavagem com PBS pH 7,0. As células receberam, então, 500 µL da solução de CMC, e o restante seguiu as orientações dispostas no item 4.5.1.

#### 4.6.5 Avaliação do efeito das amostras na expressão das proteínas virais

A avaliação dos efeitos dos compostos na expressão das proteínas virais foi conduzida através do ensaio de *Western blotting*, conforme descrito por Kuo et al. (2001), com algumas modificações

**Procedimento:** Células Vero, em uma densidade de  $2 \times 10^6$  células/cavidade/2 mL, foram cultivadas em placas de 6 cavidades com meio MEM, 5% de SFB e 1% de PSA até atingirem confluência. Após 24 h, as células foram incubadas ou não (controle celular) com 2 mL de uma suspensão viral do HSV-1 (cepa KOS) com MOI (em inglês, *Multiplicity of Infection*) de 0,2 por 1 h a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas 3x com 1mL de PBS, e adicionou-se 2 mL das amostras nas concentrações desejadas, e 2 mL de meio MEM nos controles viral e celular. Como controle positivo foi utilizado o aciclovir (20 µM). As placas foram incubadas a 37°C, em estufa de CO<sub>2</sub>, durante 18 h (1 ciclo de replicação viral). Após este período, o meio foi retirado, as células lavadas 2x com 2 mL de PBS.

Para extração das proteínas virais a partir das células infectadas adicionou-se 150 µL de tampão de lise [2% dodecil sulfato de sódio (SDS); 5% β-mercaptoetanol; 0,125 M Tris-HCl pH 7,4; 30% de glicerol; 1,5% inibidor de proteases (Sigma)]. As amostras foram transferidas para microtubos, fervidas durante 5 min a 99°C e centrifugadas a 10.000 Xg por 10 min, a 4°C. Após, as amostras foram transferidas para novos tubos e armazenadas a -20°C. A determinação da concentração proteica foi realizada pelo método clássico de Bradford (BRADFORD, 1976). As proteínas (aproximadamente 5 µg), foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS a 12,5% (SDS-PAGE). Em seguida, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond-ECL (GE Healthcare) em tampão de transferência 25 mM de Tris Base (Sigma) e 192 mM de Glicina (Amresco) dissolvidos em 100 mL de uma solução aquosa a 20% de metanol (v/v)], a 100 V.

Para a realização da incubação com os anticorpos específicos para as proteínas virais, primeiramente as membranas foram bloqueadas por 1h com 5% leite desnatado (Molico) em tampão de bloqueio [25mM de Tris Base (Sigma), 0,15 M de NaCl (Amresco) e 0,1% de Tween 20 (Usb) dissolvidos em 1.000 mL de água ultrapura e armazenado a 4°C até o uso], lavadas 5x por 6 min (cada lavagem) com este tampão. Após, as membranas foram incubadas por 90 min, à temperatura ambiente, separadamente e sob agitação, com os seguintes anticorpos primários diluídos neste mesmo tampão, contendo 2% de leite desnatado: anticorpo policlonal de cabra contra ICP27 (diluição 1:700, proteína de fase  $\alpha$  do HSV-1, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); anticorpo monoclonal de coelho contra  $\beta$ -actina (proteína constitutiva, diluição 1:2.500, Chemicon, Millipore); anticorpo monoclonal de camundongo contra UL42 (diluição 1:1.000, proteína de fase  $\beta$  do HSV-1, Chemicon, Millipore); anticorpo monoclonal de camundongo contra gD (diluição de 1:5.000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), e anticorpo monoclonal de camundongo contra gB [(diluição de 1:5.000, Chemicon, Millipore), ambas proteínas de fase  $\gamma$  do HSV-1] (Quadro 8).

**Quadro 8.** Proteínas do HSV-1 (cepa KOS) analisadas por *Western blotting*.

<b>Fase</b>	<b>Gene codificador</b>	<b>Proteína</b>
<b><math>\alpha</math> (imediate)</b>	U <sub>L</sub> 54	ICP 27
<b><math>\beta</math> (precoce)</b>	U <sub>L</sub> 42	Proteína acessória DNA polimerase viral
<b><math>\gamma</math> (tardia)</b>	U <sub>L</sub> 27 U <sub>8</sub> 6	gB gD
<b>Constitutiva</b>		$\beta$ -actina

Após este período, as membranas foram lavadas 5X por 5 min (cada lavagem) com tampão de bloqueio e incubadas com os anticorpos secundários (conjugados à peroxidase), durante 1 h, à temperatura ambiente e sob agitação, de acordo com a origem do anticorpo primário: IgG anticabra (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), IgG anticamundongo (Chemicon, Millipore) e IgG anticoelho (Chemicon, Millipore), todos diluídos 1:5.000 em tampão de bloqueio contendo 2% de leite desnatado. Após o período de incubação, as membranas foram lavadas 5x por 5 min (cada lavagem) com o tampão de bloqueio e detectados pelo kit de quimioluminescência Pierce ECL Western Blotting (Thermo Scientific), segundo especificações do fabricante, misturando-se 500  $\mu$ L de cada reagente (reagentes 1 e 2), sendo que essa mistura foi colocada na membrana por 2 min. Após este tempo, eliminou-se o excesso dos reagentes sobre a membrana, e a mesma foi adequadamente acomodada no hypercassete. A revelação foi realizada com o filme radiográfico (IBF-Medix, Duque de Caixas, RJ, Brasil) no processador de filmes SRX-101A (Konica Minolta Medical & Graphic, INC-China).

#### 4.7 Avaliação da potencial atividade sinérgica das amostras

Este ensaio foi realizado para avaliar a possível atividade sinérgica das amostras TSH, TSH-A e TSH-C, que foram as que apresentaram valores de  $IC_{50}$  mais promissores. Estas substâncias apresentam estrutura química semelhante a dos polissacarídeos sulfatados, que apresentam atividade já relatada na literatura (GHOSH et al., 2009; CARDOZO et al., 2011), no que diz respeito à redução do número de placas de lise, quando foram misturadas com aciclovir ou entre elas. O ensaio foi conduzido conforme descrito por Chou (2006), com algumas modificações.

**Procedimento:** Células Vero foram cultivadas em placas de 24 cavidades ( $2,5 \times 10^5$  /cavidade/0.75mL) e incubadas a 37°C, 5%  $CO_2$  até a confluência (24h). Após 24h, o meio foi aspirado, a monocamada celular confluenta foi lavada 3X com PBS e 400  $\mu$ L das suspensões virais foram adicionados, na concentração de 100 UFP/cavidade, em cada cavidade, por 1h a 37°C e 5%  $CO_2$ . Após a adsorção viral, as células foram lavadas com PBS e foram adicionados 500  $\mu$ L de uma solução de CMC dissolvida em meio MEM 2X (controle viral), ou contendo as amostras em diferentes proporções com o aciclovir ou as próprias amostras misturadas entre si, por 72h. Por fim, as placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de  $CO_2$ , por 72h, após esse período, seguiu-se o procedimento descrito no item 4.5.1.

#### 4.8 Delineamento experimental e análise estatística

Nos experimentos, foi utilizado um delineamento de blocos completamente casualizados (BCC) e um arranjo fatorial dos tratamentos, tanto na avaliação da citotoxicidade quanto na avaliação da potencial atividade antiviral (SOKAL; ROHLF, 1995), onde cada cavidade constituiu uma unidade experimental e os tratamentos foram as diferentes concentrações das amostras testadas frente aos vírus HSV-1 (cepa KOS). Os tratamentos e os controles foram distribuídos aleatoriamente entre as cavidades da placa e as repetições ficaram em placas diferentes, pois foram

## 58 Materiais e Métodos

realizadas em dias subsequentes, garantindo a casualização. Cada placa correspondeu a um bloco, o que permite uma melhor avaliação das possíveis variações entre as repetições.

O estudo de qualquer atividade biológica em cultura celular tem como vantagem, entre muitas outras, a homogeneidade das amostras. Um erro grave que, normalmente é cometido quando se trata de experimentos realizados em placas de múltiplas cavidades, é acreditar que, colocando-se as mesmas concentrações de uma amostra, em duas ou três colunas na mesma placa, se estaria fazendo uma duplicata ou triplicata. Estatisticamente, esse procedimento é considerado apenas uma réplica de um mesmo tratamento e não uma repetição, pois a variância devido a fatores externos (erro experimental) não estaria sendo levada em consideração (SOKAL; ROHLF, 1995). Por isso, foram realizados dois ou três experimentos independentes, em dias subsequentes, o que caracteriza uma duplicata ou triplicata respectivamente.

Os valores de  $CC_{50}$  e  $CI_{50}$  foram estimados através de curvas concentração-resposta por análise de regressão linear ou logarítmica. Os experimentos foram realizados em triplicata ou duplicata e os resultados expressos através da média de  $\pm$  desvio padrão da média.

Os resultados das diferentes amostras foram comparados entre si e/ou com os controles através da análise de variância (ANOVA) seguida dos pós testes Tukey ou Dunett, utilizando-se o programa GrapPad InStat<sup>®</sup>.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Determinação dos títulos infecciosos virais

Os títulos infecciosos das suspensões-estoques virais utilizadas foram determinados conforme a metodologia descrita no item 4.3.3. No decorrer do trabalho, foram utilizadas duas suspensões-estoques dos vírus, preparadas de acordo com a metodologia descrita no item 4.3.2. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Títulos infecciosos dos estoques virais utilizados.

Vírus	Suspensão estoque viral	Título (UFP/mL)
HSV-1 (cepa KOS)	1	$1,48 \times 10^7$
	2	$1,28 \times 10^7$

### 5.2 Triagem da potencial atividade antiviral

#### 5.2.1 Avaliação da citotoxicidade

Antes de se proceder a avaliação da potencial atividade antiviral dos diferentes extratos, frações e compostos isolados, das diferentes amostras oriundas da biodiversidade marinha e terrestre, foi necessário verificar sua citotoxicidade em relação às células Vero, permissivas ao vírus em estudo.

A citotoxicidade é considerada, primariamente, como a capacidade de um composto em induzir injúria ou morte celular (EISENBRAND et al., 2002). Assim sendo, um agente antiviral ideal deve inibir o ciclo de replicação viral, interferindo o mínimo possível na estrutura e metabolismo das células hospedeiras (VANDER BERGHE et al., 1986). Na pesquisa de novos compostos antivirais, deve-se considerar sua toxicidade nas células hospedeiras, pois se estes produtos forem excessivamente tóxicos, a sua utilização se torna inviável, mesmo que eles

## 60 Resultados e Discussão

apresentassem ação antiviral significativa, já que algumas substâncias podem exibir tal atividade em virtude dos seus efeitos citotóxicos (VLIETINCK et al., 1997).

Neste trabalho, a citotoxicidade das amostras foi avaliada frente às células Vero, pelo ensaio do MTT, que resultou na determinação dos valores de  $CC_{50}$  para cada amostra. Os experimentos foram realizados em triplicata e os valores obtidos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão, e constam das Tabelas 2 a 5.

### **5.2.2 Triagem anti-herpética: ensaio de redução do número de placas de lise**

O ensaio de redução do número de placas de lise é um dos ensaios mais utilizados para se avaliar a atividade antiviral, por ser uma metodologia relativamente simples e precisa para a propagação e estudo dos vírus herpéticos. Quando infectada, a monocamada celular sofre alterações morfológicas devido à replicação viral, denominadas, em conjunto, de efeito citopático. Se uma célula é infectada por uma única partícula viral ocorrerá a formação de novos vírions, que poderão infectar as células vizinhas, sendo que esta nova progênie infectará outras células vizinhas e assim por diante. Após um período de tempo, o qual depende do tipo e da quantidade de vírus inoculado, a infecção inicial dará origem, após muitos ciclos de replicação, a uma área de infecção, denominada de placa de lise (BURLESON et al., 1992).

Este ensaio foi aqui utilizado com a intenção de quantificar suspensões virais de títulos desconhecidos, e de avaliar a potencial atividade antiviral das amostras em teste, com relação à sua capacidade de reduzir o número das placas de lise, tanto no processo de triagem antiviral quanto no de avaliação do mecanismo da ação anti-herpética. Para isso, a monocamada celular infectada foi recoberta com um agente espessante (Carboximetilcelulose - CMC) para que não ocorresse a formação de placas de lise secundárias, devido à difusão do vírus para as células vizinhas, assegurando que as placas formadas originaram-

se da primeira partícula viral, que iniciou o efeito citopático (CONDIT, 2007).

Neste trabalho, paralelamente aos experimentos, foram realizados controles positivos com aciclovir, pois este é o fármaco de escolha para o tratamento das infecções herpéticas, obtendo-se experimentalmente um valor de  $CI_{50}$  de  $1,64 \pm 0,24$   $\mu\text{g/mL}$ . De acordo com o descrito na literatura, a inibição da infecção herpética pelo aciclovir é de aproximadamente 100% (DE JALÓN et al., 2003), o que pode atestar a eficiência da metodologia empregada neste trabalho.

A visualização das placas de lise pode ser feita através da coloração das células com o corante preto de naftaleno, e possibilitando a contagem das placas com o auxílio de um microscópio estereoscópico (CONDIT, 2007).

Os resultados obtidos na triagem da atividade anti-*HSV-1* (cepa KOS) e os resultados de citotoxicidade em células Vero constam das Tabelas 2 a 5. A relação entre os efeitos farmacológicos e tóxicos é um importante requisito na previsão de uma possível aplicabilidade como agente terapêutico, quanto da realização dos estudos pré-clínicos *in vitro*, e tal informação provém do cálculo do seu índice de seletividade ( $IS=CC_{50}/CI_{50}$ ) (HU; HSIUNG, 1989).

## 62 Resultados e Discussão

### 5.2.2.1 Triagem anti-herpética de amostras da biodiversidade terrestre

**Tabela 2.** Resultados da avaliação da citotoxicidade em células Vero e da atividade anti-HSV-1 (cepa KOS) dos extratos e frações testados, oriundos da biodiversidade terrestre.

Espécie	Amostras	CC <sub>50</sub> (µg/mL)	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	IS
<i>E. grandiflorus</i>	EG1	20,59±2,93	SA	--
<i>E. grandiflorus</i>	EG2	27,09± 4,88	SA	--
<i>E. grandiflorus</i>	EG3	280,50±9,36	55,55± 13,90	5,04
<i>E. grandiflorus</i>	EG4	23,58± 5,50	SA	--
<i>E. grandiflorus</i>	EG5	>500,00	SA	--
<i>E. grandiflorus</i>	EG6	274,00±25,89	SA	--
<i>W. ebracteata</i>	W.E	127,37± 41,34	SA	--
<i>G. biloba</i>	EGb761	760,92± 60,17	SA	--
<b>Aciclovir</b>	ACV	>4,50	1,64± 0,24	>2,74

CC<sub>50</sub> = concentração que reduziu em 50% a viabilidade das células Vero, CI<sub>50</sub> = concentração que inibiu 50% da replicação do HSV-1, IS = CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>, SA = sem atividade.

**Tabela 3.** Resultados da avaliação da citotoxicidade em células Vero e da atividade anti-HSV-1 (cepa KOS) de alguns compostos testados, isolados de espécies oriundas da biodiversidade terrestre.

Espécie	Compostos	CC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CI <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	IS
<i>E. grandiflorus</i>	ATA	190,84 $\pm$ 43,23	SA	--
<i>E. grandiflorus</i>	ACA	174,34 $\pm$ 27,32	SA	--
<i>W. ebracteata</i>	SPA	146,06 $\pm$ 21,27	SA	--
<i>W. ebracteata</i>	SWA	>1.000,00	SA	--
<i>W. ebracteata</i>	IVA	>1.000,00	SA	--
<i>G. biloba</i>	GNG B	>500,00	SA	--
<i>G. biloba</i>	GNG C	>500,00	SA	--
<i>G. biloba</i>	KPF	>500,00	SA	--
<i>G. biloba</i>	BOB	>500,00	SA	--
<i>G. biloba</i>	IMA	184,23 $\pm$ 57,47	SA	--
<i>G. biloba</i>	AGK	14,42 $\pm$ 2,98	SA	--
<i>G. biloba</i>	QDT	>500,00	SA	--
<b>Aciclovir</b>	ACV	>4,50	1,64 $\pm$ 0,24	>2,74

CC<sub>50</sub> = concentração que reduziu em 50% a viabilidade das células Vero, CI<sub>50</sub> = concentração que inibiu 50% da replicação do HSV, IS = CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>, SA = sem atividade.

Dentre todas as amostras descritas nas Tabelas 2 e 3, nas concentrações e nas condições experimentais testadas, apenas a fração EG3 de *E. grandiflorus* apresentou atividade antiviral, (Tabela 2, IS= 5,04). No entanto, decidiu-se por não continuar avaliando esta fração, e optou-se por continuar o estudo com outra amostra, já que havia disponibilidade razoável dessa fração para continuar os estudos (ver item abaixo).

### 5.2.2.2 Triagem anti-herpética de amostras da biodiversidade marinha

De posse dos resultados da triagem realizada, abaixo apresentados (Tabela 4), optou-se por efetuar o fracionamento do extrato n-butanólico da esponja *Petromica citrina* (IS > 4,95), com o objetivo de isolar suas substâncias ativas, através de um fracionamento monitorado pela avaliação da atividade anti-herpética.

**Tabela 4.** Resultados da avaliação da citotoxicidade em células Vero e da atividade anti-HSV-1 (cepa KOS) dos extratos e frações testados, oriundos da biodiversidade marinha.

Espécie	Amostras	CC <sub>50</sub> (µg/mL)	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	IS
<i>P. citrina</i>	Fração n-butanol	>500,00	100,99± 19,65	>4,95
<i>P. citrina</i>	RP-1	388,38±2,54	SA	--
<i>P. citrina</i>	RP-2	430,13±10,76	SA	--
<i>P. citrina</i>	RP-3	45,37± 15,17	SA	--
<i>P. citrina</i>	RP-4	23,83±11,80	SA	--
<i>P. citrina</i>	RP-5	51,97±24,55	SA	--
Aciclovir	ACV	>4,50	1,64± 0,24	>2,74

CC<sub>50</sub> = concentração que reduziu em 50% a viabilidade das células Vero.  
 CI<sub>50</sub> = concentração que inibiu 50% da replicação do HSV-1 (cepa KOS), IS = CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>, SA = sem atividade.

### 5.3 Fracionamento biomonitorado de *Petromica citrina*<sup>a</sup>

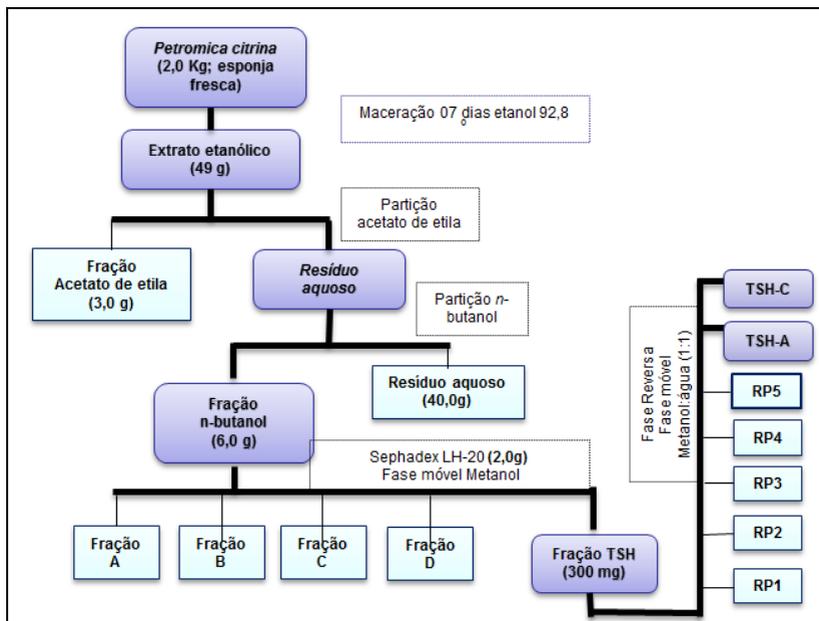
O processo de fracionamento foi produzido a partir da partição de um extrato bruto por solventes orgânicos de polaridade crescente, visto que a concentração de cada um dos componentes em cada fase estará relacionada com o coeficiente de partição ou distribuição de cada grupo de compostos nela contidos (Figura 5).

A partir do biofracionamento do extrato n-butanólico, foi possível isolar e identificar dois esteroides sulfatados (trissulfato de halistanol A e o trissulfato de halistanol C). O trissulfato de halistanol também foi isolado de outras espécies da família Halichondriidae, tais como *Pseudoaxinissa digitata* (BIFULCO et al., 1994), *Halicondria* cf. *moorei* e *Epipolasis* sp. (KANAZAWA et al., 1992; SLATE et al., 1994). O enxofre é o quarto elemento mais importante encontrado nos oceanos, principalmente acumulado em animais invertebrados, tais como as esponjas. Nesses animais, podem ser isolados esteroides com cadeias alifáticas de até quatro grupos sulfato (KORNPROBST et al., 1998).

---

<sup>a</sup> O fracionamento biomonitorado foi realizado pela Doutoranda Tatiana da Rosa Guimarães orientada pelo Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto, a quem agradecemos imensamente esta frutuosa colaboração.

## 66 Resultados e Discussão

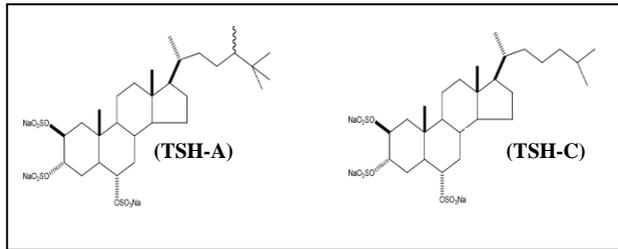


**Figura 5.** Esquema de obtenção de extratos e frações de *Petromica citrina*.

A partir da fração TSH (TSH-A e TSH-C) foram também realizados estudos de modificações estruturais, obtendo-se monossulfato de halistanol (MSH), dissulfato de halistanol (DSH) e halistanol dessulfatado (HD).

Os resultados obtidos indicaram que a presença de grupamentos sulfatos é importante para a atividade anti-herpética, uma vez que quanto mais sulfatada a molécula, maior foi a inibição observada. Semelhantemente, Bifulco et al. (1994) observaram que a ação anti-HIV *in vitro* do TSH-F e do TSH-G está relacionada com o número de grupamentos sulfato.

Dando continuidade aos estudos com a amostra denominada fração TSH, foram realizados estudos espectroscópicos e foi possível constatar que a mesma continha duas substâncias (TSH-A e TSH-C), que se diferenciam em relação à sua cadeia lateral (Figura 6).



**Figura 6.** Representação das substâncias TSH-A e TSH-C identificadas por estudos de RMN (Ressonância Magnética Nuclear).

Todos os compostos isolados foram avaliados quanto à sua potencial ação anti-herpética e os resultados constam na Tabela 5.

**Tabela 5.** Resultados da avaliação da citotoxicidade, em células Vero e da atividade anti-HSV-1 (cepa KOS) de uma fração de *Petromica citrina* e dos diferentes derivados testados do halistanol.

Amostras	CC <sub>50</sub> (µg/mL)	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	IS
Fração n-butanol <i>P. citrina</i>	>500,00	100,99± 19,65	>4,95
Fração TSH	44,05±2,52	2,87±0,78	15,33
HD	51,57±2,78	SA	--
MSH	31,85±1,72	SA	--
DSH	44,42±1,24	7,98±0,67	5,56
TSH-A	13,83±3,75	5,63±1,37	2,46
TSH-C	11,89±4,02	6,09± 1,51	1,95
ACV	>4,50	1,64±0,24	>2,74

CC<sub>50</sub> = concentração que reduziu em 50% a viabilidade das células Vero, CI<sub>50</sub> = concentração que inibiu 50% da replicação do HSV-1 (cepa KOS), IS = CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>, SA = sem atividade.

## 68 Resultados e Discussão

Conforme os resultados da Tabela 5 a fração TSH e os compostos TSH-A e TSH-C foram selecionados para realizar os estudos de mecanismo de ação. Apesar do DSH ter apresentado atividade, seu mecanismo não foi avaliado por ele não estar disponível em quantidade suficiente.

### **5.4 Avaliação do provável mecanismo de ação anti-herpética**

#### **5.4.1 Avaliação da ação virucida direta**

A primeira etapa do estudo do mecanismo da ação anti-herpética foi avaliar a interferência direta das amostras TSH, TSH-A e TSH-C sobre as partículas virais. Pois se sabe que, como qualquer outro fármaco antiviral, um produto de origem natural pode atuar diretamente nas mesmas, inativando-as (HUDSON; TOWERS, 1999).

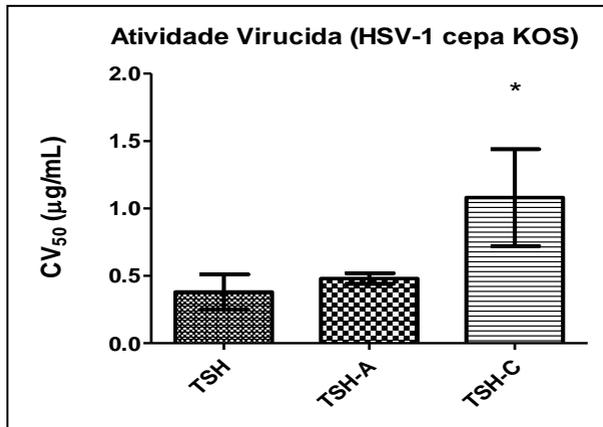
A inativação direta dos vírions pode ser causada pela sua desintegração completa, solubilização do envelope viral, modificações químicas, por degradação de algumas glicoproteínas essenciais do envelope (ZHU et al., 2004; BULTMANN et al., 2007) ou por similaridade com o receptor sulfato de heparana (SH) (GHOSH et al., 2009).

Com o intuito de investigar a possível atividade virucida das amostras, foram testadas concentrações 80x maiores que seus valores de  $CI_{50}$  (Tabela 5) e realizaram-se diluições seriadas (1:2), a partir da maior concentração. As concentrações utilizadas nesse ensaio foram muito superiores aos valores de  $CI_{50}$ , e isso pode ser justificado pela necessidade de verificar se a ação anti-herpética, determinada pelo ensaio de redução do número de placas de lise, foi acarretada pelo efeito direto das amostras sobre os vírus, antes do contato com as células hospedeiras.

Os resultados obtidos nesta avaliação mostram que o valor de  $CV_{50}$  do composto TSH-C foi significativamente maior em comparação aos valores obtidos para a fração TSH e o composto TSH-A, através do teste de Tukey ( $p < 0.05$ ) (Tabela 6 e Figura 7).

**Tabela 6.** Resultados da avaliação do efeito virucida frente ao vírus HSV-1 (cepa KOS), expressos como valores de  $CV_{50}$  (concentração de amostra virucida para 50% dos vírions) das amostras TSH, TSH-A e TSH-C.

Amostras	$CV_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>Fração TSH</b>	$0,38 \pm 0,12$
<b>TSH-A</b>	$0,48 \pm 0,04$
<b>TSH-C</b>	$1,08 \pm 0,36$



**Figura 7.** Resultados da avaliação do efeito virucida frente ao vírus HSV-1 (cepa KOS) das amostras TSH, TSH-A e TSH-C. Os valores obtidos representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. \* Diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ), teste de ANOVA/Tukey.

A relação dos valores de  $CV_{50}$  das amostras TSH, TSH-A e TSH-C com seus valores de  $CI_{50}$  foi 8X, 12X e 6X menores, respectivamente. Portanto, uma inativação parcial do HSV-1 pelas amostras poderia estar relacionada à ligação dos vírions com os sítios polares dos sulfatados, inibindo desta forma, os

## 70 Resultados e Discussão

estágios iniciais da replicação viral (adsorção e penetração). Estudos prévios relataram a atividade virucida do sulfato de halistanol e de um polissacarídeo sulfatado frente aos vírus HIV e HSV-2, respectivamente (BIFULCO et al., 1994; ZHU et al., 2004) e de polímeros sulfatados lipofílicos (EKBLAD et al., 2010).

A atividade anti-HSV-1 dos polissacarídeos sulfatados tem sido relacionada a diferentes fatores como a presença de cargas na molécula, as posições dos átomos de enxofre, e as ligações hidrofóbicas e hidrofílicas, que podem ocasionar rearranjos nas regiões hidrofóbicas dos complexos proteicos. As cadeias de oligossacarídeos podem se juntar aos receptores dos vírus e os bloquearem, deixando expostos os grupos hidrofóbicos, ou podem ligar-se irreversivelmente às proteínas dos vírions. Outra explicação do efeito virucida poderia ser a indução de diferentes sinais intercelulares, os quais poderiam aumentar a produção de interferon e, conseqüentemente, contribuir para a atividade antiviral (GHOSH et al., 2009; CARDOZO et al., 2011).

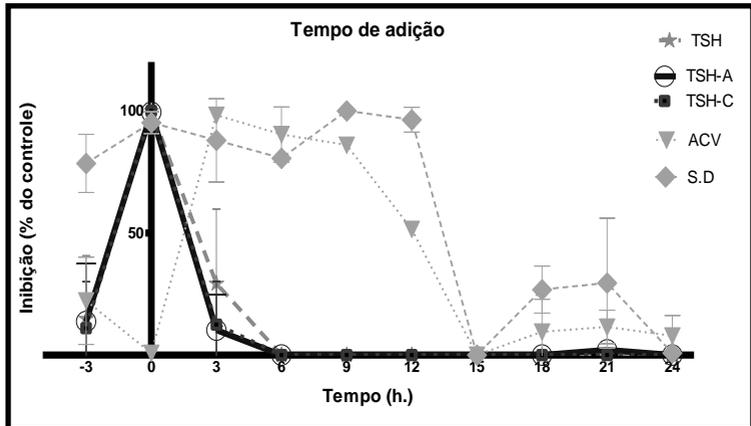
### **5.4.2 Avaliação do efeito do tempo de adição das amostras no ciclo de replicação viral**

A avaliação do tempo de adição das amostras foi realizada para determinar se além de apresentarem efeito virucida, elas interfeririam em outro(s) estágio(s) da replicação herpética. O ciclo de replicação dos vírus herpéticos tem duração de 18 h e caracteriza-se, resumidamente, pelo processo de entrada dos vírus nas células (adsorção e penetração), com subsequente expressão dos genes  $\alpha$  (imediatos), genes  $\beta$  (precoces) e genes  $\gamma$  (tardios) estruturais. Após esta biossíntese proteica, é iniciado o processo de maturação (montagem) e liberação viral, finalizando a replicação viral (ROIZMAN; KNIPE, 2007).

Neste ensaio, foi testada a  $2 \times CI_{50}$  para cada composto, sendo que tal concentração foi escolhida por ter provocado uma inibição de 90-100% nos ensaios de redução do número de placa de lise. Além disso, foi utilizado o aciclovir como controle

positivo para o HSV-1 (cepa KOS), na concentração de  $2 \times \text{CI}_{50}$ , a qual inibe 100% a replicação desta cepa.

Os resultados estão apresentados na Figura 9, que mostra a ação anti-HSV-1 (cepa KOS) do aciclovir e das amostras, em relação ao seu tempo de adição.



**Figura 8.** Efeito do tempo de adição das amostras fração TSH, TSH-A e TSH-C ( $2 \times \text{CI}_{50}$ ) no ciclo de replicação do HSV-1 (cepa KOS), em células Vero. Os resultados estão representados como % de inibição da replicação viral em relação ao controle viral, sem tratamento. Os valores obtidos representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. Sulfato de dextrana (S.D.).

A análise dos resultados indicou que o ACV exerce sua atividade antiviral se adicionado entre 3 e 9 h PI, pois em 12 h PI, tal atividade decai para aproximadamente 50%. Este dado confirma que o ACV atua realmente inibindo a replicação do DNA viral através da inibição da DNA polimerase viral.

O pré-tratamento foi realizado com a adição das amostras às células previamente à infecção (-3h), e os resultados obtidos mostraram que estas amostras não possuem efeito profilático *in vitro*, nas condições experimentais testadas.

## 72 Resultados e Discussão

O tratamento simultâneo foi realizado através da adição das amostras juntamente com os vírus, e os resultados obtidos indicaram que houve inibição dos estágios iniciais da infecção (adsorção e penetração) pelo HSV-1, o que foi confirmado através de outros experimentos específicos (itens 5.4.3 e 5.4.4), apresentados adiante.

Conforme a Figura 8, o efeito inibitório das amostras foi de 100% somente no tratamento simultâneo. Os percentuais de inibição do TSH, TSH-A e TSH-C, nos tratamentos 3h pós-infecção (PI), foram 29,33; 10,27 e 12,5% respectivamente, indicando uma fraca atividade na expressão das proteínas imediatas.

As amostras (TSH, TSH-A e TSH-C) (Figura 8) apresentaram os mesmos perfis de inibição da replicação viral. Isto era esperado devido à sua similaridade estrutural. Portanto, a avaliação do tempo de adição mostrou que as amostras parecem exercer sua atividade antiviral se forem adicionadas simultaneamente ou até 3 h, o que pode indicar uma inibição dos estágios iniciais da infecção, por efeito direto no HSV-1 ou na expressão das proteínas imediatas. Assim sendo, optou-se neste trabalho por realizar diversos experimentos envolvendo cada uma das etapas que ocorrem neste período para elucidar o mecanismo da ação anti-herpética detectada.

### **5.4.3 Avaliação do efeito das amostras na adsorção viral**

Todos os vírus contêm material proteico na sua superfície, como parte integral do capsídeo ou na forma de espículas do envelope viral. A principal função dessas proteínas de superfície é reconhecer especificamente as proteínas receptoras, que estão na superfície das células-alvo hospedeiras. Esse reconhecimento é similar a qualquer outra interação proteína-proteína, que ocorre através de uma rede estéreo-específica de ligações de hidrogênio e associações lipofílicas (CHALLAND; YOUNG).

No caso dos HSV, esse reconhecimento acontece via glicoproteínas do envelope (gC, gB e/ou gD) a um receptor

celular, o sulfato de heparana (SH), que é um glicosaminoglicano, sendo considerado o principal receptor de ligação dos HSV (GHOSH et al., 2009; WATANABE, 2010)

Experimentalmente, a adsorção viral ocorre a baixas temperaturas. A penetração dos vírus, que depende da temperatura de incubação das células, é realizada em 3 min por fagocitose ou fusão da membrana celular com o envelope viral, sendo que para o vírus penetrar no interior celular, esta temperatura precisa ser aumentada (COLBERE, 1975). Por isso, a avaliação do efeito de um composto no evento da adsorção viral deve ser realizada à baixa temperatura (4°C) para que o vírus se adsorva às células e, assim, apenas será avaliada a possível interferência da amostra nesta etapa do processo de replicação viral.

Como já foi citado anteriormente, o sulfato de heparana é um dos principais sítios da interação inicial de muitos vírus com as células susceptíveis, entre eles os HSV (BENDER et al., 2005). Esta interação pode ser intermediada por interações eletrostáticas entre os resíduos dos aminoácidos básicos das glicoproteínas gC e gB do envelope viral e os grupos sulfatados ou carboxilados carregados negativamente das moléculas do sulfato de heparana (NYBERG et al., 2004).

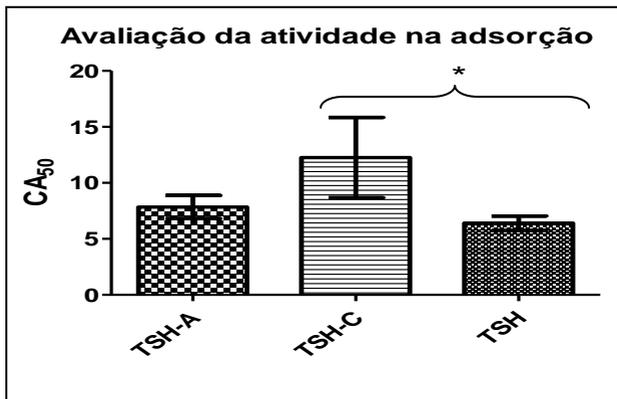
Este ensaio foi conduzido partindo-se de 4 x CI<sub>50</sub> µM das amostras e realizaram-se cinco diluições seriadas (1:2), a partir da maior concentração. O sulfato de dextrana (SD), composto similar à heparina, foi utilizado como controle positivo, já que sua capacidade de inibição da adsorção viral é bem conhecida (AGUILAR et al., 2007; SCHUKSZ et al., 2008). Os resultados obtidos constam da Tabela 7 e da Figura 9.

## 74 Resultados e Discussão

**Tabela 7.** Resultados do ensaio de inibição da adsorção viral, expressos como valores de  $CA_{50}$  (concentração que reduziu em 50% a adsorção viral nas células) das amostras TSH, TSH-A e TSH-C.

Amostras	$CA_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Fração TSH	$6,41 \pm 0,63^a$
TSH-A	$7,84 \pm 1,03^{ab}$
TSH-C	$12,26 \pm 3,58^b$
Sulfato de dextrana	$< 15,62$

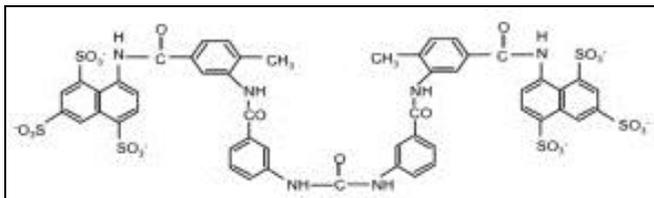
Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas, avaliando-se pelos testes ANOVA/Tukey ( $p < 0,05$ )



**Figura 9.** Resultados da avaliação do efeito das amostras fração TSH, TSH-A e TSH-C na adsorção do vírus HSV-1 (cepa KOS), em células Vero. Sulfato de dextrana (SD). Os valores obtidos representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. \* Diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) testes ANOVA/ Tukey.

Avaliando-se os dados referentes à inibição da adsorção (Figura 9), embora todas as amostras inibiram a adsorção do HSV-1, notou-se só uma diferença significativa entre as amostras fração TSH e TSH-C. Este mecanismo de ação anti-herpética poderia ser atribuído ao bloqueio das interações ligante-receptor. Estudos prévios em compostos polissulfatados, similares aos glicosaminoglicanos (como o sulfato de heparana), inibiram a adesão dos vírus às células, atuando possivelmente na adsorção ou na penetração viral (EKBLAD et al., 2010). Os dados obtidos neste ensaio corroboram com os resultados obtidos no tratamento simultâneo (item 5.4.2).

Uma possível explicação destes resultados seria que as amostras poderiam estar competindo por afinidade com o SH, tendo um comportamento similar ao de alguns polissacarídeos sulfatados, como já foi relatado nos estudos realizados por Ekblad et al (2010) com o composto glicosídeo de colestanila, um tetrassacarídeo sulfatado, similar aos esteroides testados. Este grupo descreveu uma forte atividade anti-herpética apenas no tratamento simultâneo, possivelmente pela inserção deste grupo atuando no envelope viral. Aguilar et al. (1999) reportaram que a suramina, outro composto sulfatado, pode interferir em diferentes etapas da infecção viral e não só na adsorção do vírus. Cardozo et al. (2011) também relataram a inibição da adsorção do HSV-1 por dois polissacarídeos sulfatados.



**Figura 10.** Estrutura da suramina. Fonte: (PIRRONE et al., 2011).

#### 5.4.4 Avaliação do efeito das amostras na penetração viral

Após a adsorção dos vírus às células, é necessário que os mesmos insiram seu material genético e suas proteínas no interior das células, e para tal, os vírus necessitam penetrar na membrana plasmática celular. Os compostos que agem inibindo ou desregulando esta etapa interferem no processo de fusão do vírus com a membrana plasmática e/ou desnudamento viral (DE LOGU et al., 2000; GHOSH et al., 2009).

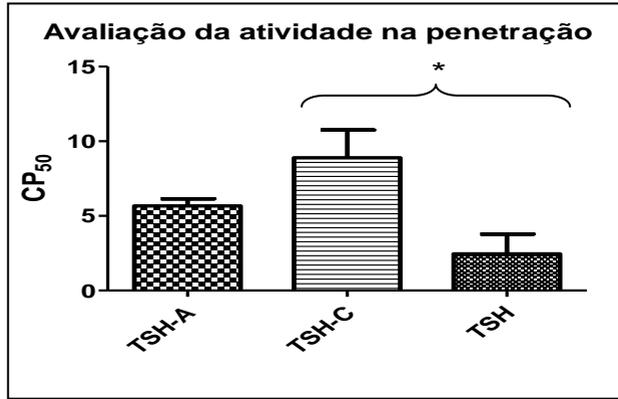
Considerando-se que os vírus adsorvem nas células a 4°C e as penetram somente quando a temperatura é elevada (MCCLAIN; FULLER, 1994), a infecção viral foi realizada em células que haviam sido resfriadas, garantindo que os vírus apenas adsorveriam nas células e as penetrariam somente quando a temperatura de 37°C fosse restabelecida.

Este ensaio foi conduzido partindo-se de 4 x  $CI_{50}$  das amostras e realizaram-se cinco diluições seriadas (1:2), a partir da maior concentração. O sulfato de dextrana foi utilizado como controle positivo, já que sua capacidade de inibição da penetração viral também é conhecida (AGUILAR et al., 2007). Os resultados obtidos constam da Tabela 8 e da Figura 10.

**Tabela 8.** Resultados do ensaio de inibição da penetração viral, expressos como valores de  $CP_{50}$  (concentração que reduziu em 50% a penetração viral nas células) das amostras TSH, TSH-A e TSH-C.

Amostras	$CP_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>Fração TSH</b>	2,45±1,33
<b>TSH-A</b>	5,67±0,47
<b>TSH-C</b>	8,90±1,86
<b>Sulfato de dextrana</b>	< 15,62

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas, avaliando-se pelos testes ANOVA/Tukey ( $p < 0,05$ )



**Figura 11.** Resultados da avaliação do efeito das amostras TSH, TSH-A e TSH-C na penetração do vírus HSV-1 (cepa KOS), em células Vero. Os resultados representam a média de três experimentos independentes e foram expressos como percentuais de inibição da penetração, em relação aos controles virais, sem tratamento. Sulfato de dextrana (SD). Os valores obtidos representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. \* Diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) testes ANOVA/ Tukey.

Avaliando os dados referentes à inibição da penetração das amostras fração TSH, TSH-A e TSH-C (Tabela 8 e Figura 10), assim como no ensaio de avaliação da adsorção viral, todas as amostras inibiram a penetração e só se apresentaram diferenças estatísticas significativas entre a fração TSH e TSH-C. Estes resultados são corroborados por outros autores que avaliaram o mecanismo de ação de polissacarídeos sulfatados (AGUILAR et al., 2007; CARDOZO et al., 2011) e verificaram a inibição da adsorção e da penetração do HSV ou a passagem entre célula e célula (OLOFSSON; BERGSTRÖM, 2005). Estudos realizados por Aguilar et al. (1999) com suramina e por Nyberg et al. (2004) com o composto PI-88 demonstraram que estes compostos polissulfatados possuem efeito inibitório da propagação intercelular viral, atuando possivelmente no montagem dos novos vírions. Desta maneira, as amostras fração TSH, TSH-A e TSH-C, além de inibirem substancialmente a adsorção viral,

## 78 Resultados e Discussão

apresentaram também atividade importante efeito na penetração do HSV-1 (cepa KOS), em células Vero, o que corrobora os resultados obtidos no tratamento simultâneo (item 5.4.2).

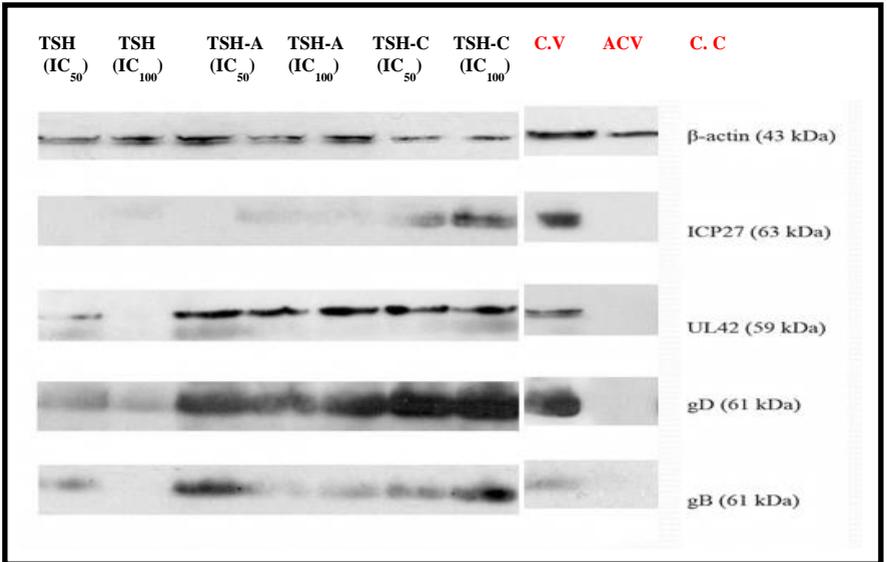
### 5.4.5 Avaliação do efeito das amostras na expressão das proteínas virais

A expressão das proteínas virais ICP27 ( $\alpha$ ), UL42 ( $\beta$ ), gB e gD ( $\gamma$ ) e da proteína constitutiva celular,  $\beta$ -actina foi analisada pelo método de *Western blotting*.

Como foi relatado nos resultados do tempo de adição das amostras, sugere-se que o mecanismo de ação das amostras TSH, TSH-A e TSH-C poderia ocorrer simultaneamente com a inibição da expressão proteica, ou seja, após a síntese do RNAm, então, foi avaliado se esta atividade estava relacionada ao processo de síntese das proteínas virais em células Vero infectadas com o HSV-1 (cepa KOS).

Os tratamentos das células Vero infectadas com HSV-1 foram efetuados, separadamente, com as amostras TSH, TSH-A e TSH-C, nas concentrações que inibiram 50 a 100% da replicação viral. Dessa forma, as amostras e o aciclovir (controle positivo) foram testadas no valor da 1x CI<sub>50</sub> e 2x CI<sub>50</sub>. Os tratamentos foram realizados após 1h de adsorção viral e seu término ocorreu 18h P.I., quando completou um ciclo da replicação viral. Assim, as proteínas foram extraídas (aproximadamente 5  $\mu$ g) e analisadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para posterior realização da reação com os respectivos anticorpos.

Os resultados obtidos com esta estratégia metodológica estão representados na Figura 11. A  $\beta$ -actina, proteína celular constitutiva, foi expressa em todos os tratamentos, o que significa que as amostras não interferiram na homeostase celular, e que a mesma quantidade de proteínas foi adicionada em todas as reações. Ainda de acordo com a Figura 11, constata-se que as proteínas virais não foram detectadas nas células não infectadas (CC= controle celular) e que todos esses produtos gênicos foram detectados nas células infectadas e não tratadas (CV= controle viral).



**Figura 12.** Efeitos das amostras fração TSH, TSH-A e TSH-C na expressão das proteínas ICP27, UL42, gD e gB do HSV-1 (cepa KOS), em células Vero, e da proteína constitutiva β-actina, detectados por *Western Blotting*. Coluna 1: células infectadas e tratadas com 1 x CI<sub>50</sub> TSH; Coluna 2: células infectadas e tratadas com 2 x CI<sub>50</sub> TSH; Coluna 3: células infectadas e tratadas com 1 x CI<sub>50</sub> TSH-A; Coluna 4: células infectadas e tratadas com 2 x CI<sub>50</sub> TSH-A; Coluna 5: células infectadas e tratadas com 1 x CI<sub>50</sub> TSH-C. Coluna 6: células infectadas e tratadas com 2 x CI<sub>50</sub> TSH-C; Coluna 7: células infectadas e sem tratamento (controle viral - CV); Coluna 8: células infectadas e tratadas com 2 x CI<sub>50</sub> de aciclovir (ACV); Coluna 9: células não infectadas (controle celular - CC).

Assim, esses resultados sugerem que o TSH foi o único composto capaz de reduzir a expressão de todas as proteínas testadas. A expressão da proteína imediata ICP27 (α) do HSV-1 (cepa KOS) foi assim mesmo reduzida por todas as amostras, confirmando que elas interferem nos eventos imediatos da replicação deste vírus. Além da inibição da proteína ICP27, observou-se a inibição da glicoproteína gB, sintetizada na fase tardia.

## 80 Resultados e Discussão

A interferência na fase imediata ( $\alpha$ ) promove uma alteração em praticamente todo o restante do ciclo replicativo viral, visto que as proteínas desta fase são essenciais na indução e na regulação da replicação viral. Os baixos níveis de proteínas de fase tardia ( $\gamma$ ) mostraram que houve inibição da síntese do nucleocapsídeo e de todas as outras proteínas estruturais, impedindo provavelmente a montagem de novos vírions e a infecção de células adjacentes (ROIZMAN; KNIPE, 2007).

A ICP27 é uma proteína multifuncional, essencial na replicação do HSV-1, que é expressa durante a fase imediata, sendo requerida para a expressão apropriada dos genes virais das fases precoce e tardia. Entre suas funções está redistribuir os complexos ribonucleoproteicos; interferir no processo de *splicing* (= remoção dos íntrons) dos transcritos imediatos (AMOR et al., 2011); transportar RNAs tardios do núcleo para o citoplasma; e bloquear o processamento do mRNA, acarretando a diminuição da produção de proteínas celulares (SMITH et al., 2005). Assim, a proteína ICP27 é de fundamental importância para todas as etapas dos processos de transcrição e tradução viral (BAI-JU et al., 2006).

Como pode ser visto na Figura 11, a ICP27 teve sua expressão bastante reduzida pelas amostras, sendo que esta redução poderia ser a causa da inibição ou da redução da síntese da proteína gB viral, conforme pode também ser observado nesta mesma Figura 11.

Estes resultados podem ser correlacionados com aqueles obtidos e apresentados no item 5.4.2, quando foi demonstrado que as amostras fração TSH, TSH-A e TSH-C exercem sua ação antiviral se forem adicionados até 3h P.I., sendo que neste período de tempo ocorrerá a expressão de todas as proteínas imediatas virais (COLBERE, 1975).

Em relação ao tratamento com o fármaco aciclovir (ACV), foi observada uma leve inibição da expressão proteica, ou seja, as proteínas ICP27 e gB foram parcialmente inibidas. O aciclovir quando em contato com uma célula infectada pelo HSV, é fosforilado pela TK viral e as demais fosforilações são realizadas pelas TKs celulares, até a sua forma trifosfatada, que é

a forma ativa. O trifosfato de aciclovir irá interferir no funcionamento da DNA polimerase viral, pois é um análogo de nucleosídeo, que será incorporado no DNA viral que está em processo de síntese, inibindo o término da síntese da cadeia do DNA viral e sua consequente replicação (BRADY; BERNSTEIN, 2004). Assim, na maior concentração testada,  $2 \times CI_{50}$ , o aciclovir, apresentou um menor número de vírions formados, possivelmente como produto da inibição da replicação do DNA e não à capacidade de inibição de alguma fase da síntese proteica.

#### **5.4.6 Avaliação da potencial atividade sinérgica das amostras**

O potencial efeito sinérgico das amostras combinadas entre elas ou com o aciclovir foi avaliado pelo método de redução do número de placa de lise (4.5.1). Esse ensaio foi conduzido conforme descrito por Chou (2006), partindo-se de concentrações 2x maiores que os valores de  $CI_{50}$  das amostras (fração TSH, TSH-A e TSH-C), realizando-se duas diluições seriadas (1:2), a partir da maior concentração. O aciclovir foi utilizado por sua conhecida atividade anti-herpética. Os resultados obtidos constam da Tabela 9.

O grau de interação entre as amostras e o aciclovir foi calculado através da equação do índice combinatório (IC); usando o *software* Calculusyn™ (versão 2.1, Biosoft). De acordo com os valores de IC, diferentes graus de sinergismo ou antagonismo podem ser determinados, conforme mostra o Quadro 9.

## 82 Resultados e Discussão

**Quadro 9.** Valores quantitativos dos índices combinatórios (IC), calculados com o *software* Calcusyn™, que quantificam as interações entre as amostras testadas.

Faixa IC	Símbolo	Descrição	Faixa IC	Símbolo	Descrição
0,1- 0,3	++++	Sinergismo forte	1,1- 1,2	-	Antagonismo fraco
0,3- 0,7	+++	Sinergismo	1,2- 1,45	--	Antagonismo moderado
0,7- 0,85	++	Sinergismo moderado	1,45- 3,3	---	Antagonismo
0,85-0,9	+	Sinergismo fraco	3,3-10	----	Antagonismo forte
0,9-1,1	±	Efeito aditivo			

Fonte: (CHOU, 2006).

**Tabela 9.** Efeitos da combinação das amostras TSH, TSH-A e TSH-C com o aciclovir e entre si, em relação à ação anti-herpética das mesmas.

Amostras	2 X CI <sub>50</sub>	1 X CI <sub>50</sub>	0,5 X CI <sub>50</sub>
ACV+TSH	0,113 (++++)	1,033 (±)	1,253 (--)
ACV+TSH-A	0,745 (++)	1,21 (--)	1,243 (--)
ACV+TSH-C	0,102 (++++)	1,169 (-)	1,202 (--)
TSH-A+TSH-C	0,197 (++++)	0,146 (++++)	0,131 (++++)
ACV+ TSH-A+TSH-C	0,104 (++++)	1,557 (--)	1,121 (-)

TSH-A (2x CI<sub>50</sub>=14.92C; 1x CI<sub>50</sub>=7.46µM; 0,5xCI<sub>50</sub>=3.73µM), TSH-C (2x CI<sub>50</sub>=16.78µM; 1x CI<sub>50</sub>=8.39µM; 0,5x CI<sub>50</sub>=4.19µM); TSH (2x CI<sub>50</sub>=8.34µg/mL; 1x CI<sub>50</sub>=4.17µg/mL; 0,5x CI<sub>50</sub>=2.08 µg/mL); ACV (2x CI<sub>50</sub>=20µM; 1x CI<sub>50</sub>=10µM; 0,5x CI<sub>50</sub>=5µM).

Os resultados obtidos sugerem um efeito sinérgico entre as amostras TSH, TSH-A e TSH-C em associação com o aciclovir, quando testadas na maior concentração testada ( $2 \times CI_{50}$ ). Quando as amostras TSH-A+TSH-C foram testadas em associação, o efeito sinérgico foi detectado nas três concentrações testadas. Nas outras situações experimentais, foram detectados diferentes graus de antagonismo, com exceção da associação ACV+TSH, na concentração intermediária testada ( $1 \times CI_{50}$ ), quando foi detectado um efeito aditivo.

Uma possível explicação dos resultados obtidos seria que quando as amostras associadas com o aciclovir apresentaram efeito sinérgico, elas poderiam estar atuando em etapas diferentes da infecção viral, que não aquela na qual o ACV age, o que pode ser considerado um resultado interessante.

O efeito sinérgico de compostos que atingem vários destinos pode ser relacionado ao aumento da eficiência da combinação dos mesmos, quando em comparação aos compostos isolados, reduzindo a toxicidade, diminuindo os efeitos adversos, e/ou incrementando a biodisponibilidade, o que poderia levar a uma diminuição da dose e poderia também auxiliar na redução da resistência viral aos tratamentos disponíveis (ULRICH-MERZENICH et al., 2010; VAN VUUREN; VILJOEN, 2011).

Estudos prévios realizados com compostos que apresentam atividade anti-herpética, tais como compostos polissulfatados (CARDOZO et al., 2011), docosanol (MARCELLETTI, 2002) e oxiresveratrol (CHUANASA et al., 2008) corroboram os resultados aqui obtidos ao apresentarem melhor atividade antiviral quando combinados com o aciclovir.

### **5.5 Proposta do mecanismo de ação dos derivados do halistanol**

Em resumo, com base nos resultados preliminares obtidos, nas condições experimentais testadas, pode-se postular que as amostras fração TSH, TSH-A e TSH-C apresentam perfis similares de atividade anti-herpética e virucida frente ao HSV-1 (cepa KOS), com graus de eficiência distintos, mas agindo sempre através da inibição da adsorção e da penetração viral, e da expressão de determinadas proteínas virais. Assim, estas amostras poderiam ser consideradas como potenciais candidatos a fármacos antivirais, atuando independentemente ou em combinação com o aciclovir. No entanto, para tal, ainda são necessários inúmeros outros estudos.

## 6 CONCLUSÕES

- Dos extratos e frações testados oriundos da biodiversidade terrestre e marinha, somente a fração acetato de etila de *Echinodorus grandiflorus* e a fração n-butanólica de *Petromica citrina* apresentaram atividade antiviral contra o HSV-1 (cepa KOS), nas concentrações testadas.
- Nenhum dos compostos isolados da biodiversidade terrestre apresentou atividade antiviral contra o HSV-1.
- A fração TSH, obtido a partir da fração n-butanólica de *P. citrina*, apresentou atividade anti-herpética contra o HSV-1.
- O nível de sulfatação do halistanol está diretamente relacionado com a atividade anti-HSV-1 detectada.
- As amostras fração TSH, TSH-A e TSH-C mostraram ação virucida direta.
- Na avaliação da atividade em função do tempo, as amostras fração TSH, TSH-A e TSH-C inibiram a infecção pelo HSV-1, ao serem adicionadas simultaneamente com o vírus e até 3h PI.
- As amostras fração TSH, TSH-A e TSH-C inibiram a adsorção e a penetração do HSV-1 nas células Vero.
- Na avaliação da interferência sobre a síntese proteica do HSV-1 (cepa KOS), as amostras fração TSH, TSH-A e TSH-C reduziram, em diferentes graus, a expressão das proteínas ICP27 ( $\alpha$ ) e gB ( $\gamma$ ), mas a expressão das proteínas gD ( $\gamma$ ) e UL42 ( $\beta$ ) não foi alterada.
- Nas condições experimentais testadas, as amostras apresentaram efeito sinérgico ou antagônico, quando foram combinadas com o aciclovir, dependendo da concentração usada das mesmas.



## 7 PERSPECTIVAS

- Avaliar o mecanismo de ação anti-herpético da fração EG3 da planta *Echinodorus grandiflorus*.
- Avaliar a integridade dos vírions, após contato com as amostras fração TSH, TSH-A e TSH-C, por microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliar o efeito das amostras fração TSH, TSH-A e TSH-C na síntese do DNA viral em células Vero, utilizando a técnica do PCR e iniciadores específicos;
- Avaliar o efeito das amostras fração TSH, TSH-A e TSH-C durante o processo de transcrição (mRNA) em células Vero, verificando se há inibição da formação dos mRNA, que poderia causar interferência na produção das proteínas nas células tratadas, através da técnica do RT-PCR;
- Verificar os efeitos das amostras fração TSH, TSH-A e TSH-C quando combinadas com o sulfato de dextrana;
- Avaliar a possível atividade anti-HSV-1 (cepa resistente ao aciclovir 29R) e anti-HSV-2 (cepa 333) das amostras fração TSH, TSH-A e TSH-C;
- Avaliar o efeito das amostras fração TSH, TSH-A e TSH-C sobre a liberação viral;
- Avaliar o efeito das amostras fração TSH, TSH-A e TSH-C na propagação intercelular viral.



## REFERÊNCIAS

ADVANI, S. J.; BRANDIMARTI, R.; WEICHSELBAUM, R. R.; ROIZMAN, B. The Disappearance of Cyclins A and B and the Increase in Activity of the G2/M-Phase Cellular Kinase cdc2 in Herpes Simplex Virus 1-Infected Cells Require Expression of the  $\alpha 22/US1.5$  and UL13 Viral Genes. **Journal of Virology**, v.74, n.1, p.8-15, 2000.

AGUILAR, J. S.; HELD, K. S.; WAGNER, E. K. Herpes Simplex Virus type 1 shows multiple interactions with sulfonated compounds at binding, penetration, and cell-to-cell passage. **Virus Genes**, v.34, n.3, p.241-248, 2007.

AGUILAR, J. S.; RICE, M.; WAGNER, E. K. The polysulfonated compound suramin blocks adsorption and lateral diffusion of Herpes Simplex Virus type-1 in Vero cells. **Virology**, v.258, n.1, p.141-151, 1999.

AMOR, S.; STRASSHEIM, S.; DAMBRINE, G.; REMY, S.; RASSCHAERT, D.; LAURENT, S. ICP27 protein of Marek's disease virus interacts with SR proteins and inhibits the splicing of cellular telomerase chTERT and viral vIL8 transcripts. **Journal of General Virology**, v.92, n.6, p.1273-1278, 2011.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; ANTONIO, R. V.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. Cytotoxicity and Potential Antiviral Evaluation of Violacein Produced by *Chromobacterium violaceum*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.6, p.843-848, 2003.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; SINCERO, T. C. M.; DA SILVA, A. C.; SAVI, L. A.; GAIDO, C. M.; BETTEGA, J. M. R.; MANCINI, M.; DE ALMEIDA, M. T. R.; BARBOSA, R. A.; FARIAS, M. R.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. **Fitoterapia**, v.76, n.3-4, p.374-378, 2005.

## 90 Referências

BACON, T. H.; LEVIN, M. J.; LEARY, J. J.; SARISKY, R. T.; SUTTON, D. Herpes Simplex Virus Resistance to Acyclovir and Penciclovir after Two Decades of Antiviral Therapy. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n.1, p.114-128, 2003.

BAI-JU, J. Q.; LI, L.; JOHNSON, L. A.; SANDRI-GOLDIN, R. M. ICP27 interacts with the C-terminal domain of RNA polymerase II and facilitates its recruitment to herpes simplex virus 1 transcription sites, where it undergoes proteasomal degradation during infection. **Journal of Virology**, v.80, n.7, p.3567-3581, 2006.

BENDER, F. C.; WHITBECK, J. C.; LOU, H.; COHEN, G. H.; EISENBERG, R. J. Herpes Simplex Virus Glycoprotein B Binds to Cell Surfaces Independently of Heparan Sulfate and Blocks Virus Entry. **Journal of Virology**, v.79, n.18, p.11588-11597, September 15, 2005, 2005.

BERTOL, J. W.; RIGOTTO, C.; DE PÁDUA, R. M.; KREIS, W.; BARARDI, C. R. M.; BRAGA, F. C.; SIMÕES, C. M. O. Antiherpes activity of glucoevatromonoside, a cardenolide isolated from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata*. **Antiviral Research**, v.92, n.1, p.73-80, 2011.

BETTEGA, J. M. R.; TEIXEIRA, H.; BASSANI, V. L.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. Evaluation of the antiherpetic activity of standardized extracts of *Achyrocline satureioides*. **Phytotherapy Research**, v.18, n.10, p.819-823, 2004.

BIANCO, É. M.; DE OLIVEIRA, S. Q.; RIGOTTO, C.; TONINI, M. L.; GUIMARÃES, T. D. R.; BITTENCOURT, F.; ARESI, C.; DE ALMEIDA, M. T. R.; MORITZ, M. I. G.; CARRARO, J. L.; LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; REGINATTO, F. H.; STEINDEL, M.; SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. Anti-Infective Potential of Marine Invertebrates and Seaweeds from the Brazilian Coast. **Marine Drugs**, 2013, submetido.

BIFULCO, G.; BRUNO, I.; MINALE, L.; RICCIO, R. Novel HIV-inhibitory halistanol sulfates F-H from a marine sponge,

Pseudoaxinissa digitata. **Journal of Natural Products**, v.57, n.1, p.164-167, 1994.

BOEHMER, P. E.; LEHMAN, I. R. Herpes simplex virus DNA replication. **Annual Review of Biochemistry**, v.66, p.347-384, 1997.

BOONKAEW, T.; CAMPER, N. D. Biological activities of *Ginkgo* extracts. **Phytomedicine**, v.12, n.4, p.318-323, 2005.

BRADFORD, M. a rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRADY, R. C.; BERNSTEIN. Treatment of Herpes Simplex Virus infections. **Antiviral Research**, v.61, n.2, p.73-81, 2004.

BULTMANN, H.; TEUTON, J.; BRANDT, C. R. Addition of a C-terminal cysteine improves the anti-Herpes Simplex Virus activity of a peptide containing the human immunodeficiency virus type 1 TAT protein transduction domain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, n.5, p.1596-1607, 2007.

BURLESON, F. G.; CHAMBERTS, T. M.; WIEDBRAUK, D. L. **Virology: A laboratory manual**. Academic ed. San Diego. 1992

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: Natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, v.25, n.3, p.475-516, 2008.

CARDOZO, F. T. G. S.; CAMELINI, C. M.; MASCARELLO, A.; JOSÉ ROSSI, M.; JOSÉ NUNES, R.; MONTE BARARDI, C. R.; DE MENDONÇA, M. M.; SIMÕES, C. M. O. Antiherpetic activity of a sulfated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* mycelia. **Antiviral Research**, v.92, n.1, p.108-114, 2011.

CARRIEL-GOMES, M. C.; KRATZ, J. M.; BARRACCO, M. A.; BACHÈRE, E.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. In vitro antiviral activity of antimicrobial peptides against Herpes Simplex

## 92 Referências

Virus 1, adenovirus, and rotavirus. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n.4, p.469-472, 2007.

CARRIEL-GOMES, M. C.; KRATZ, J. M.; MÜLLER, V. D. M.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. Evaluation of antiviral activity in hemolymph from oysters *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas*. **Aquatic Living Resources**, v.19, n.2, p.189-193, 2006.

CARVALHO, A.; BLUM-SILVA, C. H.; CALVETE, E.; REGINATTO, F. H.; SIMÕES, C. M. O. Anti HSV-1 activity of five strawberry cultivars. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.31, n.1, p.133-137, 2012.

CHALLAND, R.; YOUNG, R. J. Antiviral Chemotherapy. PRESS, O. U. New York 1998

CHATTOPADHYAY, D.; KHAN, M. T. H. Ethnomedicines and ethnomedicinal phytophores against herpesviruses. **Biotechnology Annual Review**, v.14, p.297-348, 2008.

CHENG, H. Y.; LIN, T. C.; YANG, C. M.; WANG, K. C.; LIN, L. T.; LIN, C. C. Putranjivain A from *Euphorbia jolkini* inhibits both virus entry and late stage replication of Herpes Simplex Virus type 2 in vitro. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.53, n.4, p.577-583, 2004.

CHOU, T. C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacological Reviews**, v.58, n.3, p.621-681, 2006.

CHUANASA, T.; PHROMJAI, J.; LIPIPUN, V.; LIKHITWITAYAWUID, K.; SUZUKI, M.; PRAMYOTHIN, P.; HATTORI, M.; SHIRAKI, K. Anti-Herpes Simplex Virus (HSV-1) activity of oxyresveratrol derived from Thai medicinal plant: Mechanism of action and therapeutic efficacy on cutaneous HSV-1 infection in mice. **Antiviral Research**, v.80, n.1, p.62-70, 2008.

COEN, D. M.; SCHAFFER, P. A. Antiherpesvirus drugs: A promising spectrum of new drugs and drug targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.2, n.4, p.278-288, 2003.

COLBERE, F. L'herpès simplex: structure, replication et biologie. **Bulletin de l'Institut Pasteur**, v.73, p.203-254, 1975.

CONDIT, R. C. Principles of virology. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRAUSS, S. E. (Ed.). **Fields Virology** 5th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 25-57.

COS, P.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, v.106, n.3, p.290-302, 2006.

DA SILVA, A. C.; KRATZ, J. M.; FARIAS, F. M.; HENRIQUES, A. T.; DOS SANTOS, J.; LEONEL, R. M.; LERNER, C.; MOTHE, B.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. In vitro antiviral activity of marine sponges collected off Brazilian coast. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.29, n.1, p.135-140, 2006.

DE CLERCQ, E. Another ten stories in antiviral drug discovery (Part C): "Old" and "new" antivirals, strategies, and perspectives. **Medicinal Research Reviews**, v.29, n.4, p.611-645, 2009a.

DE CLERCQ, E. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.33, n.4, p.307-320, 2009b.

DE CLERCQ, E. Antiviral chemotherapy in 2009: Quo vadis? **Future Virology**, v.4, n.4, p.313-315, 2009c.

DE CLERCQ, E. Antiretroviral drugs. **Current Opinion in Pharmacology**, v.10, n.5, p.507-515, 2010.

## 94 Referências

DE CLERCQ, E. A 40-year journey in search of selective antiviral chemotherapy. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.51, p.1-24, 2011.

DE JALÓN, E. G.; BLANCO-PRÍETO, M. J.; YGARTUA, P.; SANTOYO, S. Increased efficacy of acyclovir-loaded microparticles against Herpes Simplex Virus type 1 in cell culture. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.56, n.2, p.183-187, 2003.

DE LOGU, A.; LOY, G.; PELLERANO, M. L.; BONSIGNORE, L.; SCHIVO, M. L. Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to-cell virus spread by Santolina insularis essential oil. **Antiviral Research**, v.48, n.3, p.177-185, 2000.

DE SOUZA, G.; HAAS, A. P. S.; VON POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E. E. S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, n.1, p.135-143, 2004.

DUTRA, R. C.; TAVARES, C. Z.; FERRAZ, S. O.; SOUSA, O. V.; PIMENTA, D. S. Investigação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato metanólico dos rizomas de *Echinodorus grandiflorus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.469-474, 2006.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B. J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J. C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v.40, n.2-3, p.193-236, 2002.

EKBLAD, M.; ADAMIAK, B.; BERGSTROM, T.; JOHNSTONE, K. D.; KAROLI, T.; LIU, L.; FERRO, V.; TRYBALA, E. A highly lipophilic sulfated tetrasaccharide glycoside related to muparfostat (PI-88) exhibits virucidal activity against Herpes Simplex Virus. **Antiviral Research**, v.86, n.2, p.196-203, 2010.

EKBLAD, M.; BERGSTRÖM, T.; BANWELL, M. G.; BONNET, M.; RENNER, J.; FERRO, V.; TRYBALA, E. Anti-Herpes Simplex Virus activities of two novel disulphated cyclitols. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v.17, n.2, p.97-106, 2006.

FREITAS, A. M. **Avaliação da atividade antiviral de extratos de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, Araucariaceae**. 2001. 84 f. Dissertação - (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

GARCIA, E. D. F.; DE OLIVEIRA, M. A.; GODIN, A. M.; FERREIRA, W. C.; BASTOS, L. F. S.; COELHO, M. D. M.; BRAGA, F. C. Antiedematogenic activity and phytochemical composition of preparations from *Echinodorus grandiflorus* leaves. **Phytomedicine**, v.18, n.1, p.80-86, 2010.

GHOSH, T.; CHATTOPADHYAY, K.; MARSCHALL, M.; KARMAKAR, P.; MANDAL, P.; RAY, B. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: From structure-activity analysis to clinical evaluation. **Glycobiology**, v.19, n.1, p.2-15, 2009.

GILBERT, C.; BESTMAN-SMITH, J.; BOIVIN, G. Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: Clinical impacts and molecular mechanisms. **Drug Resistance Updates**, v.5, n.2, p.88-114, 2002.

GONZALEZ, F. G.; DI STASI, L. C. Anti-ulcerogenic and analgesic activities of the leaves of *Wilbrandia ebracteata* in mice. **Phytomedicine**, v.9, n.2, p.125-134, 2002.

GUPTA, R.; WARREN, T.; WALD, A. Genital herpes. **Lancet**, v.370, n.9605, p.2127-2137, 2007.

HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; MORITA, N. Mechanism of action of the antiherpesvirus biflavone ginkgetin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.36, n.9, p.1890-1893, September 1, 1992, 1992.

HELDWEIN, E. E.; LOU, H.; BENDER, F. C.; COHEN, G. H.; EISENBERG, R. J.; HARRISON, S. C. Crystal structure of

## 96 Referências

glycoprotein B from Herpes Simplex Virus 1. **Science**, v.313, n.5784, p.217-220, 2006.

HENAFF, D.; RADTKE, K.; LIPPÉ, R. Herpesviruses Exploit Several Host Compartments for Envelopment. **Traffic**, v.13, n.11, p.1443-1449, 2012.

HU, J. M.; HSIUNG, G. D. Evaluation of new antiviral agents: I. In vitro perspectives. **Antiviral Research**, v.11, n.5-6, p.217-232, 1989.

HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N. Phytomedicines as antivirals. **Drugs of the future**, v.24, n.3, p.295-320, 1999.

HUNT, R. Microbiology and Immunology Online. Carolina: University of South Carolina 2010.

JOHNSON, D. C.; WISNER, T. W.; WRIGHT, C. C. Herpes Simplex Virus Glycoproteins gB and gD Function in a Redundant Fashion To Promote Secondary Envelopment. **Journal of Virology**, v.85, n.10, p.4910-4926, 2011, 2011.

JONES, P. S. Strategies for antiviral drug discovery. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v.9, n.4, p.283-302, 1998.

KANAZAWA, S.; FUSETANI, N.; MATSUNAGA, S. Halistanol sulfates A-E, new steroid sulfates, from a marine sponge, *Epipolasis* sp. **Tetrahedron**, v.48, n.26, p.5467-5472, 1992.

KHAN, M. T. H.; ATHER, A.; THOMPSON, K. D.; GAMBARI, R. Extracts and molecules from medicinal plants against Herpes Simplex Viruses. **Antiviral Research**, v.67, n.2, p.107-119, 2005.

KINGSTON, D. G. I. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. **Journal of Natural Products**, v.74, n.3, p.496-511, 2011.

KLEYMANN, G. Agents and strategies in development for improved management of herpes simplex virus infection and disease.

**Expert Opinion on Investigational Drugs**, v.14, n.2, p.135-161, 2005.

KNIPE, D. M.; SAMUEL, C. E.; PALESE, P. Virus-Host Cell Interactions In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRAUSS, S. E. (Ed.). **Fields Virology**. 5th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 118-149.

KORNPROBST, J. M.; SALLENAVE, C.; BARNATHAN, G. Sulfated compounds from marine organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part. B, Biochemistry and Molecular Biology**, v.119, n.1, p.1-51, 1998.

KOSSUGA, M. H.; DE LIRA, S. P.; NASCIMENTO, A. M.; GAMBARDELLA, M. T. P.; BERLINCK, R. G. S.; TORRES, Y. R.; NASCIMENTO, G. G. F.; PIMENTA, E. F.; SILVA, M.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; TEMPONE, A. G.; MELHEM, M. S. C.; DE SOUZA, A. O.; GALETTI, F. C. S.; SILVA, C. L.; CAVALCANTI, B.; PESSOA, C. O.; MORAES, M. O.; HAJDU, E.; PEIXINHO, S.; ROCHA, R. M. Isolation and biological activities of secondary metabolites from the sponges *Monanchora aff. arbuscula*, *Aplysina* sp. *Petromica ciocalyptoides* and *Topsentia ophiraphidites*, from the ascidian *Didemnum ligulum* and from the octocoral *Carijoa riisei*. **Química Nova**, v.30, n.5, p.1194-1202, 2007.

KRATZ, J. M.; ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; KOLLING, D. J.; LEAL, P. C.; CIRNE-SANTOS, C. C.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J.; TRYBALA, E.; BERGSTRÖM, T.; FRUGULHETTI, I. C. P. P.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. Anti-HSV-1 and anti-HIV-1 activity of gallic acid and pentyl gallate. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, n.5, p.437-442, 2008a.

KRATZ, J. M.; ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; LEAL, P. C.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; TRYBALA, E.; BERGSTRÖM, T.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. Evaluation of anti-HSV-2 activity of gallic acid and pentyl gallate. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.31, n.5, p.903-907, 2008b.

## 98 Referências

KUO, Y. C.; CHEN, C. C.; TSAI, W. J.; HO, Y. H. Regulation of Herpes Simplex Virus type 1 replication in Vero cells by *Psychotria serpens*: Relationship to gene expression, DNA replication, and protein synthesis. **Antiviral Research**, v.51, n.2, p.95-109, 2001.

LANG, K. L.; DA ROSA GUIMARÃES, T.; ROCHA MACHADO, V.; ZIMMERMANN, L. A.; SILVA, I. T.; TEIXEIRA, M. R.; DURÁN, F. J.; PALERMO, J. A.; SIMÕES, C. M. O.; CARO, M. S. B.; SCHENKEL, E. P. New cytotoxic cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. **Planta Medica**, v.77, n.14, p.1648-1651, 2011.

LAPORT, M. S.; MARINHO, P. R.; SANTOS, O. C. D. S.; DE ALMEIDA, P.; ROMANOS, M. T. V.; MURICY, G.; BRITO, M. A. V. P.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M. Antimicrobial activity of marine sponges against coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.155, n.2-4, p.362-368, 2012.

LIST-ARMITAGE, S. E.; HOOPER, J. N. A. Discovery of *Petromica Topsent* in the Pacific Ocean: A revision of the genus with a new subgenus (*Chaladesma*, subgen. nov.) and a new species (*P.(C.) pacifica*, sp. nov.) (Porifera: Demospongiae: Halichondrida: Halichondriidae). **Invertebrate Systematics**, v.16, n.5, p.813-835, 2002.

LÜCKEMEYER, D. D.; MÜLLER, V. D. M.; MORITZ, M. I. G.; STOCO, P. H.; SCHENKEL, E. P.; BARARDI, C. R. M.; REGINATTO, F. H.; SIMÕES, C. M. O. Effects of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (yerba mate) on Herpes Simplex Virus types 1 and 2 replication. **Phytotherapy Research**, v.26, n.4, p.535-540, 2012.

MAMIDYALA, S. K.; FIRESTINE, S. M. Advances in Herpes Simplex Virus antiviral therapies. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v.16, n.11, p.1463-1480, 2006.

- MARCELLETTI, J. F. Synergistic inhibition of herpesvirus replication by docosanol and antiviral nucleoside analogs. **Antiviral Research**, v.56, n.2, p.153-166, 2002.
- MARINHO, P. R.; MURICY, G. R. S.; SILVA, M. F. L.; DE MARVAL, M. G.; LAPORT, M. S. Antibiotic-resistant bacteria inhibited by extracts and fractions from Brazilian marine sponges. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.2, p.267-275, 2010.
- MARINHO, P. R.; SIMAS, N. K.; KUSTER, R. M.; DUARTE, R. S.; FRACALANZZA, S. E. L.; FERREIRA, D. F.; ROMANOS, M. T. V.; MURICY, G.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; LAPORT, M. S. Antibacterial activity and cytotoxicity analysis of halistanol trisulphate from marine sponge *Petromica citrina*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.67, n.10, p.2396-2400, 2012.
- MCCLAIN, D. S.; FULLER, A. O. Cell-specific kinetics and efficiency of Herpes Simplex Virus type 1 entry are determined by two distinct phases of attachment. **Virology**, v.198, n.1, p.690-702, 1994.
- MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.46, n.10, p.4769-4807, 2011.
- MONKS, N. R.; LERNER, C.; HENRIQUES, A. T.; FARIAS, F. M.; SCHAPOVAL, E. E. S.; SUYENAGA, E. S.; DA ROCHA, A. B.; SCHWARTSMANN, G.; MOTHE, B. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, southern Brazil. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.281, n.1-2, p.1-12, 2002.
- MORA CRISTANCHO, J. A.; NEWMARK UMBREIT, F.; SANTOS-ACEVEDO, M.; SÁNCHEZ NIEVES, J. Evaluación de extractos de esponjas marinas como nuevas fuentes de sustancias antimicrobianas. **Revista Espanola de Quimioterapia**, v.21, n.3, p.174-179, 2008.

## 100 Referências

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, n.1-2, p.55-63, 1983.

MÜLLER, V.; CHÁVEZ, J. H.; REGINATTO, F. H.; ZUCOLOTTI, S. M.; NIERO, R.; NAVARRO, D.; YUNES, R. A.; SCHENKEL, E. P.; BARARDI, C. R. M.; ZANETTI, C. R.; SIMÕES, C. M. O. Evaluation of antiviral activity of South American plant extracts against Herpes Simplex Virus type 1 and rabies virus. **Phytotherapy Research**, v.21, n.10, p.970-974, 2007.

MURICY, G.; HAJDU, E.; MINERVINO, J. V.; MADEIRA, A. V.; PEIXINHO, S. Systematic revision of the genus *Petromica Topsent* (Demospongiae: Halichondrida), with a new species from the southwestern Atlantic. **Hydrobiologia**, v.443, p.103-128, 2001.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v.75, n.3, p.311-335, 2012.

NICHOLAS, G. M.; PHILLIPS, A. J. Marine natural products: Synthetic aspects. **Natural Product Reports**, v.23, n.1, p.79-99, 2006.

NICOLA, A. V.; MCEVOY, A. M.; STRAUS, S. E. Roles for endocytosis and low pH in Herpes Simplex Virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. **Journal of Virology**, v.77, n.9, p.5324-5332, 2003.

NICOLA, A. V.; STRAUS, S. E. Cellular and Viral Requirements for Rapid Endocytic Entry of Herpes Simplex Virus. **Journal of Virology**, v.78, n.14, p.7508-7517, July 15, 2004, 2004.

NICOLL, M. P.; PROENÇA, J. T.; EFSTATHIOU, S. The molecular basis of Herpes Simplex Virus latency. **FEMS Microbiology Reviews**, v.36, n.3, p.684-705, 2012.

NIJVELDT, R. J.; VAN NOOD, E.; VAN HOORN, D. E.; BOELEN, P. G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P. A.

Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.74, n.4, p.418-425, October 1, 2001, 2001.

NYBERG, K.; EKBLAD, M.; BERGSTRÖM, T.; FREEMAN, C.; PARISH, C. R.; FERRO, V.; TRYBALA, E. The low molecular weight heparan sulfate-mimetic, PI-88, inhibits cell-to-cell spread of Herpes Simplex Virus. **Antiviral Research**, v.63, n.1, p.15-24, 2004.

OLOFSSON, S.; BERGSTRÖM, T. Glycoconjugate glycans as viral receptors. **Annals of Medicine**, v.37, n.3, p.154-172, 2005.

PIRET, J.; ROY, S.; GAGNON, M.; LANDRY, S.; DÉSORMEAU, A.; OMAR, R. F.; BERGERON, M. G. Comparative Study of Mechanisms of Herpes Simplex Virus Inactivation by Sodium Lauryl Sulfate and n-Lauroylsarcosine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n.9, p.2933-2942, 2002, 2002.

PIRRONE, V.; WIGDAHL, B.; KREBS, F. C. The rise and fall of polyanionic inhibitors of the human immunodeficiency virus type 1. **Antiviral Research**, v.90, n.3, p.168-182, 2011.

RAZONABLE, R. R. Antiviral drugs for viruses other than human immunodeficiency virus. **Mayo Clinic Proceedings**, v.86, n.10, p.1009-1026, 2011.

RIFFEL, R.; CARRARO, J. L. *Petromica citrina* Muricy, Hajdu, Minervino, Madeira e Peixinho. [http://www.biodiversidade.ufsc.br/especies\\_petromica\\_citrina.html](http://www.biodiversidade.ufsc.br/especies_petromica_citrina.html): Projeto biodiversidade Marinha 2010.

ROBERTS, P. Efficient removal of viruses by a novel polyvinylidene fluoride membrane filter. **Journal of Virological Methods**, v.65, n.1, p.27-31, 1997.

ROIZMAN, B.; KNIPE, D. M. Herpes Simplex Viruses and Their Replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E.;

## 102 Referências

LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRAUSS, S. E. (Ed.). **Fields Virology**. 5th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1940-1989.

ROTTINGHAUS, S. T.; WHITLEY, R. J. Current non-AIDS antiviral chemotherapy. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v.5, n.2, p.217-230, 2007.

SAVI, L. A.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. Evaluation of antiherpetic activity and genotoxic effects of tea catechin derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n.7, p.2552-2557, 2006.

SAVI, L. A.; CAON, T.; DE OLIVEIRA, A. P.; SOBOTTKA, A. M.; WERNER, W.; REGINATTO, F. H.; SCHENKEL, E. P.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. Evaluation of antirotavirus activity of flavonoids. **Fitoterapia**, v.81, n.8, p.1142-1146, 2010.

SCHUKSZ, M.; FUSTER, M. M.; BROWN, J. R.; CRAWFORD, B. E.; DITTO, D. P.; LAWRENCE, R.; GLASS, C. A.; WANG, L.; TOR, Y.; ESKO, J. D. Surfen, a small molecule antagonist of heparan sulfate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.105, n.35, p.13075-13080, 2008.

SIEUWERTS, A. M.; KLIJN, J. G. M.; PETERS, H. A.; FOEKENS, J. A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized. How to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v.33, n.11, p.813-823, 1995.

SILVA, I. T.; CAON, T.; LÜCKEMEYER, D. D.; RAMOS, F. A.; TELLO, E.; ARÉVALO-FERRO, C.; SCHENKE, E. P.; DUQUE, C.; SIMÕES, C. M. O. Antiherpes screening of marine organisms from Colombian Caribbean Sea. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.21, n.4, p.608-614, 2011.

SILVA, I. T.; COSTA, G. M.; STOCO, P. H.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H.; SIMÕES, C. M. O. In vitro antiherpes effects

of a C-glycosylflavonoid-enriched fraction of *Cecropia glaziovii* Sneth. **Letters in Applied Microbiology**, v.51, n.2, p.143-148, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; AMOROS, M.; GIRRE, L. Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. **Phytotherapy Research**, v.13, n.4, p.323-328, 1999.

SIQUEIRA JR, J. M.; PETERS, R. R.; GAZOLA, A. C.; KREPSKY, P. B.; FARIAS, M. R.; RAE, G. A.; DE BRUM-FERNANDES, A. J.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Anti-inflammatory effects of a triterpenoid isolated from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. **Life Sciences**, v.80, n.15, p.1382-1387, 2007.

SLATE, D. L.; LEE, R. H.; RODRIGUEZ, J.; CREWS, P. The marine natural product, halistanol trisulfate, inhibits pp60(v-src) protein tyrosine kinase activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.203, n.1, p.260-264, 1994.

SMITH, R. W. P.; MALIK, P.; CLEMENTS, J. B. The Herpes Simplex Virus ICP27 protein: A multifunctional post-transcriptional regulator of gene expression. **Biochemical Society Transactions**, v.33, n.3, p.499-501, 2005.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry** ed. New York: Freeman. 1995. 346-352 p.

SPEAR, P. G. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. **Cellular Microbiology**, v.6, n.5, p.401-410, 2004.

STEINER, I. Herpes Simplex Virus Meningoencephalitis. In: JACKSON, A. C. (Ed.). **Viral Infections of the Human Nervous System**. ed.: Springer Basel, 2013. p. 47-63.

SU, C. T.; HSU, J. T. A.; HSIEH, H. P.; LIN, P. H.; CHEN, T. C.; KAO, C. L.; LEE, C. N.; CHANG, S. Y. Anti-HSV activity of digitoxin and its possible mechanisms. **Antiviral Research**, v.79, n.1, p.62-70, 2008.

TANUS-RANGEL, E.; SANTOS, S. R.; LIMA, J. C.; LOPES, L.; NOLDIN, V.; MONACHE, F. D.; CECHINEL-FILHO, V.; MARTINS, D. T. Topical and systemic anti-inflammatory effects of *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (Alismataceae). **Journal of Medicinal Food**, v.13, n.5, p.1161-6, Oct, 2010.

TIBIRICA, E.; ALMEIDA, A.; CAILLEAUX, S.; PIMENTA, D.; KAPLAN, M. A.; LESSA, M. A.; FIGUEIREDO, M. R. Pharmacological mechanisms involved in the vasodilator effects of extracts from *Echinodorus grandiflorus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, n.1, p.50-5, Apr 20, 2007.

TURQUE, A. S.; BATISTA, D.; SILVEIRA, C. B.; CARDOSO, A. M.; VIEIRA, R. P.; MORAES, F. C.; CLEMENTINO, M. M.; ALBANO, R. M.; PARANHOS, R.; MARTINS, O. B.; MURICY, G. Environmental Shaping of Sponge Associated Archaeal Communities. **PLoS ONE**, v.5, n.12, p.e15774, 2010.

TUSET, M.; LÓPEZ-SUÑÉ, E.; CERVERA, C.; MORENO, A.; MIRÓ, J. M. Characteristics of antiviral drugs, excluding antiretroviral agents: Update 2009. **Características de los fármacos antivíricos frente a virus del grupo herpes actualización 2009**, v.28, n.3, p.199.e1-199.e33, 2010.

ULRICH-MERZENICH, G.; PANEK, D.; ZEITLER, H.; VETTER, H.; WAGNER, H. Drug development from natural products: Exploiting synergistic effects. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.48, n.3, p.208-219, 2010.

VAN VUUREN, S.; VILJOEN, A. Plant-based antimicrobial studies methods and approaches to study the interaction between natural products. **Planta Medica**, v.77, n.11, p.1168-1182, 2011.

VANDER BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J.; VAN HOOF, L. Plant products as potential antiviral agents. **Bulletin de l'Institut Pasteur**, v.84, n.2, p.101-147, 1986.

VLIETINCK, A. J.; DE BRUYNE, T.; VANDEN BERGHE, D. A. Plant substances as antiviral agents. **Current Organic Chemistry**, v.1, n.4, p.307-344, 1997.

WATANABE, D. Medical application of Herpes Simplex Virus. **Journal of Dermatological Science**, v.57, n.2, p.75-82, 2010.

WHITLEY, R. J.; KIMBERLIN, D. W.; ROIZMAN, B. Herpes simplex viruses. **Clinical Infectious Diseases**, v.26, n.3, p.541-555, 1998.

YAMAHARA, J.; MASUDA, H.; MURAKAMI, H.; FUJIMURA, H. The active principle of *Alismatis Rhizoma* which inhibits contractile responses in aorta. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.34, n.10, p.4422-4424, 1986.

YASUHARA-BELL, J.; LU, Y. Marine compounds and their antiviral activities. **Antiviral Research**, v.86, n.3, p.231-240, 2010.

YE, G.-J.; VAUGHAN, K. T.; VALLEE, R. B.; ROIZMAN, B. The Herpes Simplex Virus 1 UL34 Protein Interacts with a Cytoplasmic Dynein Intermediate Chain and Targets Nuclear Membrane. **Journal of Virology**, v.74, n.3, p.1355-1363, 2000, 2000.

ZHU, F.; SHI, Z.; QIN, C.; TAO, L.; LIU, X.; XU, F.; ZHANG, L.; SONG, Y.; ZHANG, J.; HAN, B.; ZHANG, P.; CHEN, Y. Therapeutic target database update 2012: A resource for facilitating target-oriented drug discovery. **Nucleic Acids Research**, v.40, n.D1, p.D1128-D1136, 2012.

ZHU, W.; CHIU, L. C. M.; OOI, V. E. C.; CHAN, P. K. S.; ANG JR, P. O. Antiviral property and mode of action of a sulphated polysaccharide from *Sargassum patens* against Herpes Simplex Virus type 2. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.24, n.3, p.81-85, 2004.