

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Jéssica Wildgrube Bertol

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HERPÉTICA DE  
CARDENOLÍDEOS E DERIVADOS**

Dissertação submetida ao  
Programa de Pós-Graduação da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau  
de Mestre em Biotecnologia.  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia  
Maria Oliveira Simões

Florianópolis

2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

B546a Bertol, Jéssica Wildgrube

Avaliação da atividade anti-herpética de cardenolídeos e derivados [dissertação] / Jéssica Wildgrube Bertol; orientadora, Cláudia Maria Oliveira Simões. - Florianópolis, SC, 2011.

153 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Biotecnologia. 2. Compostos naturais. 3. Agentes antivirais. 4. Herpes simples. 5. HSV-1. 6. HSV-2. I. Simões, Cláudia Maria Oliveira. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 577.23

“Avaliação da atividade anti-herpética de derivados de cardenolídeos.”  
POR

JÉSSICA WILDGRUBE BERTOL

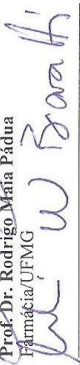
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Comissão Examinadora.

Orientador:


  
Prof. Dr. Cláudia Maria Oliveira Simões  
CIF/CCS/UFSC

Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. Rodrigo Maia Pádua  
Farmácia/UFMG

  
Prof. Dr. Maitque W. Biavatti  
CIF/CCS

  
Prof. Dr. Thais Cristine Marques Sincero  
ACL/CCS/UFSC

  
Prof. Dr.ª Cláudia Maria Oliveira Simões – CIF/CCS/UFSC  
Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências/CCB/ UFSC  
Florianópolis, Fevereiro de 2011.

Aos meus pais Nubio e Regina, ao meu irmão Douglas e ao meu amor Cássio pelo apoio, amor incondicional, companheirismo e compreensão.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado força, sabedoria e paciência para completar mais esta etapa em minha vida.

Agradeço a todos que me incentivaram e acreditaram em mim, os quais sempre me deram muita força, ajuda e incentivo, principalmente nos momentos mais difíceis e de cansaço.

Aos meus pais e irmão, por confiarem e torcerem muito por mim. Por terem participado ativamente deste momento da minha vida, desejando muita força e coragem para que este objetivo fosse alcançado. Muito obrigada por acreditarem e apoiarem sempre minhas decisões. Amo vocês!

Ao Cássio, por todo amor e companheirismo. Pela paciência nos momentos de ausência e naqueles de estresse e desmotivação. Muito obrigada pela força, incentivo e muito amor. Te amo!

À Prof<sup>a</sup> Cláudia Maria Oliveira Simões, pela oportunidade e pela valiosa orientação. Sem sombra de dúvida, aprendi muito mais do que está exposto neste trabalho, aprendendo lições que levarei para toda a vida pessoal e profissional. Obrigada!

À Prof<sup>a</sup> Célia Regina Monte Barardi, pela amizade, carinho e sugestões. Pela oportunidade de realização do estágio em docência, me propiciando um grande aprendizado no quesito “como ser um ótimo professor”.

Ao Prof. Fernão Castro Braga, ao Prof. Wolfgang Kreis e ao Dr. Rodrigo Maia de Pádua, pelo fornecimento dos compostos, permitindo a realização deste trabalho.

As minhas amadas amigas Ju, Sarenha e Talits, pela verdadeira amizade, construída e mantida durante anos e pelo apoio dado mesmo à distância. Amo vocês!

Às valiosas amigas e colegas de laboratório, Nairitcha, Fran, Vanessinha, Izabellita, Thaís e Anne, pela força, apoio, amizade e, principalmente, pelos momentos de descontração e alegria nos dias de desânimo e incertezas. Pelo enorme conhecimento que me passaram e pela forte amizade construída. Adoro vocês!

Aos queridos e divertidos amigos do Laboratório de Virologia Aplicada, Adri, Débora, Mari Nascimento, Dóris, Carol, Mari Rangel, Marina, Ariadne, Lucas, Thiago, Ana, Jadel, Aline, Mari Lúcia e Nicésio, os quais propiciaram um ótimo local de trabalho e tornaram a rotina e a pesquisa muito mais animada.

Com certeza vocês ficarão no meu coração! Muito obrigada pela amizade e enorme carinho!

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

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela concessão da bolsa de Mestrado por 24 meses, e ao CNPq pelo apoio financeiro através do Edital Universal (2009-2011, projeto nº 470235/2009-8).

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

*Jéssica Wildgrabe Bertol*

## RESUMO

Os cardenolídeos pertencem a um grupo de compostos naturais, que inibem a bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (NKATPase). Tradicionalmente, eles têm sido utilizados para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva e de arritmias atriais, tais como a digoxina, a digitoxina e a ouabaína. Trabalhos recentes descreveram a potencial atividade anti-herpética de alguns cardenolídeos. Os Herpes Simplex Virus tipos 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) são responsáveis por infecções nas regiões oral, ocular e genital e, além disso, estes vírus podem estabelecer infecções persistentes (latência) no sistema nervoso. O tratamento é realizado com análogos de nucleosídeos, como o aciclovir, efetivo na maioria dos casos; entretanto, a resistência a esses fármacos tem aumentado devido ao seu uso prolongado, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Inicialmente, a citotoxicidade ( $\text{CC}_{50}$ ) e a atividade anti-HSV foram avaliadas através do ensaio colorimétrico do MTT e do ensaio de inibição da formação das placas de lise ( $\text{CI}_{50}$ ), respectivamente. De acordo com os resultados obtidos através da triagem anti-HSV de 65 cardenolídeos e derivados, dois compostos (4 e 12) foram selecionados devido aos seus promissores índices de seletividade ( $\text{IS}=\text{CC}_{50}/\text{CI}_{50}$ ) de 2.107 e 645 (HSV-1 cepa KOS); 4.566 e 792 (HSV-1 cepa 29-R) e 6.250 e 1.238 (HSV-2 cepa 333). O mecanismo de ação foi avaliado através de uma sequência de ensaios, que visaram avaliar a possível interferência destes compostos nas diversas etapas do ciclo de replicação viral. Na avaliação do efeito do tempo de adição e remoção, estes compostos inibiram significativamente a replicação viral, quando adicionados até 12 h pós-infecção, ou removidos após este período de tempo. Esses compostos não apresentaram atividade virucida, nem inibiram a entrada viral dos vírus nas células (adsorção e penetração). Entretanto, eles mantiveram sua atividade anti-HSV, mesmo no maior MOI testado (0,4), que foi 1000X maior que o MOI (0,0004) utilizado para a triagem antiviral. As amostras também inibiram a dispersão viral intercelular e interferiram na liberação viral, apresentando perfis concentração-dependentes. Os níveis de RNAm dos genes herpéticos não foram alterados pelo tratamento com os cardenolídeos nas condições experimentais testadas. Entretanto, a análise da expressão proteica viral mostrou que os

compostos inibiram a expressão das proteínas  $\alpha$  (ICP27),  $\beta$  (UL42) e  $\gamma$  (gB and gD), em diferentes intensidades. A avaliação da atividade anti-ATPásica demonstrou que esses cardenólídeos reduziram esta atividade enzimática, sugerindo que uma alteração do gradiente eletroquímico celular pode estar envolvida no mecanismo de inibição da replicação viral.

**Palavras-chave:** cardenólídeos e derivados; atividade antiviral; Herpes Simplex Virus tipo 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2); mecanismo de ação anti-herpética.



## ABSTRACT

The cardenolides belong to a group of natural compounds that inhibit the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (NKATPase). They have traditionally been used for the treatment of congestive heart failure and atrial arrhythmias, such as digoxin, digitoxin and ouabain. Recent studies have described the potential anti-herpetic activity of some cardenolides. The Herpes Simplex Virus type 1 and type 2 (HSV-1 and HSV-2) are responsible for infections in oral, ocular and genital regions and furthermore, these viruses can establish persistent infections (latency) in the nervous system. The treatment is performed with nucleoside analogs such as acyclovir, effective in most cases; however, resistance to these drugs has increased due to prolonged use, especially in immunocompromised patients. Initially, the cytotoxicity ( $\text{CC}_{50}$ ) and anti-HSV activity were assessed by colorimetric MTT assay and by viral plaque number reduction assay ( $\text{IC}_{50}$ ), respectively. According to the results obtained through the anti-HSV screening of 65 cardenolides and derivatives, two compounds (4 and 12) were selected due to their promising selective indexes ( $\text{SI} = \text{CC}_{50}/\text{CI}_{50}$ ) of 2.107 and 645 (HSV-1 strain KOS), 4.566 and 792 (HSV-1 strain 29-R) and 6.250 and 1.238 (HSV-2 strain 333). The mechanism of action was evaluated through a series of tests, which aimed to evaluate the possible interference of these compounds in various stages of the viral replication cycle. The evaluation of these compounds in the time effect of addition and removal showed significantly viral replication inhibition when added up to 12 h post-infection, or removed after this period of time. These compounds showed no virucidal activity, nor inhibited viral entry of viruses into cells (adsorption and penetration). However, they maintained their anti-HSV activity, even at the higher tested MOI (0.4), which is thousand times higher than the MOI (0.0004) used for screening antiviral. The compounds also inhibited intercellular viral spread and interfered with the viral release, showing concentration-dependent profiles. The mRNA levels of HSV genes were not affected by treatment with cardenolides on the tested experimental conditions. However, analysis of viral protein expression showed that the compounds inhibited  $\alpha$  (ICP27),  $\beta$  ( $\text{U}_\text{L}42$ ) and  $\gamma$  (gB and gD) genes expression at different intensities. The evaluation of anti-ATPase activity showed that these cardenolides can inhibit this pump, suggesting

that the alteration of cellular electrochemical gradient may be involved in the viral replication inhibition mechanism.

**Keywords:** cardenolide and derivatives; antiviral activity; Herpes Simplex Virus types 1 and 2 (HSV-1 and HSV-2); mechanism of action.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Diagrama do vírion dos HSV. ....	35
<b>Figura 2:</b> Estrutura química de um cardenólídeo.....	42
<b>Figura 3:</b> Resultados da avaliação da atividade anti-HSV-1 (cepa KOS) do composto 4 e do aciclovir, frente a três diferentes MOIs .....	94
<b>Figura 4:</b> Efeito do aciclovir e do composto 4 na redução do título do HSV-1 (cepa KOS), frente a três diferentes MOIs.....	95
<b>Figura 5:</b> Resultados da avaliação da atividade anti-HSV-1 (cepa 29R) do composto 4 e do aciclovir, frente a três diferentes MOIs .....	97
<b>Figura 6:</b> Resultados da avaliação da atividade anti-HSV-2 (cepa 333) do composto 4 e do aciclovir, frente a três diferentes MOIs .....	98
<b>Figura 7:</b> Resultados da avaliação da atividade anti-HSV-1 (cepa KOS) do composto 12 e do aciclovir, frente a três diferentes MOIs.....	100
<b>Figura 8:</b> Efeito do aciclovir e do composto 12, na redução do título do HSV-1 (cepa KOS), frente a três diferentes MOIs.....	101
<b>Figura 9:</b> Resultados da avaliação da atividade anti-HSV-1 (cepa 29R) do composto 12 e do aciclovir, frente a três diferentes MOIs .....	102
<b>Figura 10:</b> Resultados da avaliação da atividade anti-HSV-2 (cepa 333) do composto 12, frente a três diferentes MOIs .....	103
<b>Figura 11:</b> Efeito do tempo de adição e remoção do aciclovir no ciclo de replicação do HSV-1 (cepa KOS), em células VERO.....	106

<b>Figura 12:</b> Efeito do tempo de adição e remoção do composto 4 (0,26 $\mu$ M) no ciclo de replicação do HSV-1 (cepa KOS) em células VERO .....	107
<b>Figura 13:</b> Efeito do tempo de adição e remoção do composto 4 (0,072 $\mu$ M) no ciclo de replicação do HSV-2 (cepa 333) em células GMK AH1 .....	108
<b>Figura 14:</b> Efeito do tempo de adição e remoção do composto 12 (0,54 $\mu$ M) no ciclo de replicação do HSV-1 (cepa KOS), em células VERO.....	109
<b>Figura 15:</b> Efeito do tempo de adição e remoção do composto 12 (0,46 $\mu$ M) no ciclo de replicação do HSV-2 (cepa 333) em células GMK AH1. ....	110
<b>Figura 16:</b> Efeito do tratamento simultâneo (vírus + amostras, 1 h) com o composto 4, aciclovir (ACV) ou furosemida (FUR) e suas combinações na expressão gênica de U <sub>L</sub> 54 (HSV-1 cepa KOS), através da técnica de RT-PCR .....	116
<b>Figura 17:</b> Efeito do tratamento simultâneo (vírus + amostras, 1 h) com o composto 4, aciclovir (ACV) e furosemida (FUR) e suas combinações na expressão gênica da $\beta$ -actina, através da técnica de RT-PCR. ....	119
<b>Figura 18:</b> Efeito do tratamento de 12 h P.I. com o composto 4, aciclovir (ACV) e furosemida (FUR) e suas combinações na expressão gênica do HSV-1 (cepa KOS), através da técnica do RT-PCR .....	119
<b>Figura 19:</b> Efeitos dos compostos 4 e 12 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> .....	122
<b>Figura 20:</b> Efeito dos compostos 4 e 12 e da digitoxina (composto 6) sobre a liberação do HSV-1 (cepa KOS).....	126
<b>Figura 21:</b> Título viral (HSV-1 cepa KOS) intracelular e extracelular na presença da digitoxina (composto 6. ....	127

<b>Figura 22:</b> Título viral (HSV-1 cepa KOS) intracelular e extracelular na presença do composto 4 .....	128
<b>Figura 23:</b> Título viral (HSV-1 cepa KOS) intracelular e extracelular na presença do composto 12 .....	129
<b>Figura 24:</b> Efeito dos compostos 4 e 12, e da digitoxina (composto 6), sobre a liberação do HSV-1 (cepa 29R).....	130
<b>Figura 25:</b> Efeito dos compostos 4 e 12, e da digitoxina (composto 6) sobre a liberação do HSV-2 (cepa 333) .....	131
<b>Figura 26:</b> Efeito do composto 4 na inibição da propagação intercelular dos vírus HSV-1 (cepas KOS e 29R) e HSV-2 (cepa 333) .....	135
<b>Figura 27:</b> Efeito do composto 12 na inibição da propagação intercelular dos vírus HSV-1 (cepas KOS e 29R) e HSV-2 (cepa 333) .....	135
<b>Figura 28:</b> Estrutura química da D-(+)-digitoxose.....	137
<b>Figura 29:</b> Proposta do mecanismo da ação anti-HSV-1 e anti-HSV-2 dos cardenolídeos glucoevatromonosídeo (4) e digoxigenina-bisdigitoxosídeo (12).....	141

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Propriedades biológicas das subfamílias $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ - Herpesvirinae. ....	31
<b>Quadro 2:</b> Vírus herpéticos humanos. ....	32
<b>Quadro 3:</b> Cardenolídeos e derivados utilizados para a triagem da atividade anti-herpética. ....	50
<b>Quadro 4:</b> Iniciadores utilizados na avaliação do efeito das amostras na expressão gênica do HSV-1 (cepa KOS). ....	74
<b>Quadro 5:</b> Proteínas expressas pelo HSV-1 (cepa KOS) analisadas por <i>Western blotting</i> . ....	77
<b>Quadro 6:</b> Títulos infecciosos dos estoques virais utilizados. .	83

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Resultados da avaliação da citotoxicidade, em células VERO, e da atividade anti-HSV-1 (cepa KOS) dos cardenólídeos e derivados testados. .... 88
- Tabela 2:** Resultados da avaliação da atividade anti-herpética dos cardenólídeos e derivados selecionados..... 91
- Tabela 3:** Resultados referentes ao ensaio de inibição da adsorção viral, expressos como valores de  $CI_{50}$  das amostras testadas..... 112
- Tabela 4:** Resultados referentes ao ensaio de inibição da penetração viral, expressos como valores de  $CI_{50}$  das amostras testadas..... 113
- Tabela 5:** Efeito dos compostos 4, 12 e 6 sobre a redução dos títulos virais (%), intra e extracelulares, do HSV-1 (cepa 29R)..... 131
- Tabela 6:** Efeito dos compostos 4, 12 e 6 sobre a redução dos títulos virais (%), intra e extracelulares, do HSV-2 (cepa 333)..... 132
- Tabela 7:** Inibição da atividade da enzima ATPase ocasionada pelos cardenólídeos testados..... 138

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%: Percentual

>: Maior

μL: Microlitro(s)

μg: Micrograma(s)

°C: Graus Celsius

α: Alfa

β: Beta

γ: Gama

ATCC: *American Type Culture Collection*

ACV: Aciclovir

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

cm<sup>2</sup>: Centímetros quadrados

CMC: Carboximetilcelulose

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono

CV: Controle viral

CV<sub>50</sub>: Concentração virucida a 50%

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxiribonucleico

DO: Densidade ótica

ECP: Efeito citopático viral

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

FUR: Furosemida

g: Grama

GMK AH1: Linhagem celular proveniente de fibroblastos de rins de macaco verde da África (*Cercopithecus aethiops*)

h: Horas

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

HSV: *Herpes Simplex Vírus*

HSV-1: *Herpes Simplex Virus* tipo 1

HSV-2: *Herpes Simplex Virus* tipo 2

HVEM: *Herpesvírus entry mediator* - Mediador de entrada do herpesvírus

ICC: Insuficiência cardíaca congestiva

ICP: *Infected cell proteins* - Proteínas de células infectadas

IR: Infeciosidade residual

IS: Índice de seletividade

K<sup>+</sup>: Íon potássio



KCl: Cloreto de potássio  
kDa: Kilodalton  
LVA: Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC  
Md: Média  
MEM: *Minimal Essential Medium*, Meio Essencial Mínimo  
mg: Miligrama  
min: Minuto(s)  
mL: Mililitro(s)  
mM: Milimolar  
MOI: Multiplicidade de infecção  
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazólio, sal de tetrazólio  
nº: Número  
Na<sup>+</sup>: Íon sódio  
NaCl: Cloreto de sódio  
NKATPase: Bomba de sódio e potássio ATPase  
nm: Nanômetro  
p/v: peso/volume  
P&D: Pesquisa&Desenvolvimento  
PBS: *Phosphate Buffered Saline*, Tampão fosfato  
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase  
pH: Potencial hidrogeniônico  
P.I.: Pós-infecção  
PM: Peso molecular  
PSA: Solução contendo penicilina, estreptomicina e anfotericina  
RNA: Ácido ribonucleico  
RNAm: Ácido ribonucleico mensageiro  
RT-PCR: Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase  
SDS: Dodecil sulfato de sódio  
SFB: Soro fetal bovino  
T: Título viral  
TNF: Fator de necrose tumoral  
TQ: Timidina quinase  
UFP: Unidade formadora de placa  
UFP/ml: Unidade formadora de placa por mililitro  
UV: Ultravioleta  
V: Volts  
v/v: volume/volume  
VERO: Linhagem celular proveniente de fibroblastos de rim de macaco verde da África (*Cercopithecus aethiops*)

Vhs: *Virion host shut*

VP: *Viral protein*, Proteína viral

X: Vezes

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	29
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	31
2.1 Vírus herpéticos .....	31
2.1.1 Classificação .....	31
2.1.2 Herpes Simplex Virus (HSV).....	33
2.1.3 Estrutura dos HSV.....	34
2.1.4 Ciclo de multiplicação dos HSV .....	35
2.2 Terapia anti-herpética .....	40
2.3 Cardenólídeos .....	41
2.3.1 Estrutura química dos cardenólídeos .....	41
2.3.2 Principal ação farmacológica e indicações terapêuticas dos cardenólídeos .....	42
2.3.3 Mecanismo da ação cardiotônica .....	43
2.3.4 Outros mecanismos de ação dos cardenólídeos.....	43
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	47
3.1 Objetivo Geral.....	47
3.2 Objetivos específicos .....	47
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	49
4.1 Materiais de estudo .....	49
4.2 Culturas celulares.....	62
4.2.1 Células.....	62
4.2.2 Meio de cultura e reagentes.....	62
4.3 Vírus.....	63
4.3.1 Origem das cepas virais.....	63
4.3.2 Preparo das suspensões-estoques virais.....	63
4.3.3 Determinação dos títulos infecciosos virais.....	64
4.4 Avaliação da citotoxicidade.....	65
4.5 Avaliação da potencial atividade antiviral - triagem anti-herpética.....	66
4.5.1 Ensaio de inibição da formação das placas de lise.....	66
4.6 Ensaio de redução do número de partículas virais infecciosas ( <i>Yield Reduction Assay</i> ).....	68
4.7 Avaliação do mecanismo da ação anti-herpética dos cardenólídeos selecionados.....	69
4.7.1 Avaliação da ação virucida direta .....	69

4.7.2 Avaliação do efeito do tempo de adição e remoção das amostras no ciclo de replicação viral .....	70
4.7.3 Avaliação do efeito das amostras na adsorção viral .....	72
4.7.4 Avaliação do efeito das amostras na penetração viral .....	73
4.7.5 Avaliação do efeito do composto 4 na expressão gênica viral.....	73
4.7.6 Avaliação do efeito das amostras na expressão das proteínas virais .....	77
4.7.7 Avaliação do efeito das amostras sobre a liberação viral ..	79
4.7.8 Avaliação do efeito das amostras na propagação intercelular viral .....	80
4.8 Avaliação da potencial atividade anti-ATPásica das amostras.....	80
4.9 Delineamento experimental e análise estatística .....	81

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....**

5.1 Determinação dos títulos infecciosos virais.....	83
5.2 Avaliação da potencial atividade antiviral .....	83
5.2.1 Avaliação da citotoxicidade.....	83
5.2.2 Triagem anti-herpética - ensaio de inibição da formação das placas de lise.....	86
5.3 Ensaio de redução do número de partículas virais infecciosas ( <i>Yield reduction assay</i> ).....	93
5.3.1 Resultados obtidos com o composto 4.....	93
5.3.1.1 Frente ao HSV-1 (cepa KOS) .....	93
5.3.1.2 Frente ao HSV-1 (cepa 29R) .....	96
5.3.1.3 Frente ao HSV-2 (cepa 333).....	98
5.3.2 Resultados obtidos com o composto 12.....	99
5.3.2.1 Frente ao HSV-1 (cepa KOS) .....	99
5.3.2.2 Frente ao HSV-1 (cepa 29R) .....	102
5.3.2.3 Frente ao HSV-2 (cepa 333).....	102
5.4 Avaliação do mecanismo da ação anti-herpética dos cardenólídeos 4 e 12.....	104
5.4.1 Avaliação da ação virucida direta .....	104
5.4.2 Avaliação do efeito do tempo de adição e remoção das amostras no ciclo de replicação viral .....	105
5.4.3 Avaliação do efeito das amostras na adsorção viral .....	111
5.4.4 Avaliação do efeito das amostras na penetração viral....	112
5.4.5 Avaliação do efeito do composto 4 na expressão gênica viral.....	114

5.4.6 Avaliação do efeito das amostras na expressão das proteínas virais .....	120
5.4.7 Avaliação do efeito das amostras sobre a liberação viral	125
5.4.8 Avaliação do efeito das amostras na propagação intercelular viral .....	133
5.5 Avaliação da potencial atividade anti-ATPásica das amostras.....	136
5.6 Proposta do mecanismo da ação anti-herpética dos compostos 4 e 12 .....	140
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>143</b>
<b>7 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>147</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>149</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A busca por novos compostos biologicamente ativos obtidos a partir de produtos naturais, entre eles os de origem vegetal, tem sido incentivada em todo o mundo. Compostos de origem natural ainda são considerados muito importantes na descoberta de novos fármacos para algumas doenças, tais como as de origem microbiana e parasitária, alguns tipos de cânceres e para o controle dos níveis sanguíneos de lipídios (BUTLER; NEWMAN, 2008).

Com um número estimado de mais de 300.000 espécies de plantas e provavelmente, de quase 2 milhões de espécies de fungos, insetos e organismos marinhos, a biodiversidade mundial é um reservatório inigualável da diversidade biológica e química. Entretanto, grande parte desta biodiversidade permanece inexplorada (BOHLIN et al., 2010).

Diversas estratégias, baseadas em observações etnofarmacológicas, ecológicas ou toxicológicas, juntamente com triagens randomizadas, têm sido usadas na investigação desta enorme biodiversidade com o intuito de continuar contribuindo para o aumento do arsenal terapêutico.

Algumas das doenças humanas mais importantes são de origem viral, tais como as causadas pelos vírus da imunodeficiência humana (DE LOGU et al.), das hepatites B (HBV) e C (HCV), Ebola, influenza, da dengue e da febre amarela. Por este motivo, no mundo todo, pesquisadores não têm medido esforços nos processos de pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novas moléculas com atividade antiviral (BUTLER, 2008).

Dentre os inúmeros vírus existentes, encontram-se os vírus herpéticos, que podem causar diversas doenças ao homem, como lesões orais e esofágicas no caso do herpesvírus humano tipo 1 (HSV-1) e infecções genitais e retais, causadas pelo herpesvírus humano tipo 2 (HSV-2) (STEINER; KENNEDY; PACHNER, 2007). Estes vírus são um grave problema de saúde pública, devido a sua capacidade de causar infecções agudas e recorrentes, além do aparecimento de cepas resistentes ao fármaco de primeira escolha (aciclovir - ACV) para seu tratamento. As infecções causadas pelos HSV estão entre as mais comuns em humanos, tendo sido estimado que 60-95% da

população mundial adulta esteja infectada por, pelo menos, um deles (BRADY; BERNSTEIN, 2004).

Atualmente, o arsenal terapêutico para infecções virais compreende cerca de 50 fármacos aprovados oficialmente para uso clínico, sendo que metade deles é utilizada para o tratamento das infecções causadas pelo HIV. Os demais fármacos antivirais são utilizados contra os vírus das hepatites B e C, vírus influenza, vírus respiratório sincicial e vírus herpéticos, incluindo neste último grupo o vírus da varicela zoster, o citomegalovírus e os HSV tipos 1 e 2 (DE CLERCQ, 2009a; b). Assim, poucos são os medicamentos usados para o tratamento das infecções herpéticas (MAMIDYALA; FIRESTINE, 2006; ROTTINGHAUS; WHITLEY, 2007), e a P&D de novos agentes antivirais é necessária e precisa ser estimulada.

Diante deste quadro, o Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC vem, há vários anos, avaliando a potencial atividade antiviral de produtos naturais e compostos sintéticos.

Recentemente, a atividade antiviral de alguns cardenolídeos (digoxina, digitoxina, digitoxigenina, digoxigenina, gitoxigenina, ouabaína, lanatosídeo C, cimarina, neriifolina e estrofantidol) foi relatada por alguns autores (DENG et al., 2007; DODSON et al., 2007; HARTLEY et al., 2006; HOFFMANN; PALESE; SHAW, 2008; SU et al., 2008).

Tendo em vista os resultados promissores obtidos pelos pesquisadores acima citados, a disponibilidade de 65 cardenolídeos e derivados, e a ausência de relatos de atividade antiviral na literatura para a quase totalidade desses compostos, este trabalho teve por objetivo realizar uma triagem antiviral, frente a diferentes cepas do HSV-1 e do HSV-2, assim como elucidar o mecanismo da ação anti-herpética de dois compostos, que foram selecionados por seus resultados promissores.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Vírus herpéticos

#### 2.1.1 Classificação

Dentre os inúmeros vírus existentes, encontram-se os vírus herpéticos, pertencentes à família Herpesviridae, a qual é dividida em três subfamílias:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  - Herpesvirinae, de acordo com suas propriedades biológicas (Quadro 1).

**Quadro 1:** Propriedades biológicas das subfamílias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  - Herpesvirinae.

Subfamília	Propriedades Biológicas
<b><i>Alphaherpesvirinae</i></b>	Faixa variável de hospedeiros; ciclo reprodutivo curto; rápida propagação em cultura celular; destruição eficiente de células infectadas; estabelecimento de latência primária, mas não exclusivamente nos gânglios sensoriais.
<b><i>Betaherpesvirinae</i></b>	Faixa restrita de hospedeiros; ciclo reprodutivo longo; a infecção progride vagarosamente em cultura, formando, frequentemente, células alargadas (citomegalia); estabelecimento de latência em glândulas secretoras, células linforeticulares, rins e outros tecidos.
<b><i>Gamaherpesvirinae</i></b>	Faixa de hospedeiros limitada; replicação <i>in vitro</i> ocorre em células linfoblastóides; replicação <i>in vivo</i> e latência ocorrem em linfócitos T ou B.

Fonte: adaptado de CLEATOR; KLAPPER (2004).



Os vírus herpéticos são constituídos de DNA fita dupla, apresentam simetria icosaédrica e são envelopados, com 120-200 nm de diâmetro (TORTORA; FUNKE; CASE, 2008). Esta família compreende mais de 120 vírus, que infectam muitas espécies animais, sendo que existem nove vírus herpéticos humanos (Quadro 2).

**Quadro 2:** Vírus herpéticos humanos.

Subfamília	Nome Oficial	Gênero	Nome Comum e Abreviação
$\alpha$	Herpesvírus humano-1	<i>Simplexvirus</i>	Vírus herpes simples tipo 1 (HSV-1)
	Herpesvírus humano-2	<i>Simplexvirus</i>	Vírus herpes simples tipo 2 (HSV-2)
	Herpesvírus humano-3	<i>Varicellovirus</i>	Vírus da varicela zoster (VZV)
$\beta$	Herpesvírus humano-5	<i>Cytomegalovirus</i>	Citomegalovírus (CMV)
	Herpesvírus humano-6A	<i>Roseolovirus</i>	Vírus Herpes Humano Tipo 6A (HHV-6A)
	Herpesvírus humano-6B	<i>Roseolovirus</i>	Vírus Herpes Humano Tipo 6B (HHV-6B)
	Herpesvírus humano-7	<i>Roseolovirus</i>	Vírus Herpes Humano Tipo 7 (HHV-7)
$\gamma$	Herpesvírus humano-4	<i>Lymphocryptovirus</i>	Vírus Epstein-Barr (EBV)
	Herpesvírus humano-8	<i>Rhadinovirus</i>	Vírus Herpes Humano Tipo 8 (HHV-8)

Fonte: adaptado de CLEATOR; KLAPPER (2004).

## 2.1.2 Herpes Simplex Virus (HSV)

Os HSV-1 (152 Kpb) e HSV-2 (155 Kpb) têm 70% de homologia genômica, mas tendem a afetar áreas diferentes do corpo. O HSV-1 costuma causar, predominantemente, lesões orais e esofágicas, sendo transmitido primariamente via secreções orais. O HSV-2 é mais frequentemente transmitido por via sexual, causando infecções genitais e retais (STEINER; KENNEDY; PACHNER, 2007). Ambos podem causar doenças mais graves, tal como a encefalite herpética, tanto em pessoas imunocompetentes quanto em imunocomprometidos (KOELLE; COREY, 2008).

Além disso, o herpes genital encontra-se intimamente relacionado à infecção pelo vírus HIV, sendo que as lesões genitais e a infiltração local de linfócitos aumentam em até 3X o risco de contrair o HIV sexualmente (GUPTA; WARREN; WALD, 2007). Isto ocorre através do recrutamento de células do sistema imune para os locais da ulceração genital, acarretando uma maior disponibilidade das células-alvo infectadas pelo vírus HIV (linfócitos CD4<sup>+</sup>, macrófagos e células dendríticas) (CELUM et al., 2008; KOELLE; COREY, 2008; VAN DE PERRE et al., 2008).

O ciclo de vida dos HSV é complexo e caracterizado por uma série de interações entre vírus, células hospedeiras neuronais e não neuronais e o sistema imune. A infecção das células pelos HSV pode levá-las ao ciclo lítico ou ao estado de latência, podendo o vírion permanecer neste estado por toda a vida do hospedeiro ou ser reativado (FRAMPTON JR et al., 2005). O sítio de latência, ou seja, o local onde o HSV irá permanecer no hospedeiro depende da subfamília. A principal característica dos membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* é estabelecer latência nos nervos sensoriais. O ciclo de latência-reativação é dividido em três estágios: estabelecimento, manutenção e reativação. O estabelecimento da latência inclui a infecção primária, a qual é caracterizada pela replicação viral no sítio de inoculação, seguido pelo transporte axonal retrógrado do vírus ao gânglio sensorial correspondente, onde a infecção poderá seguir duas vias diferentes. Em alguns neurônios, o vírus expressa seus genes, replica-se e causa a morte celular; e em outros neurônios, o vírus estabelece uma infecção latente, caracterizada pela transcrição limitada, exceto dos transcritos associados à latência, chamados de LATs (*Latent Associated*

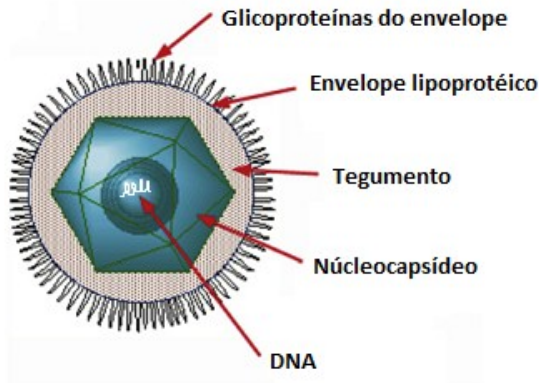
*Transcripts*), os quais se acumulam em um grande número de cópias no núcleo das células latentes infectadas (STEVENS; COOK, 1973; STEVENS et al., 1987). A fase de manutenção da latência é o estágio que dura por toda a vida do hospedeiro e é definida como o período que o vírus infeccioso não é detectado por procedimentos padrões de isolamento viral. Em geral, não ocorre a expressão abundante dos genes virais, que são necessários para a infecção, entretanto, os LATs são abundantemente expressos neste estágio (PERNG; JONES, 2010). A reativação da latência é iniciada espontaneamente ou por diversos estímulos, tais como irradiação UV, estresse físico e/ou mental, frio e distúrbios hormonais, que irão estimular a expressão gênica viral. Os vírus reativados dos gânglios trigêmio, vagal e sacral (WHITLEY; ROIZMAN, 2001) passam anterogradamente pelo nervo, causando infecções recorrentes sintomáticas ou assintomáticas (BRADY; BERNSTEIN, 2004; MORI; NISHIYAMA, 2005; PERNG; JONES, 2010).

### 2.1.3 Estrutura dos HSV

A partícula viral herpética é formada pelo core (núcleo), o qual contém o genoma (DNA), que codifica mais de 70 diferentes genes. O genoma é dividido em dois segmentos ligados covalentemente, denominados longo (L) e curto (S), ambos contendo sequências únicas (UL e US, respectivamente), que são flanqueadas por regiões de sequências repetitivas invertidas. O rearranjo destes dois componentes dá origem a quatro populações de moléculas de DNA, diferindo entre si apenas na orientação das sequências do DNA (WATANABE, 2010).

O núcleo é protegido pelo capsídeo icosaédrico, o qual é composto de 162 capsômeros (150 hexâmeros e 12 pentâmeros), que por sua vez, é envolto por uma camada amorfa de proteínas conhecida como tegumento. Estudos realizados com vírions purificados do HSV-1 e HSV-2 demonstraram que eles contêm mais de 20 proteínas distintas, responsáveis por iniciar a expressão gênica viral (WYSOCKA; HERR, 2003), regular a síntese proteica celular (KWONG; FRENKEL, 1989) e auxiliar na maturação e liberação viral (WISNER; JOHNSON, 2004). Por fim, o constituinte mais externo é o envelope lipoproteico proveniente das membranas plasmáticas das células infectadas e contém, no mínimo, 12 glicoproteínas virais (gB, gC,

gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM e gN) e diversas proteínas não glicosiladas, lipídios e poliaminas (WATANABE, 2010; WHITE; FENNER, 1994; WHITLEY; ROIZMAN, 2001). A morfologia característica dos HSV está ilustrada na Figura 1.



**Figura 1:** Diagrama do vírion dos HSV.  
Fonte: adaptado de WATANABE (2010).

#### 2.1.4 Ciclo de multiplicação dos HSV

O ciclo de multiplicação dos vírus herpéticos consiste das seguintes etapas:

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 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 é chamada de forma secundária e 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 variar dependendo do tipo de célula (NICOLA; STRAUS, 2004).

O contato inicial do HSV com uma célula se inicia pela interação do vírion com as cadeias de glicosaminoglicanas das proteoglicanas de superfície celular. Na **adsorção**, o sulfato de heparana, principal receptor celular de ligação dos HSV, é preferencialmente a molécula que interage com as glicoproteínas virais gC e/ou gB (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007). Apesar desta interação aumentar significativamente a eficiência da infecção por HSV, ela não é absolutamente essencial e irreversível, ao menos pelo que foi observado *in vitro*, pois mutantes que não expressaram a gC, não perderam a capacidade de infectar células em cultura (BENDER et al., 2005).

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 herpesvírus [*Herpesvirus Entry Mediator* (HVEM)], ou o sulfato de heparana, especificamente modificado (BENDER et al., 2005; HELDWEIN et al., 2006). O HVEM 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).

O HSV-1 e o HSV-2 divergem na preferência pelos receptores, apesar do HVEM e da nectina-1 serem importantes receptores de entrada para ambos os sorotipos. A nectina-2 é inativa para HSV-1 e tem uma fraca atividade na entrada do HSV-2; a recíproca acontece para o sulfato de heparana modificado (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**. Os mecanismos de atuação da gB e da gH/gL são desconhecidos. Suas estruturas são conservadas entre todos os membros da família dos herpesvírus, ao contrário da gC e da gD, conservadas apenas entre os  $\alpha$ -herpesvírus. Tanto a gB quanto o heterodímero gH/gL são necessários para a entrada do vírus na célula, e qualquer um ou

ambos, presumivelmente, recebem o sinal da gD e sofrem alterações conformacionais (HELDWEIN et al., 2006; SPEAR, 2004).

Um estudo realizado por Bender et al. (2005) mostrou que mutantes que não expressavam a gC tinham sua adsorção reduzida, porém a infecciosidade viral era mantida. Já os vírus privados da gB não foram capazes de penetrar nas células-alvo. Por isso, a gC é considerada uma glicoproteína não essencial de entrada, ao contrário da gB, que é essencial.

Após entrar na célula, o nucleocapsídeo é transportado via microtúbulos do citoesqueleto, através da interação da proteína do tegumento U<sub>L</sub>34 com a dineína celular (YE et al., 2000), 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 (WHITE; FENNER, 1994). A entrada do genoma viral é acompanhada pela entrada da proteína do tegumento VP16 e *vhs*. A VP16, juntamente com as proteínas celulares Oct-1 e HCF-111, promovem a transcrição viral imediata ligando-se a uma região específica do genoma viral (NARAYANAN et al., 2005; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007). Já a proteína *vhs* parece permanecer no citoplasma, onde promove a degradação do RNA celular e viral, sendo que o último permanece em vantagem, uma vez que sua produção está altamente induzida (WHITE; FENNER, 1994; WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

Como dito, após a entrada do genoma viral no núcleo celular, iniciam-se os processos de transcrição, tradução, replicação e montagem de novos capsídeos.

Transcrição, tradução e replicação: o processo de transcrição, no qual a RNA polimerase II celular sintetiza RNAm a partir do DNA viral, e a síntese proteica acontecem de forma coordenada, em três fases: imediata ( $\alpha$ ), precoce ( $\beta$ ) tardia ( $\gamma$ ). A transcrição do DNA viral acontece no núcleo e é esperado que todas as proteínas virais sejam sintetizadas no citoplasma, sendo expressas mais de 84 proteínas diferentes (COLBERE, 1975; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007; SU et al., 2008).

A transcrição viral imediata é estimulada pela VP16 e por quinases celulares dependentes de ciclinas (SCHANG; PHILLIPS; SCHAFFER, 1998; SCHANG; ROSENBERG; SCHAFFER, 1999). A expressão desses genes ocorre aproximadamente 2 a 4 h após a infecção e são sintetizadas seis

proteínas chamadas de *Infected Cell Proteins* (ICP): ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 e Us1.5. Essas proteínas funcionam como transativadoras da fase seguinte, regulando a expressão gênica viral em nível transcricional (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007).

A porção N-terminal da ICP0 é requerida para ativar os promotores dos genes  $\alpha$ , mas um domínio separado ativa os genes  $\beta$  e  $\gamma$  (LIUM et al., 1998). Então, a ICP0 pode ativar a expressão de todas as classes dos genes virais, pois aumenta a estabilidade dos níveis de RNAm (JOELS; DE KLOET, 1992).

A proteína ICP4 reprime a expressão dos genes  $\alpha$  e ativa a expressão dos genes  $\beta$  e  $\gamma$ , interagindo com os fatores de transcrição da RNA polimerase II, portanto, na ausência desta proteína todos os processos transcricionais, que ocorreriam após a expressão dos genes  $\alpha$ , não ocorrem (GU; DELUCA, 1994).

A ICP22 modifica a RNA polimerase II (RICE et al., 1995) e a ICP27 redistribui os complexos nucleares ribonucleicos e interfere no *splicing* (remoção dos íntrons) dos transcritos  $\alpha$  (HARDY; SANDRI-GOLDIN, 1994). Portanto, esta proteína é requerida para a transição da expressão dos genes  $\alpha$  para a expressão dos genes  $\beta$  e  $\gamma$ .

Já a ICP47 impede o transporte dos peptídeos antigênicos para o retículo endoplasmático (HILL et al., 1995) e é crucial para a neurovirulência, porque inibe a resposta das células T CD8<sup>+</sup> (GOLDSMITH et al., 1998).

A expressão dos genes  $\alpha$  acarreta a ativação da transcrição dos genes precoces  $\beta$ , que codificam, principalmente, enzimas envolvidas na síntese e replicação do DNA viral: uma subunidade catalítica da DNA polimerase (U<sub>L</sub>30) e sua proteína acessória (U<sub>L</sub>42), proteína de ligação ao DNA simples fita (ICP8), complexo helicase-primase formado por 3 proteínas (U<sub>L</sub>5, U<sub>L</sub>8 e U<sub>L</sub>52), uma proteína de ligação (U<sub>L</sub>9), além das enzimas necessárias para o metabolismo do DNA viral (ribonucleotídeo redutase, timidina quinase, dUTPase, uracil DNA glicosilase, entre outras). A síntese dessas proteínas atinge seu pico entre 5 a 7 h P.I. (pós-infecção) e quando níveis suficientes das mesmas acumulam-se no interior da célula infectada, inicia-se a síntese do DNA viral. Além das proteínas de fase  $\beta$  citadas acima, existem outras que estão envolvidas no aumento dos estoques de desoxirribonucleotídeos das células infectadas, enquanto outras exercem a função de enzimas de reparo para os

genomas virais recém-sintetizados (BOEHMER; LEHMAN, 1997; ELLERMANN-ERIKSEN, 2005; WHITE; FENNER, 1994; WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

Os genes tardios ( $\gamma$ ) são ativados pelos produtos dos genes  $\beta$  e esta expressão é máxima após a replicação e acumulação do DNA viral. A ativação destes genes ocorre em torno de 12 h P.I. A maioria dos produtos gênicos codificados são proteínas estruturais do capsídeo e tegumento, e outras que formam a partícula do vírion, como as glicoproteínas do envelope viral (BOEHMER; LEHMAN, 1997; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007).

Montagem e liberação dos vírions: após a síntese das proteínas estruturais do capsídeo no citoplasma, estas 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.

Os nucleocapsídeos se associam a porções modificadas da membrana nuclear interna, que contém as proteínas do tegumento. Estas partículas estão temporariamente envelopadas e são liberadas no espaço nuclear intermembranário. A rota viral a partir deste passo ainda é controversa e, provavelmente, duas rotas da saída viral são possíveis. Uma maneira é pela passagem contínua, através de vesículas e do complexo de Golgi, onde a membrana proteica é modificada, e, portanto, o envelope lipoproteico viral seria proveniente da membrana nuclear interna. Outra rota é a fusão do envelope recém-adquirido à membrana externa nuclear ou à membrana de vesículas, gerando nucleocapsídeos nus no citoplasma, os quais passariam por um novo processo de brotamento no complexo de Golgi. Nesta rota, o envelope lipoproteico é adquirido de outras membranas e não da membrana nuclear interna. Atualmente, a rota de saída dos HSV mais aceita é a última citada (ELLERMANN-ERIKSEN, 2005; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007; VAN GENDEREN et al., 1994).

Os vírions maduros migram para a superfície celular, fundem-se com a membrana plasmática, e são liberados no espaço extracelular por exocitose. Portanto, a infecção produtiva de uma célula resulta na sua destruição, devido às mudanças bioquímicas e estruturais induzidas pela replicação viral (ELLERMANN-ERIKSEN, 2005; WHITE; FENNER, 1994).



*In vitro*, o processo completo de replicação viral dura, aproximadamente, 18 a 20 horas, e é citolítico (COLBERE, 1975; ROIZMAN; KNIFE; WHITLEY, 2007; WHITE; FENNER, 1994; WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

## 2.2 Terapia anti-herpética

Atualmente, o arsenal quimioterápico para infecções virais compreende cerca de 50 fármacos aprovados oficialmente para uso clínico. A maioria deles foi aprovada nos últimos cinco anos, sendo que metade é utilizada para o tratamento das infecções causadas pelo HIV (DE CLERCQ, 2009b). Os demais antivirais são utilizados contra os vírus das hepatites B e C, vírus influenza, vírus respiratório sincicial e vírus herpéticos, incluindo neste último grupo o vírus da varicela zoster, o citomegalovírus e os HSV tipos 1 e 2 (DE CLERCQ, 2009a; ROTTINGHAUS; WHITLEY, 2007).

Os fármacos usados para o tratamento das infecções pelos HSV incluem os inibidores da replicação viral (aciclovir, valaciclovir, penciclovir, fanciclovir, idoxuridina, trifluridina, brivudina, vidarabina, cidofovir e foscarnet) e o docosanol, que é um inibidor da entrada dos vírions nas células (MAMIDYALA; FIRESTINE, 2006; ROTTINGHAUS; WHITLEY, 2007).

O fármaco de primeira escolha para o tratamento das infecções pelo HSV-1 e/ou HSV-2 é o aciclovir (ACV). O ACV é monofosforilado pela timidina quinase (TQ) expressa pelo HSV e convertido pelas quinases celulares para a sua forma ativa, o ACV trifosfatado, que inibe a replicação herpética por inibição competitiva pela DNA polimerase viral e consequente inibição do alongamento da síntese da cadeia do DNA viral (ELION et al., 1977). A alta seletividade deste fármaco está relacionada à sua ativação preferencial pela TQ viral e à alta sensibilidade da DNA polimerase viral ao ACV trifosfatado (STRASFELD; CHOU, 2010). Os HSV desenvolvem resistência ao ACV predominantemente como resultado de alterações nas TQs virais e, com menos frequência, como resultado de mutações na DNA polimerase viral (KIMBERLIN et al., 1995).

O uso destes fármacos antivirais pode ser afetado pela toxicidade dose-limitante. Embora o ACV seja considerado relativamente de baixa toxicidade, altas doses foram associadas com nefrotoxicidade (WAGSTAFF; FAULDS; GOA, 1994) e

encefalopatia (HAEFELI et al., 1993; ORMROD; SCOTT; PERRY, 2000).

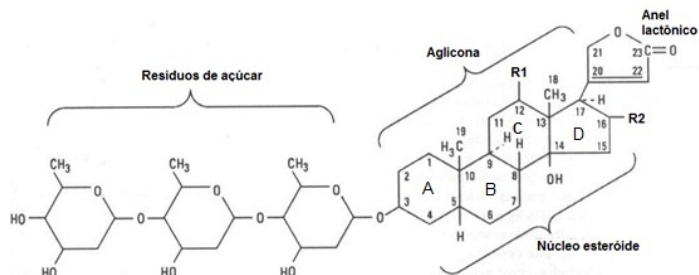
Logo, os fatos aqui expostos mostram a importância e a necessidade da P&D de novos fármacos anti-herpéticos eficazes, com efeitos deletérios mínimos e com mecanismos de ação diferenciados, os quais poderão substituir ou complementar os usados atualmente.

## 2.3 Cardenólídeos

Os cardenólídeos são encontrados em algumas famílias vegetais, tais como Apocynaceae e Plantaginaceae (RATES; BRIDI, 2003; TASKOVA; GOTFREDSEN; JENSEN, 2005), e em animais (hipotálamo bovino) (TYMIAK et al., 1993). Alguns trabalhos já relataram que seres humanos apresentam a capacidade de produzir substâncias semelhantes à ouabaina (HAMLYN et al., 1991) e à digoxina (GOTO et al., 1990) endógenas. Além disso, outros grupos de pesquisa demonstraram que o colesterol e a progesterona são substratos para a biossíntese de cardenólídeos endógenos e esta produção é controlada por outros hormônios, como a renina-angiotensina, endotelina e adrenalina (BAGROV; SHAPIRO; FEDOROVA, 2009; QAZZAZ et al., 2004).

### 2.3.1 Estrutura química dos cardenólídeos

Os cardenólídeos apresentam em sua estrutura um núcleo esteroidal e um anel pentagonal lactônico insaturado na posição  $\alpha,\beta$  insaturada do C17 $\beta$  (porção aglicona ou genina), além de uma porção açúcar ligada ao C3 $\beta$ . Nos cardenólídeos, os anéis A/B e C/D apresentam-se na conformação *cis*, enquanto os anéis B/C encontram-se fusionados na conformação *trans* (RATES; BRIDI, 2003). Em relação à sua porção aglicona, os cardenólídeos são divididos em seis séries, de acordo com a estrutura química das agliconas (KREIS; HENSEL; STUHLEMMER, 1998). A Figura 2 ilustra o esqueleto básico dos cardenólídeos.



**Figura 2:** Estrutura química de um cardenólídeo.

Fonte: adaptado de RATES; BRIDI (2003).

Uma grande variedade de açúcares pode estar ligada ao C3 da aglicona e os mais comuns são digitoxose, oleandrose, diginose, ramnose, fucose, tevetose, digitalose e glicose (RATES; BRIDI, 2003). Embora os açúcares não sejam os responsáveis pela atividade cardiotônica dos cardenólídeos, eles afetam sua farmacodinâmica e farmacocinética. Por exemplo, agliconas são absorvidas mais rapidamente e metabolizadas mais facilmente que cardenólídeos glicosilados (PRASSAS; DIAMANDIS, 2008). No entanto, a presença dos açúcares confere maior solubilidade, fator importante na absorção e distribuição dessas moléculas pelo corpo, e a configuração dos açúcares influencia a afinidade da ligação pelo sítio ligante da proteína receptora (RATES; BRIDI, 2003).

### 2.3.2 Principal ação farmacológica e indicações terapêuticas dos cardenólídeos

Os cardenólídeos são caracterizados pela sua alta especificidade e poderosa ação que exercem no músculo cardíaco, tendo como principal ação farmacológica sua ação cardiotônica. Por isso, são utilizados para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva (ICC), podendo ser administrados em associação com diuréticos, se existir fibrilação auricular. Também são recomendados na profilaxia e tratamento de algumas arritmias como fibrilação atrial e taquicardia atrial

paroxística e, ainda, no tratamento do choque cardiogênico (RATES; BRIDI, 2003).

O principal cardenólídeo utilizado terapeuticamente é a digoxina, mas existem outros que também o são. No mercado farmacêutico brasileiro, estão disponíveis medicamentos elaborados com digoxina e deslanosídeo (BRASIL, 2008).

### **2.3.3 Mecanismo da ação cardiotônica**

O mecanismo da ação cardiotônica ocorre através da inibição da enzima NKATPase, envolvida no mecanismo da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dependente destes íons, que promove, neste caso, a contração muscular cardíaca (HORISBERGER, 2004). Com a inibição desta bomba, os níveis de  $\text{Na}^+$  no interior dos miócitos aumentam, ao contrário do que acontece com os íons  $\text{K}^+$ , que são expelidos para fora da célula, sendo que esta troca iônica ocorre através do gasto de moléculas de ATP. O aumento intracelular dos íons  $\text{Na}^+$  leva à modulação da atividade de um carreador de membrana envolvido nas trocas de íon  $\text{Ca}^{2+}$  por íons  $\text{Na}^+$ , promovendo o aumento dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , por influxo ou pela mobilização dos reservatórios sarcoplasmáticos. Tal elevação da concentração intracelular dos íons cálcio resulta no aumento da força contrátil cardíaca, pois o  $\text{Ca}^{2+}$  fica disponível para as proteínas contráteis (RAHIMTOOLA; TAK, 1996).

No coração relaxado, a tropomiosina mascara o sítio de ligação da miosina, através de um bloqueio estérico. No processo de contração muscular, o contato dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  com a troponina resulta numa alteração conformacional na tropomiosina, desmascarando o sítio de ligação da miosina e possibilitando a formação do complexo actina-miosina e, assim, induzindo a contração miocárdica ATP-dependente. Portanto, o aumento dos níveis intracelulares dos íons  $\text{Ca}^{2+}$ , ocasionado pelo tratamento com cardenólídeos, provoca um aumento do tônus muscular e do volume sanguíneo circulante por minuto e reduz a frequência e o volume cardíaco (RATES; BRIDI, 2003).

### **2.3.4 Outros mecanismos de ação dos cardenólídeos**

Publicações recentes têm sugerido mecanismos adicionais ao modo clássico da ação inibitória da bomba

NKATPase pelos cardenolídeos, apresentando novas possibilidades terapêuticas para os mesmos (PRASSAS; DIAMANDIS, 2008).

Uma das possibilidades sugeridas é sua potencial ação antitumoral (MIJATOVIC et al., 2007), tendo em vista que vários autores já relataram os efeitos citotóxicos da digoxina (BIELAWSKI; WINNICKA; BIELAWSKA, 2006; RAGHAVENDRA et al., 2007), da digitoxina (JOHANSSON et al., 2001; LOPEZ-LAZARO et al., 2005), da ouabaína (KULIKOV et al., 2007) e da digitoxigenina (RAGHAVENDRA et al., 2007).

Outra aplicação recentemente sugerida diz respeito à sua potencial ação antiviral, mais especificamente, ao efeito inibitório da replicação do vírus herpético humano do tipo 1 (HSV-1) pela digoxina (HARTLEY et al., 2006), pela ouabaína (DODSON et al., 2007) e pela digitoxina (SU et al., 2008).

Hartley e colaboradores (HARTLEY, 2009; 2006) relataram a atividade antiviral da digoxina contra alguns vírus DNA (HSV-1, HSV-2, vírus da varicela zoster, citomegalovírus e adenovírus). Neste estudo foi investigada a importância da concentração extracelular do íon  $K^+$  através da avaliação do funcionamento de duas bombas iônicas existentes na membrana plasmática celular: bomba  $Na^+/K^+$  (NKATPase) e bomba  $Na^+/K^+/Cl^-$  (NKCC). A NKCC existe sob duas isoformas: NKCC 1 e 2, sendo que a isoforma 1 está presente em quase todos os tipos celulares e a isoforma 2 é exclusivamente encontrada em células renais. Suas funções incluem a manutenção da alta concentração interna de  $Cl^-$ , a qual acarreta o equilíbrio eletroquímico e a regulação do volume celular (RUSSEL, 2000). Enquanto a NKCC é responsável pelo influxo dos íons  $Na^+$ ,  $K^+$  e  $Cl^-$ , a NKATPase promove o influxo de  $K^+$  e o efluxo de  $Na^+$ . Portanto, estes autores basearam seus estudos no influxo de  $K^+$ , já que este íon parece ser essencial para a síntese do DNA viral (HARTLEY et al., 1993). A partir destas evidências, se estes vírus DNA forem realmente dependentes do  $K^+$  para sua replicação, a ausência controlada deste íon celular poderia ser considerada uma estratégia para a P&D de um amplo espectro de fármacos antivirais.

Dodson e colaboradores (2007) relataram a atividade anti-HSV-1 (cepa KOS) de outro inibidor da bomba  $Na^+/K^+$ , a ouabaína. Esta substância exerce sua atividade antiviral se adicionada até 8h P.I. e reduz a expressão dos genes imediatos

e precoces em pelo menos 5X. Portanto, a ouabaína exerce sua ação antiviral no estágio após a fusão do vírus com a membrana plasmática celular.

Su e colaboradores (2008) avaliaram a atividade anti-herpética da digitoxina. Além deste cardenolídeo, foram avaliados alguns análogos estruturais, ou seja, digoxina, ouabaína octahidratada, G-estrofantina, digitoxigenina, digoxigenina e gitoxigenina, que também apresentaram significativa atividade anti-herpética. A digitoxina inibiu a expressão de genes precoces virais e bloqueou a liberação de novos vírions formados. Quando esta substância foi testada contra uma cepa viral de HSV resistente ao aciclovir, ela também conseguiu inibir a replicação viral, o que demonstra que este cardenolídeo pode representar uma nova classe de fármacos com mecanismos antivirais distintos dos fármacos utilizados tradicionalmente.

Adicionalmente, Deng e colaboradores (2007) avaliaram a atividade antiviral, frente ao vírus da vaccínia, dos glicosídeos cardíacos: digoxina, cimarina, neriifolina, ouabaína e lanatosídeo C, e relataram sua capacidade de inibir a replicação deste vírus, que é um vírus DNA dupla fita. Os experimentos também demonstraram que os cardenolídeos (digoxina, cimarina e ouabaína) reduziram ou inibiram completamente a síntese da maioria das proteínas virais tardias e que muitas das proteínas precoces foram sintetizadas normalmente.

Além dos quatro estudos citados acima, realizados com vírus DNA, Hoffmann e colaboradores (2008) realizaram um estudo com a ouabaína e o lanatosídeo C quanto à sua capacidade de modular, positiva ou negativamente, o ciclo de replicação de vírus RNA (vírus influenza, vírus da doença de New Castle e vírus da estomatite vesicular). Foi demonstrado que o tratamento com os ativadores dos canais de  $\text{Na}^+$  (ouabaína ou lanatosídeo C) ou com um inibidor da proteína quinase C (rottlerina) reduziu significativamente a replicação viral, ficando claro que a regulação da quantidade intracelular dos íons  $\text{Na}^+$  pode representar um novo alvo para o desenvolvimento de fármacos antivirais, tanto para vírus RNA quanto vírus DNA.

A partir dos resultados apresentados por estes pesquisadores em relação à potencial atividade antiviral de cardenolídeos, pode-se constatar a complementaridade existente principalmente entre os dados apresentados por Hartley e

colaboradores (2006) e por Hoffmann e colaboradores (2008), já que os primeiros autores discutiram a importância da concentração intracelular dos íons  $K^+$  para a replicação viral, e o segundo grupo ressaltou a importância da concentração intracelular dos íons  $Na^+$  para a inibição do ciclo viral. Portanto, ficou comprovado que os cardenólídeos testados possuem atividade anti-ATPásica, diminuindo a concentração intracelular de íons  $K^+$ , aumentando a concentração intracelular dos íons  $Na^+$  e conseqüentemente a dos íons  $Ca^{++}$ , o que resultou também na inibição da replicação viral, pois os vírus testados parecem depender da concentração intracelular fisiológica de  $K^+$ .

Assim sendo, neste trabalho será realizada a triagem antiviral (anti-HSV-1 e anti-HSV-2) de uma série de cardenólídeos e derivados, de origem vegetal, sintética e microbiana (esses últimos obtidos por biotransformação fúngica), assim como a elucidação do mecanismo da ação anti-herpética de alguns dos compostos mais ativos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação anti-herpética de uma série de cardenolídeos e derivados de origem vegetal, sintética e microbiana, e determinar o mecanismo de ação daqueles que apresentaram resultados promissores.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade dos cardenolídeos e derivados, em células VERO e GMK AH1;
- Realizar a triagem anti-herpética [anti-HSV-1 (cepas KOS e 29-R) e anti-HSV-2 (cepa 333)] dos cardenolídeos e derivados, e selecionar os compostos com resultados promissores;
- Avaliar o desempenho dos compostos selecionados na presença de diferentes concentrações virais;
- Avaliar a ação virucida direta dos compostos selecionados;
- Avaliar a influência dos compostos selecionados na replicação viral, em função do tempo;
- Avaliar o efeito dos compostos selecionados na adsorção e na penetração viral;
- Avaliar a interferência de um dos compostos selecionados na expressão gênica, nas diferentes fases da replicação do HSV-1 (cepa KOS);
- Avaliar a interferência dos compostos selecionados na expressão proteica do HSV-1 (cepa KOS);
- Avaliar o efeito dos compostos selecionados sobre a liberação viral;
- Avaliar o efeito dos compostos selecionados na propagação intercelular viral;
- Avaliar a potencial ação anti-ATPásica dos compostos selecionados;
- Propor o mecanismo da ação anti-herpética dos compostos selecionados.



## 48 Objetivos

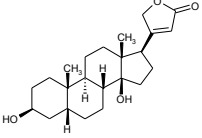
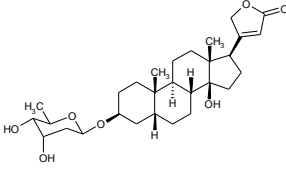
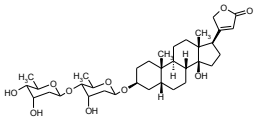
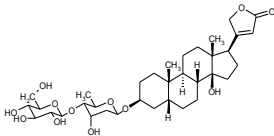
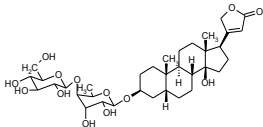
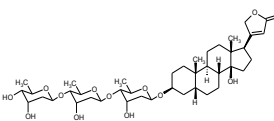
## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Materiais de estudo**

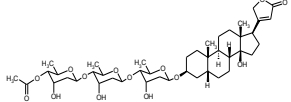
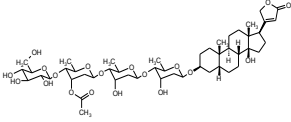
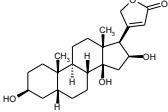
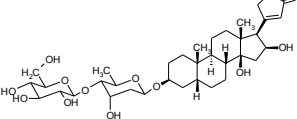
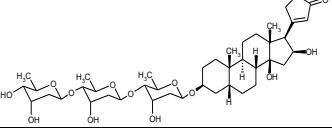
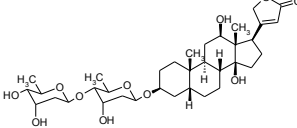
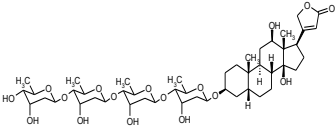
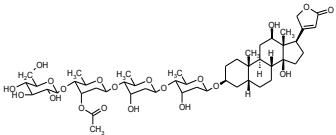
Foram testados sessenta e cinco derivados cardenolídeos (Quadro 3) de origem vegetal, sintética ou microbiana, fornecidos gentilmente pelo Prof. Dr. Fernão Castro Braga, da Faculdade de Farmácia da UFMG e pelo Prof. Dr. Wolfgang Kreis, da Friedrich-Alexander Universität da Alemanha, a quem agradecemos esta frutífera parceria.

Para a preparação das soluções-estoques, foram pesadas as massas necessárias para a obtenção das mesmas, em concentrações variadas, dependendo da disponibilidade de cada amostra. A solubilização foi feita com dimetilsulfóxido (DMSO, Merck). Para a realização dos ensaios, as soluções-estoques foram diluídas em meio de cultura para obtenção das concentrações desejadas, não ultrapassando 1% de DMSO.

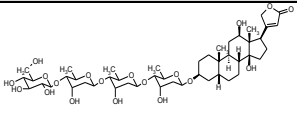
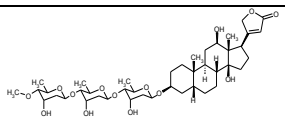
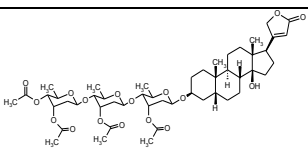
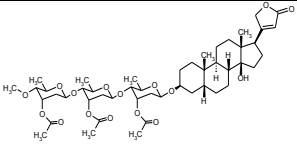
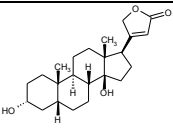
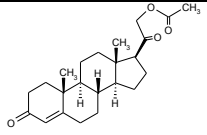
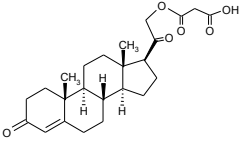
**Quadro 3:** Cardenólídeos e derivados utilizados para a triagem da atividade anti-herpética. (continua)

Código (Origem)	Composto	PM (g/mol)	Estrutura Química
1 (V)	Digitoxigenina	374	
2 (V)	Digitoxigenina - monodigitoxosídeo	504	
3 (V)	Digitoxigenina – bisdigitoxosídeo	634	
4 (V)	Glucoevatromonosídeo	666	
5 (V)	Glicodigifucosídeo	682	
6 (V)	Digitoxina	764	

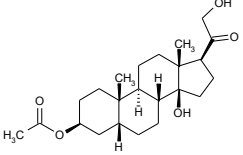
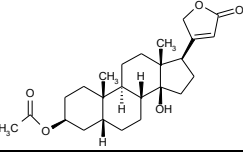
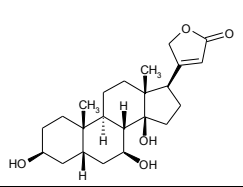
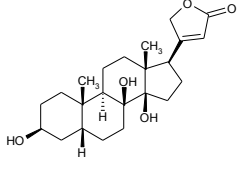
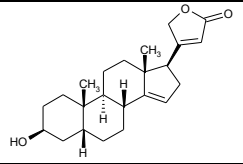
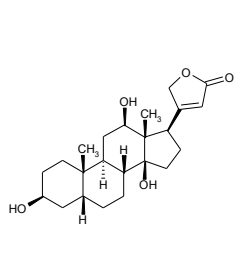
**Quadro 3:** Cardenólídeos e derivados utilizados para a triagem da atividade anti-herpética. (continuação)

Código (Origem)	Composto	PM (g/mol)	Estrutura
7 (V)	$\beta$ -acetildigitoxina	806	
8 (V)	Lanatosídeo A	969	
9 (V)	Gitoxigenina	390	
10 (V)	Glicogitorosídeo	682	
11 (V)	Gitoxina	780	
12 (V)	Digoxigenina – bisdigitoxosídeo	650	
13 (V)	Digoxigenina – tetradigitoxosídeo	911	
14 (V)	Lanatosídeo C	985	

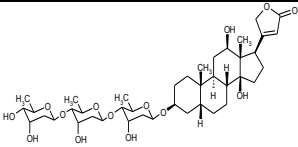
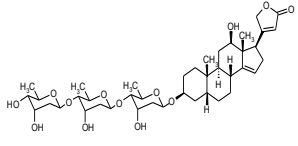
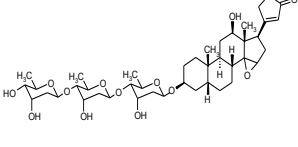
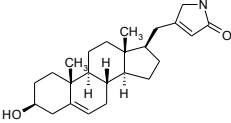
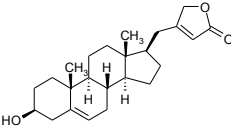
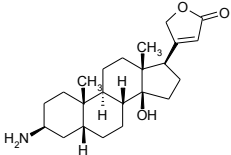
**Quadro 3:** Cardenólídeos e derivados utilizados para a triagem da atividade anti-herpética. (continuação)

Código (Origem)	Composto	PM (g/mol)	Estrutura
15 (V)	Desacetil – lanatosídeo C	943	
16 (SS)	$\beta$ -metildigoxina	796	
18 (SS)	Digitoxina peracetilada	915	
19 (SS)	$\beta$ -metildigitoxina peracetilada	899	
20 (SS)	<i>Epi</i> -digitoxigenina 3 $\alpha$ -OH	764	
21 (SS)	21-O-acetil-desoxicorticosterona	418	
22 (SS)	21-O-malonil-desoxicorticosterona	373	

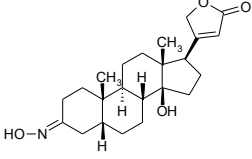
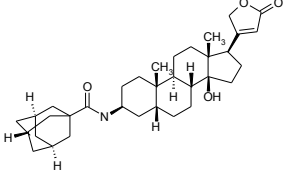
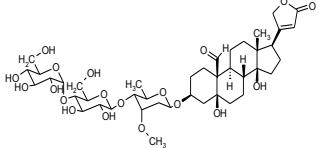
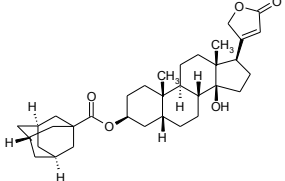
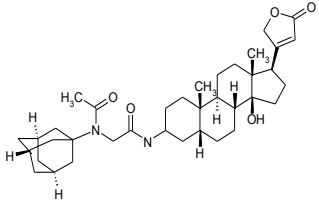
**Quadro 3:** Cardenólídeos e derivados utilizados para a triagem da atividade anti-herpética. (continuação)

Código (Origem)	Composto	PM (g/mol)	Estrutura
23 (SS)	20,21 – Cetol da 3 $\beta$ -O-acetildigitoxigenina	400	
24 (SS)	3 $\beta$ -O-acetildigitoxigenina	402	
25 (BF)	7 $\beta$ -hidroxidigitoxigenina	390	
26 (BF)	8 $\beta$ -hidroxidigitoxigenina	390	
27 (SS)	$\Delta^{14-15}$ digitoxigenina	356	
28 (V)	Digoxigenina	390	

**Quadro 3:** Cardenólídeos e derivados utilizados para a triagem da atividade anti-herpética. (continuação)

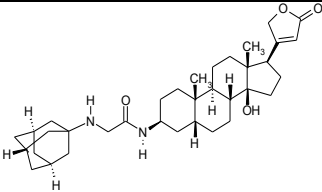
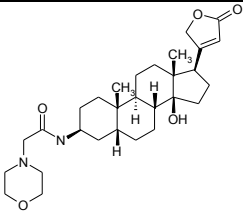
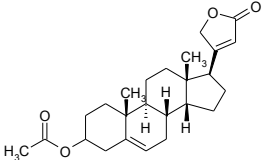
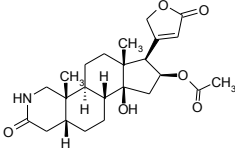
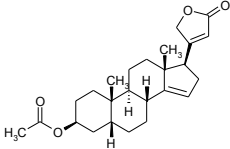
Código (Origem)	Composto	PM (g/mol)	Estrutura
29 (V)	Digoxina	781	
30 (SS)	-----	763	
31 (SS)	-----	779	
32 (SS)	-----	369	
33 (SS)	-----	370	
35 (SS)	-----	373	

**Quadro 3:** Cardenólídeos e derivados utilizados para a triagem da atividade anti-herpética. (continuação)

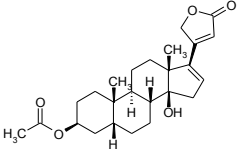
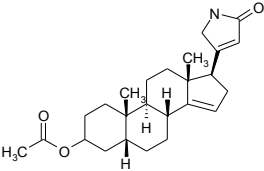
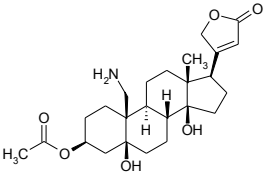
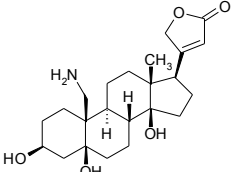
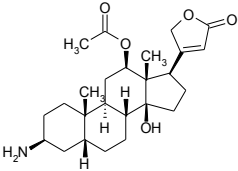
Código (Origem)	Composto	PM (g/mol)	Estrutura
36 (SS)	-----	387	
37 (SS)	-----	552	
38 (V)	K-Estrofantosídeo	873	
39 (SS)	-----	553	
40 (SS)	-----	623	



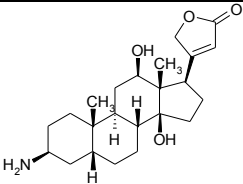
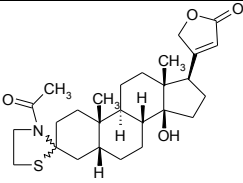
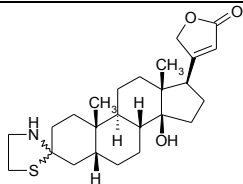
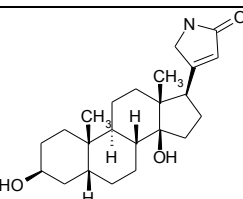
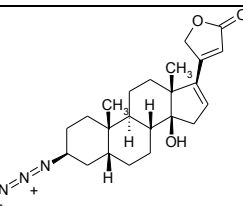
**Quadro 3:** Cardenólídeos e derivados utilizados para a triagem da atividade anti-herpética. (continuação)

Código (Origem)	Composto	PM (g/mol)	Estrutura
41 (SS)	-----	581	
42 (SS)	-----	500	
43 (SS)	-----	398	
44 (SS)	-----	431	
45 (SS)	-----	398	

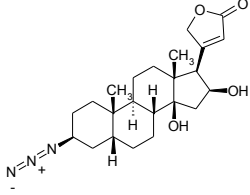
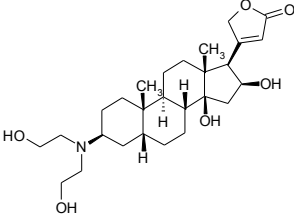
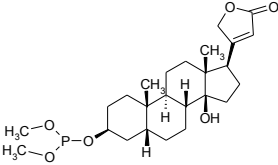
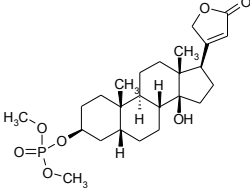
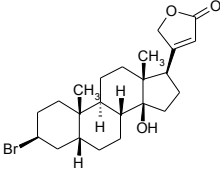
**Quadro 3:** Cardenólídeos e derivados utilizados para a triagem da atividade anti-herpética. (continuação)

Código (Origem)	Composto	PM (g/mol)	Estrutura
46 (SS)	-----	414	
47 (SS)	-----	397	
48 (SS)	-----	447	
49 (SS)	-----	405	
50 (SS)	-----	431	

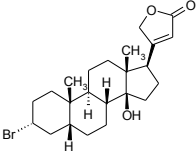
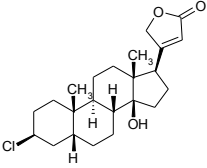
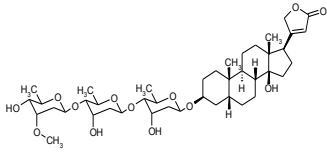
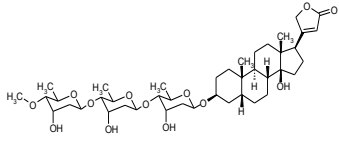
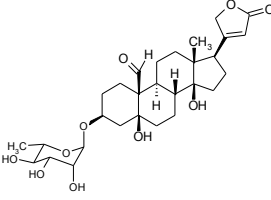
**Quadro 3:** Cardenólídeos e derivados utilizados para a triagem da atividade anti-herpética. (continuação)

Código (Origem)	Composto	PM (g/mol)	Estrutura
51 (SS)	-----	389	
52 (SS)	-----	473	
53 (SS)	-----	431	
55 (SS)	-----	373	
56 (SS)	-----	399	

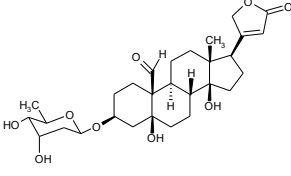
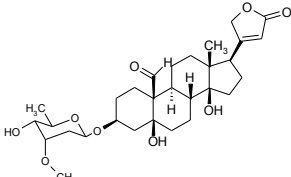
**Quadro 3:** Cardenólídeos e derivados utilizados para a triagem da atividade anti-herpética. (continuação)

Código (Origem)	Composto	PM (g/mol)	Estrutura
57 (SS)	-----	417	
58 (SS)	-----	477	
59 (SS)	-----	466	
60 (SS)	-----	482	
61 (SS)	-----	437	

**Quadro 3:** Cardenólídeos e derivados utilizados para a triagem da atividade anti-herpética. (continuação)

Código (Origem)	Composto	PM (g/mol)	Estrutura
62 (SS)	-----	437	
63 (SS)	-----	393	
64 (SS)	α-metil-digitoxina	779	
65 (SS)	β-metil-digitoxina	779	
66 (V)	Convalatoxina	550	

**Quadro 3:** Cardenólídeos e derivados utilizados para a triagem da atividade anti-herpética. (conclusão)

Código (Origem)	Composto	PM (g/mol)	Estrutura
67 (V)	Helveticosídeo	534	
68 (V)	Cimarina	549	

Origem: V = vegetal; SS = semissintética; BF = biotransformação fúngica.

## 4.2 Culturas celulares

### 4.2.1 Células

Foram utilizadas células VERO (ATCC:CCL 81 e Instituto Adolfo Lutz/SP) e GMK AH1 (Departamento de Virologia Clínica, Universidade de Göteborg, Suécia), ambas culturas contínuas de fibroblastos de macaco verde da África (*Cercopithecus aethiops*), cultivadas a 37 °C, em atmosfera umedecida de 5% de CO<sub>2</sub>.

Estas duas linhagens celulares, VERO e GMK AH1, foram escolhidas por serem permissivas à replicação *in vitro* do HSV-1 e do HSV-2, respectivamente. Esta permissividade possibilita a multiplicação viral, causando efeito citopático reprodutível e visível ao microscópio invertido (HU; HSIUNG, 1989).

Durante a realização deste trabalho, as linhagens celulares foram testadas sistematicamente para atestar a ausência de micoplasmas, conforme rotina implementada no Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC.

### 4.2.2 Meio de cultura e reagentes

O meio utilizado para o crescimento e manutenção das células foi o meio MEM (Minimal Essential Medium - Cultilab) adicionado de 0,22% de bicarbonato de sódio (Sigma) para que o pH permanecesse entre 7,2 - 7,4. Este meio foi suplementado com soro fetal bovino (SFB - Gibco), 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, foi adicionado 1% de PSA (Cultilab - 10.000U de penicilina G, 10.000 µg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B) ao meio. Para a obtenção de subculturas celulares, manutenção das células e realização dos experimentos, utilizou-se como agente dissociante a tripsina (enzima proteolítica obtida de pâncreas suíno, Sigma), preparada em uma solução de EDTA (Sigma) 1:250 a 0,25%.

## **4.3 Vírus**

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

Os vírus utilizados foram o Herpes Simplex Virus tipo 1 (HSV-1), cepas KOS e 29R (sensível e resistente ao aciclovir, respectivamente), ambas provenientes da Faculdade de Farmácia, Universidade de Rennes, França.

Também foi utilizado o Herpes Simplex Virus tipo 2 (HSV-2), cepa 333, proveniente do Departamento de Virologia Clínica da Universidade de Göteborg, Suécia.

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

As suspensões-estoques virais foram preparadas como descrito por Simões e colaboradores (1999).

Culturas celulares foram tripsinizadas 24 h antes da infecção viral. Após este período, o meio de cultura foi aspirado e a monocamada celular foi lavada 3x com solução tampão fosfato (PBS) para que fossem retirados restos celulares e resquícios de SFB, tendo em vista que o SFB possui alguns componentes que inibem o ciclo de replicação viral (FRESHNEY, 2005). Após, a monocamada celular foi inoculada com 1 mL da suspensão viral e o frasco foi incubado por 1 h a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> para permitir a adsorção e penetração viral. Ao final deste período, o excesso de vírus foi retirado por sucção a vácuo e 10 mL de meio MEM sem SFB foram adicionados e os frascos incubados nas mesmas condições descritas acima.

Os HSV tipos 1 e 2 possuem um ciclo de replicação com duração de 18 h (FLINT et al., 2000), por isso o efeito citopático viral (ECP) foi monitorado por microscópio invertido a cada ciclo de replicação. Quando a monocamada celular se mostrou totalmente destruída pelo vírus, o frasco foi congelado a -80°C e descongelado a 37°C por 3x para que ocorresse o rompimento celular total e consequente liberação das partículas virais. A suspensão obtida foi centrifugada por 10 min a 350 Xg em centrífuga refrigerada a 4°C para que os restos celulares fossem separados dos vírus. O sobrenadante resultante foi aliquoteado em tubos estéreis, titulado e armazenado a -80°C até sua utilização.



### 4.3.3 Determinação dos títulos infecciosos virais

Antes de se realizar a avaliação da potencial atividade antiviral das amostras, é de suma importância o conhecimento da infecciosidade dos inóculos virais produzidos. A infecciosidade pode ser determinada como unidades formadoras de placas (UFP) e assim, será conhecida a concentração viral (UFP) por mL, ou seja, o título viral. O título infeccioso de todos os estoques virais foi determinado através do método de contagem de placas de lise, descrito por Burleson; Chambers e Wiedbrauk (1992).

Todos os ensaios foram realizados em placas de 24 cavidades, preparadas da seguinte maneira: suspensões de células VERO para HSV-1 ou GMK AH1 para HSV-2, 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°C em estufa de CO<sub>2</sub> até a confluência (24h).

No dia seguinte, o meio de cultura de cada cavidade foi aspirado cuidadosamente e a monocamada celular foi lavada com PBS. Essas células foram infectadas com 400 µL da suspensão-estoque viral, diluída na razão 1:10, em meio MEM com 1% de PSA sem SFB (três réplicas para cada diluição). As placas foram incubadas durante 1 h, tendo sido agitadas cuidadosamente a cada 15 min para uma melhor distribuição da suspensão viral. Após esse tempo, a suspensão viral foi aspirada e as células mais uma vez lavadas com PBS. A cada cavidade, foram adicionados 500 µL de uma solução de CMC<sup>1</sup> (carboximetilcelulose). As placas foram novamente incubadas por 72 e 48 h para o HSV-1 e HSV-2, respectivamente. Após este período, o meio foi retirado e as células fixadas e coradas pela adição de 200 µL da solução do corante preto de naftaleno<sup>2</sup> por 30 min, à temperatura ambiente, em agitador mecânico

---

<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 acrescidos 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 100 mL de uma solução aquosa a 5% de ácido acético (v/v) (Merck), sendo o pH ajustado, 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.

horizontal. Após este tempo, o corante foi aspirado e as placas de cultura foram colocadas para secar, à temperatura ambiente. As placas de lise viral foram quantificadas através da visualização em microscópio estereoscópico. Para calcular os títulos virais, foram contados os focos de infecção na última diluição, 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 = nº médio de placas de lise da última diluição que apresentou focos;

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

V = volume de inóculo em mL (neste caso, 0,4 mL)

#### 4.4 Avaliação da citotoxicidade

O método utilizado foi o ensaio colorimétrico com sal de tetrazólio (MTT), conforme proposto por Mosmann (1983), modificado por Sieuwerts et al. (1995), e padronizado no Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC por Freitas (2001).

**Procedimento:** Uma suspensão de células VERO ou GMK AH1, contendo aproximadamente  $2,5 \times 10^4$  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 24 h, a 37°C, em estufa de CO<sub>2</sub> até a confluência. Após 24 h, 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 72 h (VERO) ou 48 h (GMK AH1), e após este tempo, o meio de cada

cavidade foi substituído por 50 µL de uma solução de MTT<sup>3</sup> a 1 mg/mL (em meio MEM). A placa com MTT foi incubada por mais 4 h, nas mesmas condições. Após, foi retirado o meio contendo MTT e adicionados 100 µL de DMSO (Nuclear)/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 (Labsystems Multiskan MS 352, Haverhill, MA USA) a 540 nm.

Os valores de absorbância, medidos para cada concentração de cada amostra, foram transformados em porcentagens de viabilidade celular (X %), em relação à média dos controles celulares, que é considerada 100% viável, através da seguinte fórmula, onde DO= Densidade Óptica:

$$X \% = \frac{DO_{\text{material-teste}} \times 100}{DO_{\text{controle celular}}}$$

Em seguida, os percentuais calculados referentes às diferentes concentrações das amostras, foram inseridos em um gráfico, e através de análise de regressão linear, foi possível calcular a 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.

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

### 4.5.1 Ensaio de inibição da formação das placas de lise

Esta avaliação foi realizada pelo ensaio de placas de lise conforme descrito por Burleson et al. (1992) e seguiu o

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

procedimento proposto por De Logu et al. (2000), com pequenas modificações.

Através deste ensaio, foi realizada inicialmente a triagem anti-herpética (HSV-1 cepa KOS) de cardenólídeos e derivados, e o controle positivo aciclovir (ACV - Sigma). Além disso, para cada ensaio foram realizados controles virais, nos quais as células foram infectadas e não tratadas, e controles celulares, onde as células não foram infectadas nem tratadas.

Nesta primeira triagem, os compostos 1 a 28 foram testados até as maiores concentrações que não mostravam ser citotóxicas, e os outros compostos foram todos testados até 1  $\mu$ M.

Num segundo momento, após selecionar os 21 compostos mais ativos, este mesmo ensaio foi utilizado com as demais cepas virais (HSV-1 cepa 29R e HSV-2 cepa 333).

**Procedimento:** Células VERO ou GMK AH1 foram cultivadas em placas de 24 cavidades ( $2,5 \times 10^5$  /cavidade/0,75mL) e incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> até a confluência (24 h). Após 24 h, 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 1 h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. 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 esta mesma solução contendo as amostras em diferentes concentrações ou aciclovir (10  $\mu$ M - controle positivo) por 72 h para HSV-1 ou 48 h para HSV-2, a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Por fim, o meio foi aspirado, as células foram coradas com 200  $\mu$ L 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, em relação a cada cepa viral utilizada, através da seguinte fórmula:

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

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

#### 4.6 Ensaio de redução do número de partículas virais infecciosas (*Yield Reduction Assay*)

Para a realização de um ensaio que compara a atividade anti-herpética de várias amostras, faz-se necessário que isto seja efetuado em diferentes MOIs (*Multiplicity of Infection*), ou seja, na presença de diferentes concentrações virais e, assim, é possível determinar a potência da atividade antiviral dos compostos que estão sendo avaliados. O MOI é a relação entre o número de partículas virais infecciosas e o número de células que serão infectadas (CONDIT, 2007).

Este ensaio foi realizado conforme proposto por Hussein et al. (2008), com algumas modificações.

**Procedimento:** Iniciou-se o cultivo de monocamadas confluentes de células VERO ou GMK AH1 em placas de 24 cavidades ( $2,5 \times 10^5$  células/ cavidade/0,75 mL) até a confluência (24h). Estas células foram infectadas com HSV-1 ou HSV-2 em três diferentes MOIs (0,4; 0,04 e 0,004) e incubadas por 60 min a 37°C e 5% de  $CO_2$ . Após este período, o meio com os vírus que ainda não tinham penetrado, foi aspirado e as células lavadas com PBS para a remoção dos vírus residuais. Foi adicionado meio MEM contendo diferentes concentrações dos materiais-

teste e do aciclovir (controle positivo), e a placa foi novamente incubada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 48 h (HSV-2) ou 72 h (HSV-1). Foram feitos controles virais para cada MOI. Decorrido este tempo, os sobrenadantes foram coletados (500 µL) e colocados em microtubos de microcentrifuga com capacidade para 1,5 mL, armazenados a -80°C e congelados/descongelados por 3x. Após os três ciclos de congelamento/descongelamento, as suspensões foram centrifugadas por 8 min a 350 Xg em centrifuga refrigerada a 4°C para separar os restos celulares dos vírus. As suspensões virais foram transferidas para novos microtubos, que foram armazenados a -80°C até sua utilização. A quantidade de partículas virais infecciosas foi determinada por titulação (item 4.3.3) e o potencial antiviral das amostras foi avaliado, comparando-se o título do controle viral de cada MOI (sem inibição) com as amostras tratadas.

#### **4.7 Avaliação do mecanismo da ação anti-herpética dos cardenólídeos selecionados**

Baseando-se nos resultados obtidos na triagem anti-herpética, foram escolhidos dois cardenólídeos (compostos 4 e 12), pois eles apresentaram resultados promissores. Os motivos da escolha destas duas amostras serão apresentados no item 5 de “Resultados e Discussão”.

##### **4.7.1 Avaliação da ação virucida direta**

O ensaio foi realizado conforme proposto por Ekblad et al. (2006), com algumas modificações.

**Procedimento:** As misturas de 50 µL das diferentes concentrações dos compostos e 50 µL de  $4 \times 10^4$  UFP/0,05 mL dos diferentes vírus, 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 MEM gelado com 1% de PSA. Placas de 24 cavidades, contendo uma monocamada celular confluyente (24 h) de células VERO (para HSV-1) ou GMK AH1 (para HSV-2) foram lavadas 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 celulares lavadas com PBS e recobertas com 500 µL da solução de CMC. As placas foram incubadas a 37°C durante 72 h para o HSV-1 e 48 h para o HSV-2. 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) em % 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.

#### 4.7.2 Avaliação do efeito do tempo de adição e remoção das amostras no ciclo de replicação viral

A atividade antiviral das amostras foi avaliada em vários períodos de tempo, de acordo com a técnica descrita por Carlucci et al. (1999) e Su et al. (2008), com algumas modificações. Como controle, foi empregado o aciclovir.

**Procedimento:** Células VERO ou GMK AH1 foram cultivadas em placas de 24 cavidades (2,5 x 10<sup>5</sup> /cavidade/0,75 mL) até confluência (24h), e diferentes tratamentos de adição ou remoção dos compostos foram executados.

No processo de adição foram realizados:

- **Pré-tratamento (3 h antes da infecção viral):** as amostras, diluídas nas concentrações desejadas, foram adicionadas às células, as quais foram incubadas por 3 h, 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) ou HSV-2 (cepa 333) foram adicionadas às células. As placas foram incubadas por 1 h para possibilitar a adsorção viral. Após este tempo, o meio com o inóculo viral foi aspirado, as células lavadas com PBS e adicionados 500 µL de CMC. Por fim, as placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, por 72 ou 48 h para o HSV-1 ou HSV-2, respectivamente, e após esse período, as placas foram tratadas conforme procedimento descrito no item 4.5.1.

- **Tratamento simultâneo – tempo zero (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 ou do HSV-2. As placas foram incubadas por 1 h, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, o meio foi aspirado, as células lavadas com PBS, e 500 µL de CMC foram adicionados. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, por 72 ou 48 h para o HSV-1 ou HSV-2 respectivamente, e, após esse período, as mesmas foram tratadas conforme procedimento descrito no item 4.5.1.

- **Tratamento pós-infecção (P.I.):** as células foram infectadas com 400 µL das suspensões virais contendo 100 UFP/0,4 mL do HSV-1 ou do HSV-2. Após 1 h de adsorção, foram lavadas com PBS e receberam apenas uma solução de CMC, permanecendo incubadas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Nos tempos subsequentes de 3, 6, 9, 12, 18 e 24h P.I, 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 72 h (HSV-1) ou 48 h (HSV-2). Após esse período, as mesmas foram tratadas conforme procedimento descrito no item 4.5.1.

Em relação ao ensaio de remoção das amostras, este foi realizado nos tempos 3, 6, 9, 12, 18 e 24 h P.I. Estes horários foram escolhidos com o intuito de se verificar se os compostos mantinham suas capacidades de redução do número de placas de lise, mesmo após serem removidos. Portanto, este experimento foi realizado da mesma forma descrita para o tratamento pós-infecção, o qual seguiu os seguintes passos: as monocamadas celulares foram infectadas com 400 µL das suspensões virais contendo 100 UFP/0,4 mL do HSV-1 ou do



HSV-2 e as placas foram incubadas por 1 h. Após este período, os vírus adsorvidos foram removidos, as células lavadas com PBS e adicionou-se 500 µL de CMC com os compostos nas concentrações desejadas. Após 3, 6, 9, 12, 18 ou 24 h P.I., o meio contendo os compostos foi retirado, as células lavadas com PBS e adicionou-se apenas a solução de CMC. As placas permaneceram em estufa de CO<sub>2</sub>, a 37°C até completar o período de 72 h (HSV-1) ou 48 h (HSV-2). Após esse período, as mesmas foram tratadas conforme procedimento descrito no item 4.5.1.

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

O ensaio foi conduzido conforme descrito por Cheng et al. (2004), com algumas modificações.

**Procedimento:** Células VERO ou GMK AH1 foram cultivadas em placas de 24 cavidades (2,5 x 10<sup>5</sup> / cavidade/0,75 mL) 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 (HSV-1 ou HSV-2) a 100 UFP e adicionadas (500 µL) às placas, as quais foram novamente incubadas a 4°C por 2 h. Foram feitos controles celulares, controles virais e controles positivos (sulfato de dextrana - Sigma). Após 2 h 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 a metodologia empregada, 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 liberem e sejam eliminados após aspiração e lavagem e, assim, este controle não apresentará 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 72 e 48 h para

---

<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.

o HSV-1 e HSV-2, respectivamente. O restante do método seguiu as orientações dispostas no item 4.5.1.

#### **4.7.4 Avaliação do efeito das amostras na penetração viral**

Este ensaio foi realizado como descrito previamente por Piret et al. (2002) e Su et al. (2008), com algumas modificações.

**Procedimento:** Células VERO ou GMK AH1 foram cultivadas em placas de 24 cavidades ( $2,5 \times 10^5$ /cavidade/0,75 mL) até a confluência (24h) e, após este período, foram resfriadas a 4°C por 30 min em geladeira, infectadas com HSV-1 ou HSV-2 (100 UFP) e incubadas por 2 h a 4°C. Decorrido este período, as células foram lavadas com 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 a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, durante 1 h. Posteriormente, o meio com as amostras foi aspirado e as células lavadas com tampão citrato (pH 3) 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.

#### **4.7.5 Avaliação do efeito do composto 4 na expressão gênica viral**

A avaliação da expressão gênica do HSV-1 (cepa KOS) foi conduzida através da técnica de RT-PCR e os iniciadores utilizados estão listados no Quadro 4.

**Quadro 4:** Iniciadores utilizados na avaliação do efeito das amostras na expressão gênica do HSV-1 (cepa KOS).

Fase do ciclo	Gene	Proteína	Iniciadores	Referência
<b>Imediata (<math>\alpha</math>)</b>	U <sub>L</sub> 54	ICP27	(F) 5'-TTT CTC CAG TGC TAC CTG AAG G-3' (R) 5'-TCA ACT CGC AGA CAC GAC TCG- 3'	Tal-Singer et al., (1997)
<b>Precoce (<math>\beta</math>)</b>	U <sub>L</sub> 52	U <sub>L</sub> 52	(F) 5'-CAT CGA AAC CCA CTT TCC CGA ACA-3' (R) 5'-GCT GTC GCA TTT GGC AA-3'	Su et al., (2008)
<b>Tardia (<math>\gamma</math>)</b>	U <sub>L</sub> 13	U <sub>L</sub> 13	(F) 5'-CGA TCG CCC GGG GGC AGT TT- 3' (R) 5'-ACG GGT TGG TGT GAC ACA GG-3'	Kleymann et al., (2002)
<b>Proteína constitutiva celular</b>	ACTB	$\beta$ -actina	(F) 5'-TCC TGT GGC ATC CAC GAA ACT- 3' (R) 5'-GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT-3'	Su et al., (2008)

**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 monocamadas celulares foram infectadas com uma suspensão viral do HSV-1 (cepa KOS) no MOI de 0,2, sendo que o processo de infecção viral e tratamento foram realizados de duas maneiras:

- Infecção e tratamento simultâneo: vírus e compostos foram adicionados ao mesmo tempo, permanecendo em contato com as células durante 1 h a 37°C;
- Tratamento pós-infecção: as células foram infectadas com o vírus por 1 h, a suspensão viral foi retirada e os compostos foram adicionados e incubou-se por 6 ou 12 h a 37°C.

O efeito do composto 4 (na  $CI_{50}$  de 0,13  $\mu$ M), do aciclovir (na concentração de 5  $\mu$ M, que inibe em torno de 50 a 60 % da replicação viral) e da furosemida (na concentração de 500  $\mu$ M, que é um fármaco depletor de potássio)<sup>5</sup> na expressão gênica viral foi avaliada através de diversas combinações destes compostos, além da utilização de meio de cultura suplementado com potássio. As justificativas destes tratamentos estão explicitadas no item 5.4.5 de “Resultados e Discussão”.

Após os tratamentos, as células foram lavadas 2X com PBS e a extração do material genético total foi realizada pela técnica do Brazol (LGC Biotecnologia), conforme recomendações do fabricante, utilizando-se 1 mL deste reagente por cavidade. Após a adição do Brazol, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente, por 5 min e, então, transferidas para microtubos estéreis e livres de RNAases. Nesses microtubos foram adicionados 300  $\mu$ L de clorofórmio, o qual foi homogeneizado com as amostras. As misturas foram incubadas à temperatura ambiente, por 15 min, e centrifugadas a 12.000 Xg, por 15 min a 4°C. As fases aquosas, onde se encontravam os RNAm, foram transferidas para outros microtubos e adicionou-se 500  $\mu$ L de álcool isopropílico. As amostras foram novamente homogeneizadas e incubadas por 10 min, à temperatura ambiente, para que ocorresse a precipitação do RNA. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas a 12.000 Xg, por 10 min a 4°C e os sobrenadantes foram removidos. Os precipitados receberam 1 mL de etanol 75% gelado (preparado em água DEPC - dietilpirocarbonato 0,1%, IDT ) e novamente centrifugadas a 7.500 Xg por 5 min, a 4°C. Após a centrifugação, o etanol foi descartado e o RNA seco por 5 min, à temperatura ambiente. Após esse período, o RNA foi ressuscitado em 20  $\mu$ L de água DEPC e as amostras armazenadas a -70°C para posterior quantificação e reação de transcrição reversa. A quantificação foi realizada a 260 nm através da utilização do aparelho Nanovue.

Após o doseamento do RNA, 1  $\mu$ g de cada amostra foi tratado com DNAase para degradar o DNA residual e evitar uma possível contaminação. O tratamento foi realizado segundo as especificações do fabricante do kit Desoxiribonuclease I (Dnase

---

<sup>5</sup> Agradecemos ao Laboratório de Produção de Padrões Secundários (LAPPS/Faculdade de Farmácia/UFRGS) pela doação deste fármaco.

I, *Invitrogen*, USA), o qual consistiu no tratamento das amostras com 1  $\mu$ L de desoxirribonuclease I e incubação por 15 min, à temperatura ambiente. Após este período, a DNAase I foi inativada pela adição de 1  $\mu$ L de EDTA (25 mM) e as amostras foram aquecidas por 10 min a 65°C. Após o tratamento, realizou-se a transcrição reversa e obtenção do cDNA.

A reação de RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) foi realizada com o auxílio do Kit Superscript™ III (*Invitrogen*) segundo especificações do fabricante. Primeiramente, o DNA complementar (cDNA) foi obtido a partir de uma concentração estabelecida de 800 ng do RNA purificado das amostras, em uma reação de volume final de 25  $\mu$ L. O RNA foi desnaturado em presença de 50 ng do Iniciador Randômico Oligo<sub>20</sub> (dT) e 10 mM de oligonucleotídeos (dNTPs), a 65°C, por 5 min, e resfriado por 1 min em gelo antes de ser adicionado à mistura da reação. Esta reação continha 200U de Transcriptase Reversa (SuperScript™ III), 40U de RNaseOUT™, em condições salinas adequada. A incubação foi feita a 50°C por 50 min, seguida de 85°C por 5 min em termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf) e resfriamento por 1 min em gelo. Após esse período, foi adicionada à reação 1U de RNase H, e incubou-se a 37°C por 20 min, a fim de degradar o RNA residual.

Para a reação de amplificação gênica (PCR), foram adicionados a um volume final de 25  $\mu$ L: 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Promega), 1  $\mu$ M de cada iniciador *sense* e *anti-sense* (descritos no Quadro 4), tampão da enzima (1X final), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 0,2 mM de dNTPs. Os pares de iniciadores, para cada gene alvo, foram adicionados em tubos de reação separados. Os tubos foram submetidos a um ciclo de desnaturação de 94°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 seg, hibridização de iniciadores a 55°C por 40 seg, extensão a 72°C por 40 seg e 1 ciclo de alongação a 72°C por 10 min.

Como controle positivo da amplificação foram utilizados 5  $\mu$ L de RNA purificado a partir da suspensão do HSV-1 (cepa KOS), e como controle negativo foi utilizado água DEPC no lugar do RNA.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1X (Tris 89 mM-ácido bórico 89 mM-EDTA 2 mM) tendo sido corados com

Gel Red 20X (Biotium), visualizados e fotodocumentados com sistema *Bio-Imaging Systems* da BioAmerica Inc.

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

A avaliação do efeito dos compostos 4 e 12 na expressão das proteínas virais do HSV-1 (cepa KOS), descritas no Quadro 5, foi conduzida através do ensaio de *Western blotting*, conforme descrito por Kuo et al. (2001), com algumas modificações.

**Quadro 5:** Proteínas expressas pelo HSV-1 (cepa KOS) analisadas por *Western blotting*.

Fase	Gene codificador	Proteína
α (imediate)	U <sub>L</sub> 54	ICP27
β (precoce)	U <sub>L</sub> 42	proteína acessória da DNA polimerase viral
γ (tardia)	U <sub>L</sub> 27 U <sub>S</sub> 6	gB gD

**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 de 0,2, por 1 h a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas 3X com 1 mL de PBS, e adicionou-se 2 mL das amostras nas concentrações desejadas, e 2 mL de meio MEM nos controles viral e celular. Foi feito um controle positivo com o aciclovir (15 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 e 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% (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. Em seguida, as membranas foram bloqueadas por 1 h com 5% de leite desnatado (Molico) em tampão de bloqueio [25 mM 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 1:5.000, Chemicon, Millipore); anticorpo monoclonal de camundongo contra U<sub>L</sub>42 (diluição 1:5.000, proteína de fase  $\beta$  do HSV-1, Chemicon, Millipore); anticorpo monoclonal de camundongo contra gD (diluição de 1:10.000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), e anticorpo monoclonal de camundongo contra gB [(diluição de 1:10.000) (Chemicon, Millipore), ambas proteínas de fase  $\gamma$  do HSV-1]. Após este período, as membranas foram lavadas 5X por 5 min (cada lavagem) no 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 esta 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 Caxias, RJ, Brasil) no processador de filmes SRX-101A (Konica Minolta Medical & Graphic, INC - China).

#### **4.7.7 Avaliação do efeito das amostras sobre a liberação viral**

Para determinar se os compostos 4 e 12 inibiam a liberação dos vírus a partir das células, foi realizada a titulação dos vírus intracelulares e extracelulares, na presença e ausência destas amostras, segundo metodologia proposta por Su e colaboradores (2008).

**Procedimento:** As monocamadas de células VERO ou GMK AH1, já confluentes (placas de 24 cavidades), foram infectadas (MOI 0,4) e incubadas por 60 min, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, as placas foram lavadas com PBS para a remoção das partículas virais residuais. Os compostos foram adicionados nas concentrações desejadas e as placas foram incubadas por 24 h a 37°C. Foi feito um controle positivo com a digitoxina, que é um cardenolídeo que apresenta a capacidade de inibir a liberação de vírus herpéticos, como relatado por Su et al. (2008). Passado este tempo, o meio de cultura de todas as cavidades (sobrenadantes) foi coletado e armazenado a -80°C. A monocamada celular ainda presente na placa, foi lavada 1X com PBS, adicionada de meio MEM com 1% de PSA e congelada/descongelada 3X para provocar a liberação dos vírus intracelulares, sendo que o precipitado celular foi coletado e armazenado a -80°C. Tanto os sobrenadantes quanto os precipitados foram centrifugados a 350 Xg, por 8 min a 4°C e, então, titulados através do método de contagem das placas de lise (item 4.5.1).

A porcentagem de liberação viral foi calculada através da seguinte fórmula, proposta por Su et al. (2008):



$$\% \text{ liberação viral: } \frac{\text{Te}}{(\text{Te} + \text{Ti})} \times 100$$

Onde: Ti = título viral intracelular e Te = título viral extracelular.

#### 4.7.8 Avaliação do efeito das amostras na propagação intercelular viral

Foram utilizadas as mesmas placas de 24 cavidades obtidas no experimento descrito no item 4.5.1, quando foi demonstrada a atividade anti-herpética (HSV-1 cepa KOS e 29R e HSV-2 cepa 333) dos compostos 4 e 12. O procedimento de leitura seguiu as orientações propostas por Nyberg et al. (2004) e Kratz et al. (2008).

**Procedimento:** Imagens de 20 placas de lise de cada concentração dos compostos foram capturadas usando-se uma câmera digital colorida refrigerada de 3,3 megapixels, acoplada ao microscópio de luz Olympus BX41. O programa utilizado para a captura das imagens foi o Q-capture PRO 5.1 da Q-imaging. As áreas médias das placas de lise de cada concentração dos dois compostos foram determinadas através do programa Image J versão 1.43u, expressas como média  $\pm$  desvio padrão e comparadas com a área dos controles virais.

#### 4.8 Avaliação da potencial atividade anti-ATPásica das amostras

Os compostos 4 e 12 foram testados quanto à sua capacidade de inibir a enzima NKATPase. Para tal, foi utilizado o kit Quantichrom ATPase/GTPase (Bioassay, Hayward, CA, USA), segundo informações do fabricante.

**Procedimento:** De acordo com a metodologia descrita por Hu e colaboradores (2009), os compostos, em diferentes

concentrações, foram adicionados às cavidades de uma placa de 96 cavidades, juntamente com volumes iguais da enzima ATPase (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), por 15 min, à temperatura ambiente. Subsequentemente, o ATP (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) foi adicionado às cavidades e a placa foi incubada por 30 min. Também foram feitos controles positivos com cardenólídeos inibidores desta enzima (digitoxina e digoxina) e controles negativos (sem os inibidores). Finalmente, o reagente do kit (corante verde malaquita) foi adicionado às cavidades e a placa foi incubada novamente por 30 min. Após este período, foi realizada a leitura das absorbâncias a 620 nm (Espectrofotômetro Infinite M200 - Tekan) e a atividade anti-ATPásica foi determinada através da comparação das porcentagens das absorbâncias dos controles positivo e negativo, em relação às absorbâncias das amostras.

#### **4.9 Delineamento experimental e análise estatística**

Nos experimentos, foram utilizados delineamentos de blocos completamente casualizados (BCC) e um arranjo fatorial dos tratamentos, onde cada cavidade constituiu uma unidade experimental e os tratamentos foram as diferentes concentrações das amostras. Os tratamentos e os controles foram distribuídos aleatoriamente entre as cavidades e as repetições foram feitas em placas e momentos diferentes, garantindo a casualização. Cada placa correspondeu a um bloco, permitindo 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 placa, se estaria fazendo uma duplicata ou triplicata. Estatisticamente, esse procedimento é considerado 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).

Os valores de  $CC_{50}$  e  $CI_{50}$  foram estimados através de curvas concentração-resposta por análise de regressão linear. Os experimentos foram realizados em triplicata ou duplicata e os

resultados expressos através da média de experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão.

As diferenças estatisticamente significativas ou não dos tratamentos, com relação aos controles virais, foram realizadas através do teste ANOVA/Dunnnett e para separação de médias foi empregado o teste ANOVA/Tukey, utilizando o programa GraphPad Prism (Graph Pad Software Inc., Versão 5.01, 2007).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Determinação dos títulos infecciosos virais

Os títulos infecciosos das suspensões-estoques virais constam no Quadro 6. Devido ao uso constante de algumas das suspensões virais, elas foram produzidas e tituladas duas vezes durante o desenvolvimento desta Dissertação.

**Quadro 6:** Títulos infecciosos dos estoques virais utilizados.

Vírus	Suspensão estoque viral	Título (UFP/mL)
HSV-1 (cepa KOS)	1	$9,8 \times 10^5$
	2	$7,8 \times 10^7$
HSV-1 (cepa 29R)	1	$6,6 \times 10^6$
HSV-2 (cepa 333)	1	$1,6 \times 10^5$
	2	$7,3 \times 10^5$

### 5.2 Avaliação da potencial atividade antiviral

#### 5.2.1 Avaliação da citotoxicidade

Antes de se realizar a avaliação anti-herpética das amostras, é indispensável que se avalie sua toxicidade em relação às células utilizadas e permissivas aos vírus em estudo. Esta avaliação permitiu a determinação dos valores de  $CC_{50}$  (concentração tóxica para 50% das células) dos cardenolídeos e derivados testados. A  $CC_{50}$  foi a concentração inicial a ser usada na avaliação antiviral subsequente. Portanto, este parâmetro de citotoxicidade oferece uma maior segurança na utilização das amostras frente às células, garantindo que a atividade antiviral seja determinada sem interferência da citotoxicidade.

A citotoxicidade é considerada, primariamente, como a capacidade de um composto em induzir injúria ou morte celular (EISENBRAND et al., 2002).

No processo de P&D de um novo fármaco é necessário que o mesmo apresente algumas características, dentre elas uma citotoxicidade mínima, já que um composto atóxico é praticamente impossível de ser obtido. A avaliação da toxicidade não tem o intuito de prever a extensão e a natureza de todos os possíveis efeitos tóxicos que poderão acontecer *in vivo*, mas estimá-los. Logo, a avaliação do potencial citotóxico *in vitro* de um possível agente terapêutico pode apenas prever sua toxicidade *in vivo* (EVANSA et al., 2001).

Os testes de citotoxicidade *in vitro* são úteis e necessários para definir a citotoxicidade basal, ou seja, a habilidade intrínseca de um composto em causar alterações e morte celular, como consequência de danos das funções celulares básicas. Esses testes são necessários para definir o limite de concentração utilizado para testes *in vitro* realizados posteriormente à avaliação da citotoxicidade (EISENBRAND et al., 2002).

Além disso, a avaliação da toxicidade deve ser realizada o mais cedo possível durante o processo de P&D de um novo fármaco, pois 30% dos candidatos falham devido aos seus efeitos tóxicos (KAOLA; LANDIS, 2004).

O fármaco antiviral ideal é aquele que inibe somente a(s) etapa(s) do ciclo de replicação viral, sem interferir no metabolismo da célula hospedeira, possibilitando que essa se recupere da infecção e mantenha sua atividade metabólica normal (VANDEN BERGHE; VLIETINCK; VAN HOOFF, 1986). Na P&D de novos fármacos antivirais, deve-se considerar seus efeitos tóxicos sobre as células hospedeiras, pois se os mesmos forem excessivamente tóxicos, a sua utilização se torna inviável, mesmo se eles apresentarem ação antiviral significativa, já que algumas substâncias podem exibir tal atividade em virtude dos seus efeitos citotóxicos (VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGHE, 1997).

Portanto, neste trabalho as amostras foram primeiramente testadas quanto à sua potencial capacidade citotóxica frente às células VERO e GMK AH1, e assim, os valores de  $CC_{50}$  de alguns dos cardenólídeos e derivados foram determinados, através da utilização do ensaio colorimétrico do MTT. Este ensaio não foi realizado com todas as amostras devido à estratégia de seleção utilizada, a qual selecionou somente aquelas com os melhores resultados antivirais, e a

mesma será explicada no próximo item. Estes resultados estão compilados na Tabela 1.

Como já dito anteriormente, os cardenolídeos apresentam a capacidade de inibir a bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  presente na superfície celular, a qual é responsável pelo estabelecimento e manutenção de um gradiente eletroquímico, que é essencial para diversos processos fisiológicos, entre eles a multiplicação celular.

O ciclo celular é um processo em que uma célula somática duplica seu material genético e o divide igualmente às células-filhas. Esse processo é didaticamente dividido em duas fases: interfase e mitose. Na interfase ocorre a duplicação do DNA e a preparação para a fase seguinte, a mitose, na qual ocorre a divisão celular propriamente dita, finalidade maior do ciclo celular (GUYTON; HALL, 2006).

A interfase é dividida em quatro fases: G0, G1, S e G2. Na fase G0, as células estão em repouso, ou seja, nesta fase não ocorrem eventos que as preparem para a divisão. A fase G1 é conhecida como a fase de crescimento, onde ocorre a síntese intensa de várias moléculas importantes para a sobrevivência celular, tais como proteínas estruturais, enzimas e RNA. Na fase S, ocorre a duplicação do material genético. A fase G2 é chamada de fase de preparação, pois nela ocorre a síntese de moléculas e organelas relacionadas ao processo de divisão celular, preparando a célula para entrar no processo mitótico (divisão) (GUYTON; HALL, 2006; SMITH; MARTIN, 1973).

Diversos autores têm relatado que a inibição dos canais de  $\text{K}^+$ , sensíveis ao ATP, tem como consequência a retenção das células na fase G0/G1, ou seja, a despolarização da membrana inibiria a progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S, sugerindo que a hiperpolarização é requerida para o início da fase S (BLACKISTON; MCLAUGHLIN; LEVIN, 2009; ORR; YOSHIKAWA-FUKADA; EBERT, 1972; WILSON; CHIU, 1993). Entretanto, alguns estudos revelaram que esta retenção das células na fase G0/G1, ocasionada pela inibição dos canais iônicos, é um efeito reversível (CHANDY et al., 1984; CHIU; WILSON, 1989; PRICE; LEE; DEUTSCH, 1989).

Durante os experimentos de avaliação da citotoxicidade dos cardenolídeos frente às células VERO pelo método do MTT, foi visto que estes compostos, mesmo nas menores concentrações testadas (inferiores aos valores de  $\text{CI}_{50}$

determinados posteriormente), acarretavam uma redução da taxa do metabolismo das células não infectadas, ou seja, ocorria uma redução da capacidade de multiplicação celular. Esta redução poderia ser justificada pela retenção das células na fase G0/G1, devido à possível inibição da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , ocasionada pelos cardenólídeos em estudo, como comprovado posteriormente neste trabalho. Portanto, os valores de  $\text{CI}_{50}$ , obtidos durante a avaliação da atividade antiviral destes compostos, apresentam a capacidade de redução da multiplicação celular.

Hartley e colaboradores (2006) investigaram a capacidade citotóxica da digoxina em relação a quatro linhagens celulares (VERO, MRC5, BHK21 e A459), através do ensaio com MTT, além de verificarem a atividade antiviral deste composto. Os autores obtiveram resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho, pois a digoxina, testada no seu valor de  $\text{CI}_{50}$ , apresentou uma redução da taxa do metabolismo celular das células não infectadas de 10 a 30%, sendo que esta redução também foi observada com os cardenólídeos em estudo (dados não mostrados).

O mesmo foi evidenciado em outro trabalho (TOMITA; KUWATA, 1978), no qual foi demonstrada a atividade antiviral da ouabaína frente ao vírus da leucemia murina, sendo que esse composto, no seu valor de  $\text{CI}_{50}$ , reduziu de 22 a 29 % a replicação das células  $\text{K}_3\text{b}$  (células de sarcoma de camundongo) e  $\text{JLS-V}_9$  (células da medula óssea de camundongo).

### **5.2.2 Triagem anti-herpética - ensaio de inibição da formação das placas de lise**

O ensaio de inibição da formação das placas de lise é o ensaio mais utilizado para se quantificar infecções virais. É uma metodologia relativamente simples e muito precisa. É baseada na capacidade de uma única partícula viral infecciosa, em contato com uma monocamada celular, causar a formação de uma área macroscópica de efeito citopático. Mais especificamente, se uma única 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 dá origem, após muitos ciclos

de replicação, a uma área de infecção, chamada de placa de lise (CONDIT, 2007).

Neste trabalho, o ensaio de inibição da formação das placas de lise (item 4.5.1) foi utilizado na maioria dos experimentos com a intenção de quantificar uma suspensão viral de concentração desconhecida e também com a finalidade de se avaliar a redução do número dessas placas quando da avaliação da atividade antiviral, tanto no processo de triagem quanto no de elucidação do mecanismo da ação anti-herpética. Para isso, foi utilizado um agente espessante (carboximetilcelulose - CMC) sobre a monocamada celular infectada 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. A visualização destas placas de lise pode ser feita através da coloração das células com um corante, neste caso, o preto de naftaleno, o que possibilitou 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) estão demonstrados na Tabela 1, juntamente com os resultados obtidos na avaliação da toxicidade em células VERO.



**Tabela 1:** Resultados da avaliação da citotoxicidade, em células VERO, e da atividade anti-HSV-1 (cepa KOS) dos cardenólídeos e derivados testados. (continua)

Composto	CC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (µM)	CI <sub>50</sub> <sup>b</sup> (µM)	IS <sup>c</sup>
1	139,90±5,23	3,04±0,07	46
2	6,60±0,28	0,14±0,00	47
3	10,05±2,33	0,12±0,01	84
4	273,95±46,46	0,13±0,01	2.107
5	65,10±0,99	1,37±0,06	47
6	5,67±0,22	0,34±0,06	17
7	10,55±0,49	0,36±0,01	29
8	19±0,28	0,54±0,00	35
9	>200,00	12,70±0,57	>16
10	148,50±6,79	0,83±0,01	179
11	>250,00	12,05±4,17	>21
12	174,25±24,68	0,27±0,01	645
13	>15,62	SA	-
14	27,10±0,85	1,27±0,07	21
15	22,15±0,21	0,94±0,05	23
16	34,70±3,39	SA	-
17	>250,00	SA	-
18	>31,25	3,72±0,01	8
19	>31,25	2,1±0,00	15
20	>65,00	SA	-
21	>62,50	SA	-
22	>250,00	SA	-
23	26,05±3,18	8,13±0,81	3
24	196,21±18,65	SA	-
25	225,13±5,76	SA	-
27	113,65±4,74	SA	-
26	209,75±4,88	SA	-
28	>250,00	3,5±0,49	>71
29	5,57±0,40	0,66±0,01	8
30	NR	SA	-
31	NR	SA	-
32	NR	SA	-
33	NR	SA	-
34	NR	SA	-
35	NR	SA	-
36	NR	SA	-
37	NR	SA	-
38	>250,00	0,33±0,03	>757
39	NR	SA	-
40	NR	SA	-

**Tabela 1:** Resultados da avaliação da citotoxicidade, em células VERO, e da atividade anti-HSV-1 (cepa KOS) dos cardenolídeos e derivados testados. (conclusão)

Composto	CC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (µM)	CI <sub>50</sub> <sup>b</sup> (µM)	IS <sup>c</sup>
41	27,60±7,92	0,39±0,03	71
42	115,70±12,59	0,83±0,16	139
43	NR	SA	-
44	NR	SA	-
45	NR	SA	-
46	NR	SA	-
47	NR	SA	-
48	NR	SA	-
49	NR	SA	-
50	NR	SA	-
51	NR	SA	-
52	NR	SA	-
53	NR	SA	-
55	NR	SA	-
56	NR	SA	-
57	NR	SA	-
58	NR	SA	-
59	>62,50	0,23±0,04	>272
60	>31,25	0,39±0,06	>80
61	NR	SA	-
62	NR	SA	-
63	NR	SA	-
64	88,50±10,69	0,12±0,02	737
65	132,30±8,14	0,14±0,02	945
66	201,90±11,46	0,02±0,00	10.095
67	>250,00	0,08±0,00	>3.289
68	>250,00	0,14±0,02	>1.786
ACV	>2000,00	3,45±0,42	>580

Valores representam a média de três ou mais experimentos independentes ± desvio padrão.

<sup>a</sup> CC<sub>50</sub> = concentração que reduziu em 50% a viabilidade das células VERO.

<sup>b</sup> CI<sub>50</sub> = concentração que inibiu 50% da replicação do HSV-1 (cepa KOS).

<sup>c</sup> IS = CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>.

NR = não realizado.

SA = sem atividade.

Como a primeira etapa da triagem anti-herpética foi realizada apenas com o HSV-1 (cepa KOS), foi necessário escolher as amostras com maior probabilidade de apresentar também atividade antiviral na segunda etapa de avaliação, frente

às outras cepas virais [HSV-1 (cepa 29R) e HSV-2 (cepa 333)]. Para esta seleção, utilizou-se o mesmo critério de Su e colaboradores (2008), que testaram inicialmente 960 compostos e depois focaram sua investigação em somente oito deles, a saber: valor de  $CI_{50}$  igual ou inferior a  $1 \mu\text{M}$ . Apesar do composto 28 ter apresentado um valor de  $CI_{50}$  de  $3,5 \mu\text{M}$ , decidiu-se que ele seria avaliado também nesta segunda etapa por ser uma aglicona, que é a mesma de muitos dos cardenólídeos e derivados testados, e também por sua atividade anti-herpética ter sido relatada pelos autores citados acima.

Com base neste critério, foram escolhidos, então, 21 compostos para a próxima etapa do estudo e, assim, foi determinada a atividade anti-herpética dos mesmos, frente às outras cepas virais (Tabela 2).

**Tabela 2:** Resultados da avaliação da atividade anti-herpética dos cardenolídeos e derivados selecionados.

Composto	CC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM)	HSV-1 (cepa KOS)		HSV-1 (cepa 29R)		CC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM)	HSV-2 (cepa 333)	
	VERO	CI <sub>50</sub> <sup>b</sup> (μM)	IS <sup>c</sup>	CI <sub>50</sub> <sup>b</sup> (μM)	IS <sup>c</sup>	GMK AH1	CI <sub>50</sub> <sup>b</sup> (μM)	IS <sup>c</sup>
<b>2</b>	6,60±0,28	0,14±0,00	47	0,11±0,012	60	>250,00	0,03±0,00	>8.333
<b>3</b>	10,05±2,33	0,12±0,01	84	0,10±0,01	100	>250,00	0,09±0,01	>2.777
<b>4</b>	273,95±46,46	0,13±0,01	2.107	0,06±0,01	4.566	>250,00	0,04±0,00	>6.250
<b>6</b>	5,67±0,22	0,34±0,06	17	0,32±0,02	18	>25,00	0,20±0,02	>125
<b>7</b>	10,55±0,49	0,36±0,01	29	0,34±0,01	31	>250,00	0,50±0,01	>500
<b>8</b>	19,00±0,28	0,54±0,00	35	0,39±0,04	49	>250,00	0,24±0,00	>1.042
<b>10</b>	148,50±6,79	0,83±0,01	179	0,60±0,01	247	>250,00	0,45±0,02	>555
<b>12</b>	174,25±24,68	0,27±0,01	645	0,22±0,01	792	284,65±16,62	0,23±0,02	1.238
<b>15</b>	22,15±0,21	0,94±0,05	23	0,44±0,03	50	>250,00	0,54±0,00	>463
<b>28</b>	>250,00	3,50±0,49	>71	3,56±0,79	>70	>250,00	1,22±0,01	>205
<b>29</b>	5,57±0,40	0,66±0,01	8	0,18±0,01	31	>25,00	0,65±0,01	>38
<b>38</b>	>250,00	0,33±0,03	>757	0,50±0,03	>500	>250,00	0,34±0,04	>735
<b>41</b>	27,60±7,92	0,39±0,03	71	0,37±0,06	75	15,30±0,28	0,18±0,04	85
<b>42</b>	115,70±12,59	0,83±0,16	139	1,70±0,00	68	106,30±1,13	2,08±0,22	51
<b>59</b>	>62,50	0,23±0,04	>272	0,62±0,01	>101	>62,50	0,24±0,04	>260
<b>60</b>	>31,25	0,39±0,06	>80	0,32±0,06	>98	>31,25	0,22±0,01	>142
<b>64</b>	88,50±10,69	0,12±0,02	737	0,25±0,05	354	>250,00	0,05±0,02	>5.000
<b>65</b>	132,30±8,14	0,14±0,02	945	0,26±0,01	509	>250,00	0,09±0,01	>2.777
<b>66</b>	201,90±11,46	0,02±0,00	10.095	0,03±0,00	6.730	>250,00	0,02±0,00	>12.500
<b>67</b>	>250,00	0,08±0,00	>3.125	0,11±0,01	>2.273	>250,00	0,04±0,00	>6.250
<b>68</b>	>250,00	0,14±0,02	>1.786	0,13±0,01	>1.923	>250,00	0,11±0,01	>2.273
<b>ACV</b>	>2.000,00	3,45±0,42	>580	SA	SA	>2.000,00	8,60±1,96	>232

Valores representam a média de três ou mais experimentos independentes±desvio padrão.

<sup>a</sup> CC<sub>50</sub> = concentração que reduziu em 50% a viabilidade das células VERO ou GMK AH1.

<sup>b</sup> CI<sub>50</sub> = concentração que inibiu 50% da replicação viral. <sup>c</sup> IS = CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>; SA = sem atividade.

De posse dos resultados desta segunda etapa da avaliação dos 21 compostos, frente aos três tipos de vírus, necessitou-se escolher os que possuíam os maiores índices de seletividade para elucidar seu mecanismo de ação. Partindo-se da análise deste parâmetro, foi determinado que os próximos passos da pesquisa seriam realizados com os compostos 4 (IS = 2.107) e 12 (IS = 645), considerando-se também sua disponibilidade. Os compostos 38, 64, 65, 66, 67 e 68 também apresentaram elevados valores de IS; entretanto, a quantidade disponível destes compostos era insuficiente para a realização dos demais experimentos.

A atividade anti-herpética da digitoxigenina (1), digitoxina (6), digoxigenina (28) e digoxina (29) já havia sido relatada por Su e colaboradores (2008), e esses resultados foram confirmados durante a triagem anti-herpética realizada neste estudo.

Vale ressaltar que o HSV-1 29R (cepa resistente ao ACV) foi sensível ao tratamento com os cardenólídeos, o que pode sugerir que o mecanismo de ação destes compostos é diferente do mecanismo de ação do ACV.

Os resultados já presentes na literatura e os obtidos neste trabalho propiciaram a formulação de uma hipótese em relação ao mecanismo da ação antiviral detectada, pois a redução da capacidade de multiplicação celular, relatada anteriormente (item 5.2.1), está intimamente ligada à capacidade de inibição da bomba de NKATPase. Portanto, a atividade antiviral poderia estar sendo ocasionada pela alteração do equilíbrio iônico celular, visto que os HSV necessitam de uma concentração ideal de  $K^+$  para que seu DNA seja sintetizado (HARTLEY et al., 1993). A partir dessas constatações, a inibição específica da bomba NKATPase, causada pelos cardenólídeos, causaria também a inibição da replicação viral e o repouso celular, sendo o último um efeito reversível (CHANDY et al., 1984; CHIU; WILSON, 1989; HARTLEY et al., 2006; PRICE; LEE; DEUTSCH, 1989). Logo, os cardenólídeos e derivados poderiam atuar primeiramente sobre as células e, como consequência, sobre os vírus.

### **5.3 Ensaio de redução do número de partículas virais infecciosas (*Yield reduction assay*)**

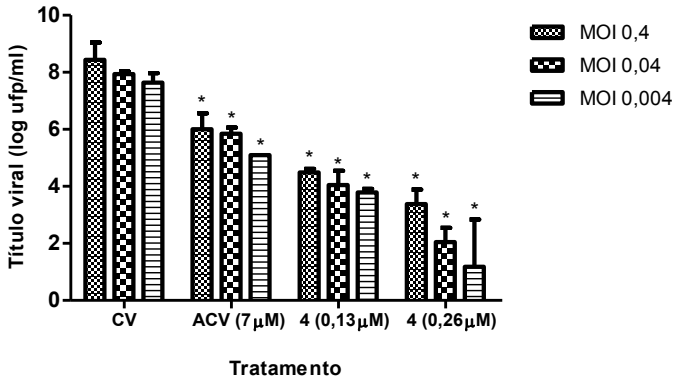
Para a realização deste ensaio, utilizaram-se os valores de  $CI_{50}$  (Tabela 2) de cada amostra frente às cepas virais, e também foram testados os valores de cada  $CI_{50} \times 2$ . O uso desta maior concentração é justificado pela intenção de se verificar a dependência da concentração *versus* atividade antiviral.

O aciclovir (ACV) foi utilizado como controle positivo, na concentração de 7  $\mu\text{M}$ , a qual inibe a replicação do HSV-1 (cepa KOS) em torno de 85%. Na infecção pelo HSV-2 (cepa 333), foi utilizado 20  $\mu\text{M}$  de ACV, e na infecção pelo HSV-1 (cepa 29R) usou-se uma concentração extremamente elevada (100  $\mu\text{M}$ ), tendo em vista que essa cepa é resistente ao ACV.

#### **5.3.1 Resultados obtidos com o composto 4**

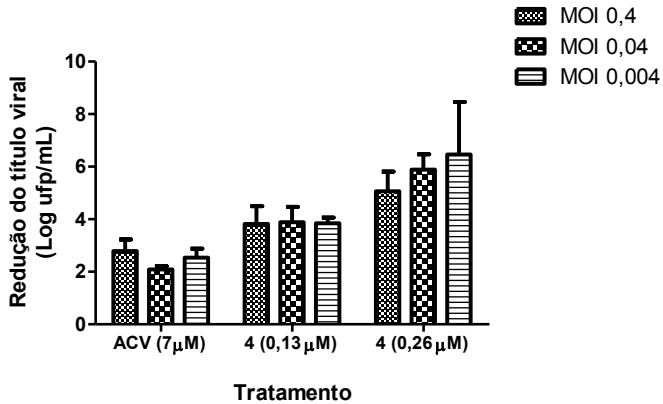
##### **5.3.1.1 Frente ao HSV-1 (cepa KOS)**

A análise dos resultados demonstrados na Figura 3, que representam os títulos virais ( $\log \text{ufp/mL}$ ), após os diferentes tratamentos, e na presença de diferentes concentrações virais, permitiu concluir que o composto 4 apresentou um perfil concentração-dependente. Além disso, os tratamentos, nos diferentes MOIs, apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), quando comparados aos respectivos controles virais, indicando que as amostras foram capazes de inibir a replicação viral, mesmo na presença do maior valor de MOI utilizado.



**Figura 3:** Resultados da avaliação da atividade anti-HSV-1 (cepa KOS) do composto 4 e do aciclovir, frente a três diferentes MOIs. Os resultados representam a média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. (\*) indica  $p < 0,05$ , teste ANOVA/Dunnett em relação a cada tratamento e cada MOI e seu respectivo controle viral, sem tratamento.

A Figura 4 apresenta, de outra forma, os valores reais de redução dos títulos virais (log ufp/mL), ocasionados pelo tratamento com as diferentes amostras. Estes valores foram obtidos através de uma subtração [média do título viral sem tratamento (CV) – média do título viral da amostra (tratada)].



**Figura 4:** Efeito do aciclovir e do composto 4 na redução do título do HSV-1 (cepa KOS), frente a três diferentes MOIs. Os resultados representam a média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão.

A redução do título viral pelo aciclovir se manteve praticamente constante nos três MOIs testados, ou seja, este fármaco inibiu na mesma intensidade as três diferentes concentrações virais. Esta inibição significa uma redução média do título viral de aproximadamente 2,5 log UFP/mL, o que representa uma inibição  $> 99\%$  em relação à média dos controles virais.

Em relação ao composto 4, a redução do título viral, obtida na menor concentração testada (0,13  $\mu$ M), também se manteve praticamente constante nos três diferentes MOIs. Esta inibição indica que a concentração de 0,13  $\mu$ M reduz o título viral em torno de 3,8 log UFP/mL, o que representa  $\sim 99,99\%$  em relação à média dos controles virais.

O composto 4, na concentração de 0,26  $\mu$ M, não apresentou esta constância, ocorrendo diferenças na inibição viral, nos diferentes MOIs testados, ou seja, a capacidade de inibição viral foi reduzida com o aumento da concentração viral. Entretanto, mesmo com tal redução, a maior concentração deste composto ainda apresentou uma média de redução do título viral de 5,1 log UFP/mL no MOI mais elevado (0,4), valor que equivale a uma inibição  $> 99,999\%$  das partículas virais infecciosas. Na

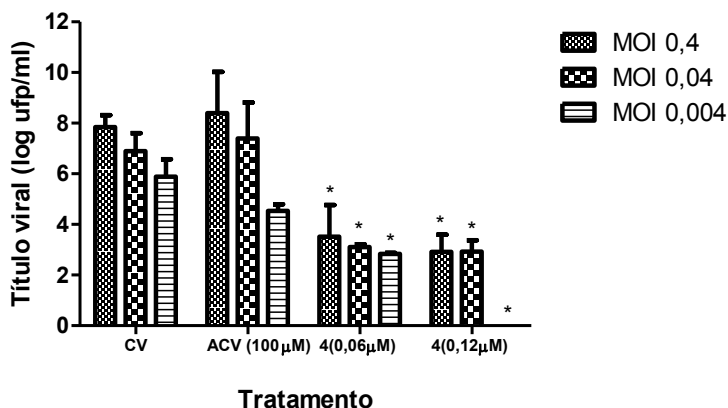


presença da concentração viral intermediária (MOI 0,04), o cardenólídeo apresentou uma média de redução de 5,9 log ufp/mL, equivalendo a praticamente 100% de inibição viral. Por fim, o menor MOI (0,004) apresentou 6,5 log UFP/mL de redução, significando também 100% de inibição da replicação viral.

Com estes resultados, conclui-se que o composto 4 e o ACV mantiveram seu potencial antiviral, mesmo no maior MOI testado, o qual, representa um número 1000X maior de partículas virais do que no menor MOI (0,0004) testado (usado para a determinação dos valores de  $CI_{50}$  no processo de triagem). Entretanto, o composto 4, em ambas as concentrações testadas, apresentou maior capacidade de inibição viral, quando comparada à do ACV.

### **5.3.1.2 Frente ao HSV-1 (cepa 29R)**

A análise da Figura 5 revelou que o composto 4, frente ao HSV-1 (cepa 29R), apresentou um perfil concentração-dependente, mas menos intenso do que o obtido na presença do HSV-1 (cepa KOS).



**Figura 5:** Resultados da avaliação da atividade anti-HSV-1 (cepa 29R) do composto 4 e do aciclovir, frente a três diferentes MOIs. Os resultados representam a média de dois experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. (\*) indica  $p < 0,05$ , teste ANOVA/Dunnett em relação a cada tratamento e cada MOI e seu respectivo controle viral, sem tratamento.

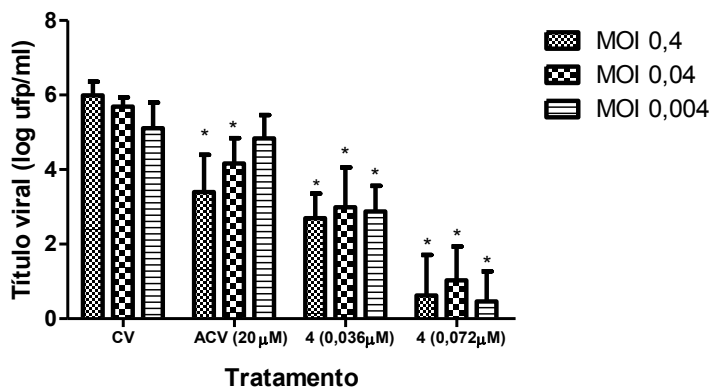
Entretanto, ocorreu uma redução brusca do título viral na maior concentração testada (0,12  $\mu$ M) frente ao MOI 0,004, inibindo 100% das partículas virais infecciosas, o que equivale a uma redução de 5,9 log UFP/mL, em comparação à média do título do controle viral. Porém, a análise visual da monocamada celular infectada com o MOI 0,004 e tratada com esta concentração do composto 4, revelou a presença de efeito citopático característico da infecção herpética, sugerindo que o composto 4 estaria inibindo a liberação viral e, por isso, não existiam vírus extracelulares, apenas intracelulares, os quais não foram quantificados neste ensaio.

O aciclovir (ACV), frente ao HSV-1 (cepa 29R) (Figura 5), não inibiu a replicação deste vírus, nos três MOIs testados, já que os tratamentos com este fármaco não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (teste de Dunnett -  $p < 0,05$ ), quando comparados aos seus respectivos controles virais, comprovando a resistência desta cepa viral ao aciclovir e sua sensibilidade frente ao composto 4.

A análise da redução dos títulos do HSV-1 (cepa 29R), no maior MOI testado (0,4) e com o tratamento na menor concentração do composto 4 (0,06  $\mu$ M), mostrou que ocorreu mais do que 99,99% de inibição da replicação herpética (redução de 4,3 log UFP/mL).

### 5.3.1.3 Frente ao HSV-2 (cepa 333)

Quando este experimento foi realizado frente ao HSV-2 (cepa 333) (Figura 6), os resultados obtidos não mantiveram o padrão que havia sido mostrado com as outras cepas virais testadas (Figuras 3 e 5), ou seja, não ocorreu maior redução do título viral, em relação à diminuição do MOI e ao aumento da concentração das amostras.



**Figura 6:** Resultados da avaliação da atividade anti-HSV-2 (cepa 333) do composto 4 e do aciclovir, frente a três diferentes MOIs. Os resultados representam a média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. (\*) indica  $p < 0,05$ , teste ANOVA/Dunnett em relação a cada tratamento e cada MOI, e, seu respectivo controle viral, sem tratamento.

Como mostrado na Figura 6, o composto 4 apresentou diferenças estatísticas significativas em relação ao controle viral, em todos os MOIs e nas diferentes concentrações testadas, o que não aconteceu com o aciclovir. A baixa redução do título viral

ocasionada pelo aciclovir pode ser justificada pelo possível aumento da resistência desta cepa ao fármaco, pois quando se confirmou o valor de  $CI_{50}$  deste fármaco frente ao HSV-2 (cepa 333), os resultados demonstraram que este valor havia aumentado substancialmente de 8,6  $\mu$ M para 24,5  $\mu$ M.

Esta diminuição da sensibilidade do HSV-2 frente ao aciclovir talvez possa ser explicada pelo longo tempo de uso desta mesma cepa no laboratório, o que pode levar a mutações no material genético viral, as quais podem ter o tornado mais resistente ao fármaco. Quando o ácido nucleico viral é replicado, erros na sua transcrição são muito mais comuns que a possibilidade disto acontecer com o sistema da célula hospedeira, pois diferentemente das polimerases celulares, o complexo de replicação viral raramente possui a capacidade de editar as falhas cometidas durante a replicação do material genético viral. Consequentemente, a sequência gênica viral pode acumular mudanças que resultarão na produção de proteínas com variações nas suas sequências de aminoácidos e a contínua replicação destes vírus poderá levar ao surgimento de novos vírus resistentes aos fármacos utilizados (CHALLAND; YOUNG, 1998).

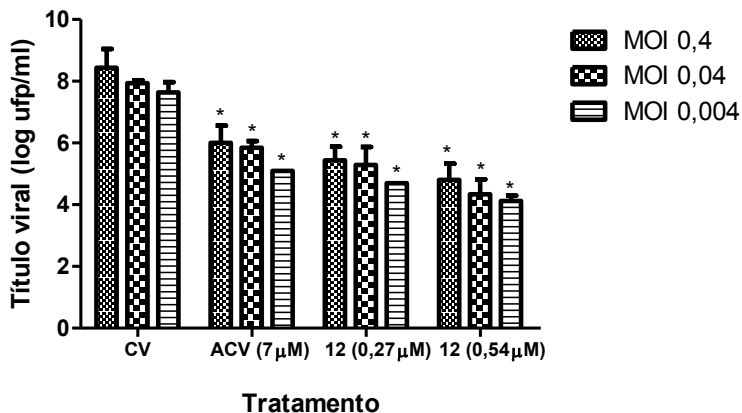
A análise da redução dos títulos do HSV-2 (cepa 333), no maior MOI testado (0,4) e na menor concentração do composto 4 (0,036  $\mu$ M), mostrou que ocorreu mais do que 99,9% de inibição da replicação herpética (redução de 3,3 log UFP/mL). O tratamento com o ACV (20  $\mu$ M) acarretou um % de redução do título viral > 99%, demonstrando que esta cepa foi mais sensível ao tratamento com o composto 4.

### **5.3.2 Resultados obtidos com o composto 12**

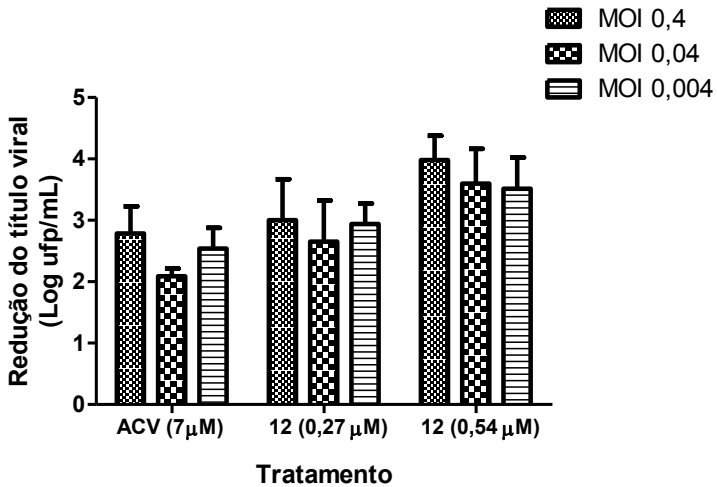
#### **5.3.2.1 Frente ao HSV-1 (cepa KOS)**

As Figuras 7 e 8 apresentam os resultados obtidos com o composto 12, frente aos três diferentes MOIs do HSV-1 (cepa KOS), e revelaram visivelmente que ele é menos potente que o composto 4, pois sua média de redução do título viral, na maior concentração testada, independentemente do valor do MOI, foi de 3,7 log UFP/mL (*versus* 5,8 log UFP/mL quando o tratamento foi feito com o composto 4 na maior concentração e independente do MOI). Entretanto, todos os tratamentos, nos

diferentes MOIs, apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), quando comparados aos respectivos controles virais, indicando, assim que o composto 12 também foi capaz de inibir a replicação viral, apesar de ser numa intensidade menor que a do composto 4.



**Figura 7:** Resultados da avaliação da atividade anti-HSV-1 (cepa KOS) do composto 12 e do aciclovir, frente a três diferentes MOIs. Os resultados representam a média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. (\*) indica  $p < 0,05$ , teste ANOVA/Dunnnett em relação a cada tratamento e cada MOI e seu respectivo controle viral, sem tratamento.



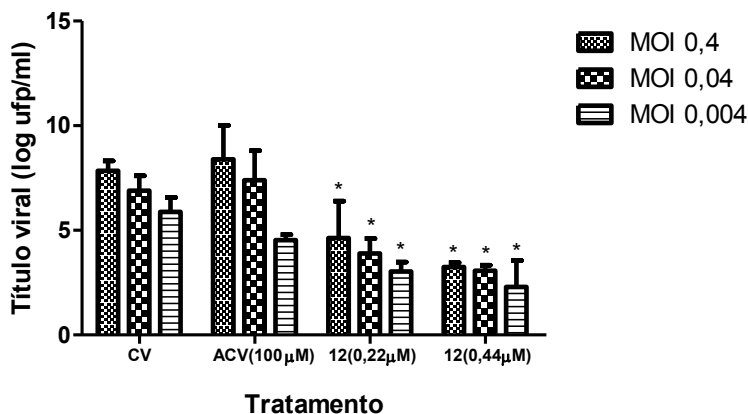
**Figura 8:** Efeito do aciclovir e do composto 12, na redução do título do HSV-1 (cepa KOS), frente a três diferentes MOIs. Os resultados representam a média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão.

A análise dos resultados da redução do título viral (log UFP/mL) obtidos com o composto 12 (Figura 8) revelou que ambas as concentrações testadas (0,27 e 0,54  $\mu$ M) apresentaram praticamente a mesma capacidade inibitória da replicação viral, nos diferentes MOIs. A menor concentração provocou uma redução média do título viral de 2,8 log UFP/mL equivalendo a ~99,9% de inibição do número de partículas virais. Já a maior concentração reduziu o título viral em torno de 3,7 log UFP/mL, o que representa uma inibição de ~99,99% das partículas virais infecciosas.

Desta forma, pode-se concluir que, o composto 12, assim como o composto 4, apresentou melhor atividade antiviral que a do aciclovir, na presença dos três MOIs, pois este fármaco apresentou uma redução média do título viral de 2,5 log UFP/mL, equivalendo a uma inibição maior que 99%, mas inferior a 99,9%.

### 5.3.2.2 Frente ao HSV-1 (cepa 29R)

A capacidade inibitória do composto 12 frente ao HSV-1 (cepa 29R) (Figura 9), também apresentou um perfil concentração-dependente, e os tratamentos, nos diferentes MOIs, apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), quando comparados aos respectivos controles virais.



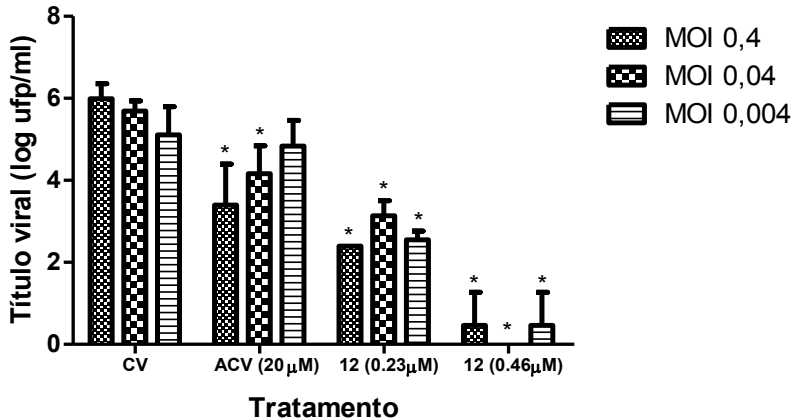
**Figura 9:** Resultados da avaliação da atividade anti-HSV-1 (cepa 29R) do composto 12 e do aciclovir, frente a três diferentes MOIs. Os resultados representam a média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. (\*) indica  $p < 0,05$ , teste ANOVA/Dunnett em relação a cada tratamento e cada MOI e seu respectivo controle viral, sem tratamento.

A análise da redução dos títulos do HSV-1 (cepa 29R), no maior MOI testado (0,4) e na menor concentração do composto 12 (0,22  $\mu$ M), mostrou que ocorreu mais do que 99,9% de inibição da replicação herpética (redução de 3,2 log UFP/mL).

### 5.3.2.3 Frente ao HSV-2 (cepa 333)

Todas as concentrações testadas do composto 12 apresentaram diferenças estatisticamente significativas (teste de Dunnett -  $p < 0,05$ ), em relação aos seus controles virais (Figura

10). Além disso, esta amostra, quando em contato com o HSV-2 (cepa 333), não apresentou um padrão de redução do título viral dependente do MOI, como já foi explicado para o composto 4 (item 5.3.1.3).



**Figura 10:** Resultados da avaliação da atividade anti-HSV-2 (cepa 333) do composto 12, frente a três diferentes MOIs. Os resultados representam a média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. (\*) indica  $p < 0,05$ , teste ANOVA/Dunnett em relação a cada tratamento e cada MOI, e, seu respectivo controle viral, sem tratamento.

A análise da redução dos títulos do HSV-2 (cepa 333), no maior MOI testado (0,4) e na menor concentração do composto 12 (0,23  $\mu\text{M}$ ), mostrou que ocorreu mais do que 99,9% da replicação herpética (redução de 3,4 log UFP/mL). Assim como relatado para o composto 4 (item 5.3.1.3), o composto 12 apresentou maior % de inibição viral que o ACV (> 99%).

Neste trabalho, ficou evidenciado que os compostos 4 e 12 apresentaram atividade antiviral superior à do aciclovir, em todos os MOIs testados. Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo que investigou a potência de dois diterpenos isolados de algas marinhas brasileiras, frente a altas



concentrações do HSV-1. No maior MOI testado, os diterpenos foram mais potentes do que o aciclovir (ABRANTES et al., 2010).

Este ensaio comprovou a habilidade dos compostos 4 e 12 de interferir na replicação herpética, mesmo nas concentrações virais testadas mais elevadas. Tal potência antiviral não é comumente encontrada em agentes antivirais e representa uma clara vantagem desses compostos (TALARICO; DAMONTE, 2007).

#### **5.4 Avaliação do mecanismo da ação anti-herpética dos cardenólídeos 4 e 12**

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

Uma estratégia para o tratamento de algumas infecções virais humanas é a aplicação tópica de compostos que podem inativar permanentemente as partículas virais (EKBLAD et al., 2010). A inativação direta dos vírions pode ser causada pela sua desintegração completa, solubilização do envelope viral, modificações químicas ou degradação de algumas glicoproteínas essenciais do envelope (BULTMANN; TEUTON; BRANDT, 2007).

Com a intenção de se investigar a possível atividade virucida dos compostos 4 e 12, este ensaio foi conduzido partindo-se de concentrações 80X maiores que seus valores de  $CI_{50}$  (Tabela 2) e se realizou sete diluições seriadas (1:2), a partir da maior concentração. A utilização de concentrações bastante superiores aos valores de  $CI_{50}$  justifica-se pela necessidade de se ter certeza de que a ação anti-herpética determinada pelo ensaio de inibição da formação de placas de lise não foi acarretada pelo efeito direto das amostras sobre os vírus, antes do contato com as células hospedeiras, mas sim pela sua interferência em alguma etapa do processo de replicação viral.

Ambos os compostos não apresentaram atividade virucida frente as três cepas virais testadas (dados não mostrados), sugerindo que a atividade anti-HSV destes compostos não é exercida diretamente sobre as partículas virais antes da entrada dos vírus nas células.

Nagai e colaboradores (1972) estudaram a ação antiviral da ouabaina sobre a replicação do vírus Sendai, que são vírus RNA de fita simples, pertencentes à família Paramyxoviridae e

que infectam principalmente mamíferos, acarretando lesões no trato respiratório. Os autores relataram que a ouabaína não inativou diretamente as partículas virais, mas provocou a inibição de algum evento viral intracelular.

Hartley e colaboradores (2006) relataram a atividade antiviral da digoxina frente a diversos vírus, sendo que este fármaco não apresentou atividade virucida, quando em contato com os vírus DNA testados (adenovírus, vírus da varicela-zoster, citomegalovírus e HSV), assim como quando em contato com o vírus RNA testado (vírus da encefalomiocardite).

O mesmo comportamento foi relatado por Su e colaboradores (2008) para a digitoxina, sendo que neste estudo também foram utilizadas concentrações 80X maiores que seu valor de  $CI_{50}$  (0,05  $\mu$ M).

Assim, pode-se constatar que os cardenólídeos testados não apresentaram atividade virucida frente aos vírus RNA e DNA testados, e que os resultados obtidos nesta Dissertação corroboram os achados acima citados.

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

A avaliação do tempo de adição e remoção das amostras foi realizado para se determinar em qual(ais) estágio(s) da replicação herpética estes compostos estariam exercendo sua atividade antiviral, visto que eles não são virucidas.

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.

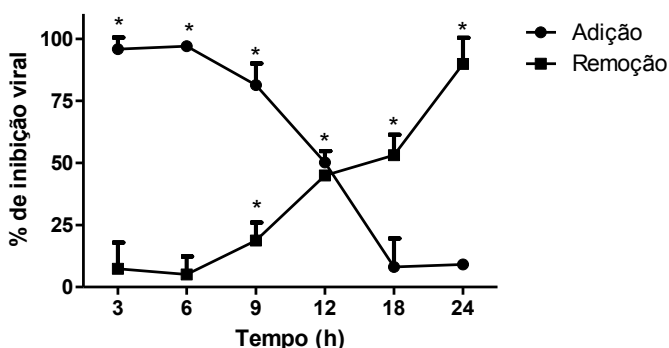
Desta forma, os resultados obtidos com essa estratégia metodológica indicaram as etapas que poderiam estar sendo inibidas pelos compostos 4 e 12. Essas etapas foram posteriormente investigadas individualmente, através de experimentos específicos para cada estágio da replicação viral.

Neste ensaio, foi testada apenas uma concentração de cada composto para cada cepa dos HSV, sendo que tal concentração foi escolhida por ter provocado uma inibição de

90-100% nos ensaios de inibição da formação das placas de lise. Além disso, foi utilizado o aciclovir como controle positivo para o HSV-1 (cepa KOS), na concentração de 20  $\mu\text{M}$ , a qual inibe 100% a replicação desta cepa.

Os resultados estão apresentados de acordo com a amostra testada, frente às duas cepas virais utilizadas [HSV-1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333)]; entretanto, o aciclovir foi testado apenas em relação ao HSV-1.

A Figura 11 mostra a ação anti-HSV-1 (cepa KOS) do aciclovir, em relação aos seus tempos de adição e remoção.



**Figura 11:** Efeito do tempo de adição e remoção do aciclovir 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. (\*)  $p < 0,01$  indica diferença estatisticamente significativa, teste ANOVA/Dunnett.

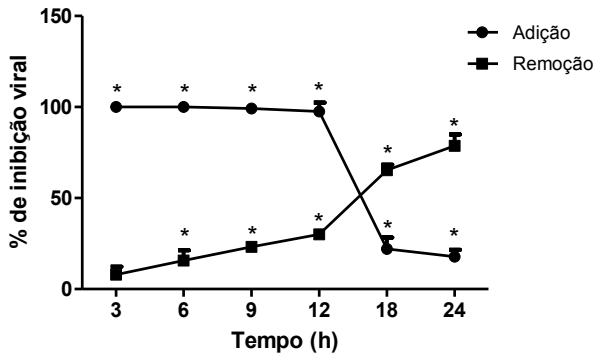
A análise dos resultados indicou que o ACV exerce sua atividade antiviral se adicionado até 9 h P.I., pois no tempo de 12 h P.I., tal atividade decaiu para aproximadamente 50%. A curva de remoção do fármaco em função do tempo comprovou essa ação, pois se ele for retirado antes de 9 h P.I., a atividade antiviral não ultrapassa 25%. Estes dados confirmam que o ACV atua realmente inibindo a replicação do DNA viral devido à inibição da atividade da DNA polimerase viral.

O pré-tratamento foi realizado com a adição dos compostos 4 e 12 às células previamente à infecção (-3h), e os resultados obtidos mostraram que estes compostos não

possuem efeito profilático *in vitro* da infecção pelas duas cepas virais testadas (dados não mostrados).

O tratamento simultâneo foi realizado através da adição dos compostos 4 e 12, juntamente com os vírus, e os resultados obtidos indicaram que esses dois compostos não inibiram os estágios iniciais da infecção (adsorção e penetração) pelos HSV, o que será confirmado através de outros experimentos específicos (itens 5.4.3 e 5.4.4), apresentados adiante.

A Figura 12 mostra o comportamento inibitório do composto 4 (0,26  $\mu\text{M}$ ) quando adicionado ou removido, em diferentes tempos, com relação ao HSV-1 (cepa KOS).

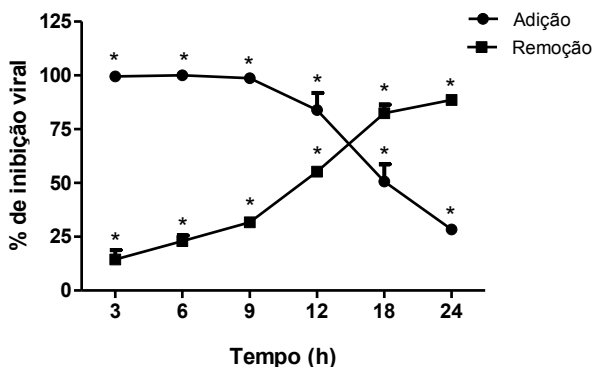


**Figura 12:** Efeito do tempo de adição e remoção do composto 4 (0,26  $\mu\text{M}$ ) no ciclo de replicação do HSV-1 (cepa KOS) em células VERO. Os resultados estão representados como % de inibição da replicação viral em relação ao controle viral, sem tratamento. Os valores obtidos representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. (\*)  $p < 0,01$  indica diferença estatisticamente significativa, teste ANOVA/Dunnett.

Como pode ser observado, o efeito inibitório deste cardenólídeo reduziu drasticamente quando ele foi adicionado 18 h P.I., e sua atividade antiviral manteve-se em 100% quando adicionado até 12 h P.I. Concordantemente, sua capacidade de inibição viral foi profundamente afetada quando ele foi removido até 12 h P.I. Quando ele foi retirado 18 h P.I., detectou-se uma inibição superior a 50%, comprovando que, se o composto for deixado por 18 h em contato com os vírus e as células, ele conseguirá exercer sua atividade antiviral mesmo ao ser

removido. Portanto, estes dados sugerem que o composto 4, para exercer ação anti-herpética *in vitro*, deve ser administrado até 12 h P.I.

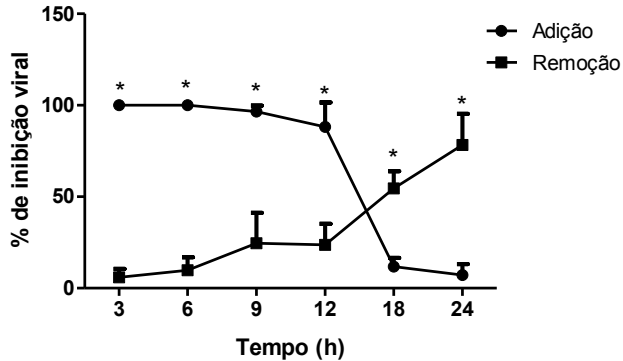
A Figura 13 mostra o perfil de atuação do composto 4 (0,072  $\mu\text{M}$ ) frente ao HSV-2 (cepa 333). Pode-se perceber que ele manteve um perfil de inibição similar ao apresentado em relação ao HSV-1 (cepa KOS), agindo quando adicionado 3 a 12 h P.I. e reduzindo seu % de inibição viral quando removido antes ou até 12 h de contato com as células e os vírus.



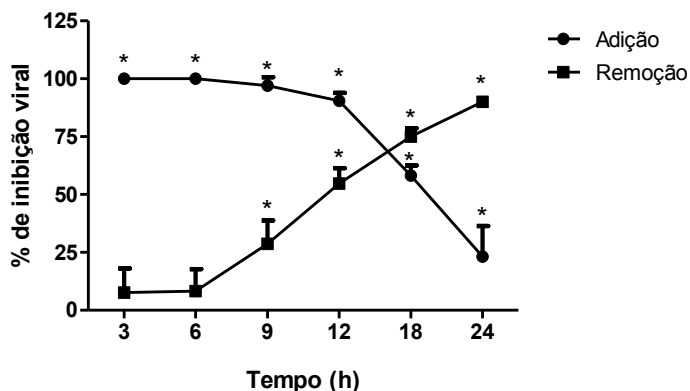
**Figura 13:** Efeito do tempo de adição e remoção do composto 4 (0,072  $\mu\text{M}$ ) no ciclo de replicação do HSV-2 (cepa 333) em células GMK AH1. Os resultados estão representados como % de inibição da replicação viral em relação ao controle viral, sem tratamento. Os valores obtidos representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. (\*)  $p < 0,001$  indica diferença estatisticamente significativa, teste ANOVA/Dunnett.

O composto 12 (Figuras 14 e 15) revelou o mesmo perfil de inibição da replicação viral que o composto 4, em relação aos dois vírus testados. Isto era esperado devido à sua similaridade estrutural e com base nos relatos da literatura (Dodson et al. 2007; Su et al., 2008) para esta classe de compostos, quando os autores mostraram perfis semelhantes de inibição para outros cardenólídeos.

Assim sendo, os dados obtidos também sugerem que o composto 12 pode inibir a replicação viral se for adicionado até 12 h P.I.



**Figura 14:** Efeito do tempo de adição e remoção do composto 12 ( $0,54 \mu\text{M}$ ) 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. (\*)  $p < 0,001$  indica diferença estatisticamente significativa, teste ANOVA/Dunnett.



**Figura 15:** Efeito do tempo de adição e remoção do composto 12 ( $0,46 \mu\text{M}$ ) no ciclo de replicação do HSV-2 (cepa 333) em células GMK AH1. 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. (\*)  $p < 0,01$  indica diferença estatisticamente significativa, teste ANOVA/Dunnett.

Concluindo, tanto o composto 4 quanto o composto 12, frente as duas cepas virais testadas, se forem adicionados até 12 h P.I. ou removidos após este período de tempo, irão inibir significativamente replicação viral.

Nagai e colaboradores (1972) demonstraram que a ouabaína inibiu a replicação do vírus Sendai, se adicionada até 9 h P.I., e concluíram que ele poderia estar inibindo o estágio de maturação viral ou a síntese dos componentes virais estruturais, ou ainda, a síntese de algum componente essencial para a produção da progênie viral. Estas mesmas etapas poderiam estar sendo inibidas pelos compostos 4 e 12.

Dodson e colaboradores (2007) investigaram a atividade anti-herpética da ouabaína adicionando-a em diferentes tempos P.I. Os resultados revelaram uma atividade tempo-dependente, com uma redução da capacidade de inibição viral quando ela foi adicionada 8 h P.I. ou após este período de tempo, indicando que o efeito anti-HSV-1 (cepa KOS) da ouabaína ocorre antes de 8 h P.I.

Su e colaboradores (2008) investigaram a atividade anti-herpética da digitoxina e relataram que ela pode afetar a replicação dos HSV-1 (cepa KOS) se adicionada até 6 h P.I.

Portanto, os estudos realizados até o momento mostraram que os cardenólídeos parecem exercer sua atividade antiviral se adicionados até 12 h P.I. Assim sendo, optou-se neste trabalho por realizar diversos experimentos envolvendo cada uma das etapas que ocorrem neste período para elucidar o mecanismo de ação anti-herpética dos compostos 4 e 12. Os resultados podem ser visualizados a partir dos itens 5.4.5, que serão apresentados adiante.

### **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 no envelope viral. A principal função dessas proteínas da 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 estereoespecífica de ligações de hidrogênio e associações lipofílicas (CHALLAND; YOUNG, 1998). No caso dos HSV, esse reconhecimento acontece via glicoproteínas do envelope (gB e/ou gD) a um receptor celular, que é geralmente o sulfato de heparana (CHALLAND; YOUNG, 1998; ROIZMAN; KNIFE; WHITLEY, 2007).

Experimentalmente, a adsorção viral ocorre a baixas temperaturas, 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 a baixa temperatura (4°C), ocasionando apenas a adsorção viral às células e, assim, apenas será avaliada a possível interferência da amostra nesta etapa do processo de replicação viral.

Este ensaio foi conduzido partindo-se de concentrações 16X maiores que os valores de  $CI_{50}$  dos dois compostos e realizou-se sete 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 adsorção viral é bem conhecida (AGUILAR; HELD; WAGNER, 2007;



MARCHETTI et al., 1995; SAKDARAT et al., 2009). Os resultados obtidos constam da Tabela 3.

**Tabela 3:** Resultados referentes ao ensaio de inibição da adsorção viral, expressos como valores de  $CI_{50}$  das amostras testadas.

Amostras	$CI_{50}$ ( $\mu$ g)		
	HSV-1 KOS	HSV-1 29R	HSV-2 333
<b>Composto 4</b>	SA	SA	SA
<b>Composto 12</b>	SA	SA	SA
<b>Sulfato de dextrana</b>	0,097 $\pm$ 0,004	0,075 $\pm$ 0,007	0,14 $\pm$ 0,014

SA: sem atividade; Os valores obtidos representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

Os compostos 4 e 12 não inibiram a adsorção dos vírus testados. Isto significa que o mecanismo da sua ação anti-herpética não pode ser atribuído ao bloqueio das interações ligante-receptor, comprovando os resultados obtidos no tratamento simultâneo (item 5.4.2).

Dodson e colaboradores (2007), que investigaram o efeito da ouabaína sobre a adsorção do HSV-1 (cepa KOS), também demonstraram que esta etapa não havia sido inibida até mesmo quando utilizaram uma concentração 100X maior do que aquela que reduziu 100 a 10.000X a replicação viral (100 nM), na presença de MOI 10. O mesmo foi relatado por Su e colaboradores (2008), que utilizaram uma concentração da digitoxina 16X maior que o seu valor de  $CI_{50}$  e também não demonstraram inibição da adsorção do HSV-1 (cepa KOS).

Esses resultados estão de acordo com os obtidos no presente trabalho.

#### 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 celular; para tal, os vírus necessitam penetrar a membrana plasmática celular. Os compostos que agem inibindo

ou desregulando esta etapa devem interferir no processo de fusão do vírus com a membrana plasmática e/ou desnudamento viral (CHALLAND; YOUNG, 1998).

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 as células e as penetrariam somente quando a temperatura de 37°C fosse restabelecida.

Este ensaio foi conduzido partindo-se de concentrações 16X maiores que os valores de  $CI_{50}$  dos compostos 4 e 12 e realizou-se sete 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; HELD; WAGNER, 2007; MARCHETTI et al., 1995; SAKDARAT et al., 2009). Os resultados obtidos constam da Tabela 4.

**Tabela 4:** Resultados referentes ao ensaio de inibição da penetração viral, expressos como valores de  $CI_{50}$  das amostras testadas.

Amostras	$CI_{50}$ ( $\mu$ g)		
	HSV-1 KOS	HSV-1 29R	HSV-2 333
<b>Composto 4</b>	SA	SA	SA
<b>Composto12</b>	SA	SA	SA
<b>Sulfato de dextrana</b>	0,44 $\pm$ 0,028	0,51 $\pm$ 0,007	0,35 $\pm$ 0,035

SA: sem atividade; Os valores obtidos representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

Os compostos 4 e 12 também não inibiram a penetração dos vírus testados, confirmando os resultados obtidos no tratamento simultâneo (item 5.4.2).

Mais uma vez, os resultados de Dodson e colaboradores (2007) e de Su e colaboradores (2008) foram confirmados neste estudo, ao mostrar-se a incapacidade dos compostos 4 e 12 de inibirem a penetração viral, já que os cardenolídeos ouabaína e digitoxina, testados nesses dois trabalhos citados, também não

inibiram este estágio do ciclo de replicação do HSV-1 (cepa KOS).

#### 5.4.5 Avaliação do efeito do composto 4 na expressão gênica viral

Como relatado anteriormente, os resultados obtidos pela adição e remoção das amostras indicaram que a atividade antiviral poderia estar acontecendo através da inibição das etapas posteriores à entrada (adsorção e penetração) dos vírus nas células, já que o tratamento simultâneo com os compostos 4 e 12 não provocou inibição deste processo. Por isso, foi avaliado se sua atividade anti-HSV estaria relacionada à inibição do processo de transcrição viral, em células VERO, infectadas com o HSV-1 (cepa KOS). A inibição deste processo em células GMK AH1 infectadas com o HSV-2 (cepa 333) não foi realizada neste estudo, pois não havia disponibilidade no laboratório dos iniciadores específicos para este vírus.

Já está bem descrito, que após o desnudamento viral, o genoma chega ao núcleo iniciando a expressão gênica, sendo esta coordenada e regulada no HSV-1 em três fases sequenciais (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007):

- Fase imediata ( $\alpha$ ): a expressão dessas proteínas não necessita de síntese proteica prévia, sendo estimulada pela proteína do tegumento VP16 e por quinases dependentes de ciclina. Os produtos desses genes são indutores transcricionais, estimulando a expressão de todos os genes do HSV ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ). Os RNAm dos genes  $\alpha$  são detectados 1-2 h P.I. e atingem seu pico de expressão em torno de 3 h P.I. As proteínas chamadas de *Infected Cell Proteins* (ICPs) 0, 4, 22, 47 e U<sub>S</sub>1.5 são sintetizadas nesta fase.
- Fase precoce ( $\beta$ ): a expressão dos genes precoces é dependente de, pelo menos, uma proteína imediata e, geralmente, os genes  $\beta$  codificam proteínas não estruturais, que exercem sua função na síntese do DNA viral, além de ativarem a expressão das proteínas  $\gamma$ . Exemplos dessas proteínas: DNA polimerase viral, proteína de ligação de DNA fita simples (ICP8), DNA helicase-primase, proteína U<sub>L</sub>9 e as enzimas necessárias

para o metabolismo do ácido nucleico viral (ribonucleotídeo redutase, timidina quinase, dUTPase, uracil DNA glicosilase, etc). A transcrição dos RNAm dos genes  $\beta$  é detectada em torno de 2-3 h P.I. e o pico de expressão gênica ocorre ente 5-10 h P.I.

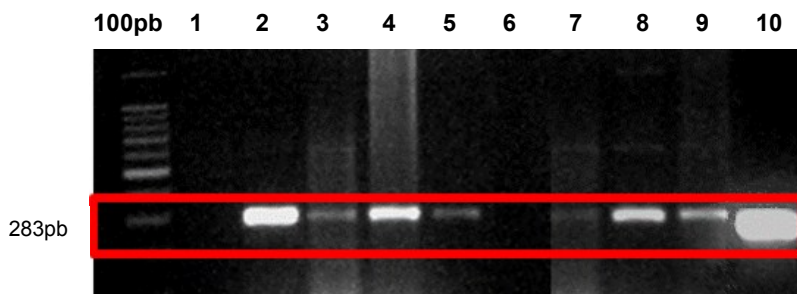
- Fase tardia ( $\gamma$ ): a expressão das proteínas  $\gamma$  é máxima após a replicação do DNA viral. A maioria dessas proteínas apresenta função estrutural e formam os novos vírions. Exemplos: glicoproteínas gB, gC, gD e gE. A transcrição dos RNAm dos genes  $\gamma$  ocorre até, pelo menos, 12 h P.I. em uma taxa crescente de transcritos, sendo que os mesmos já podem ser detectados desde as primeiras horas do ciclo replicativo herpético.

Em vista das características da expressão gênica do HSV-1, realizou-se neste estudo os tratamentos simultâneo (1 h) e pós-infecção com duração de 6 e 12 h. Optou-se pelo tratamento simultâneo, uma vez que, segundo dados da literatura, após 1 h de infecção, já se encontra quantidade expressiva de RNAm, principalmente referentes às proteínas  $\alpha$  (REZUCHOVÁ et al., 2003; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007). Sendo assim, neste período estes transcritos estariam ainda sendo sintetizados, e talvez não fosse possível detectar ação antiviral. Os demais tempos foram realizados com o intuito de investigar se, mesmo após o início do processo de transcrição, os compostos conseguiriam inibir a formação dos RNAm.

De acordo com trabalhos que relatam a importância do  $K^+$  para a replicação herpética (HARTLEY et al., 2006; HARTLEY et al., 1993; NAGAI et al., 1972), decidiu-se investigar se a adição deste íon ao meio de cultura utilizado para a realização destes experimentos acarretaria alterações na expressão gênica viral. Para isto, o meio de cultura utilizado foi suplementado com 27 mM de cloreto de potássio, sendo esta concentração 5X maior do que aquela contida nos meios de cultura usuais. Nagai e colaboradores (1972) utilizaram esta concentração de KCl para a avaliação da potencial atividade inibitória da replicação do vírus Sendai pela ouabaína, e relataram que o meio suplementado com o KCl reverteu a capacidade de inibição da ouabaína e o vírus replicou-se normalmente. Por isso, esta concentração foi utilizada neste trabalho.

A transcrição do gene  $U_L54$ , que codifica a proteína ICP27 ( $\alpha$ ), foi avaliada, e os resultados referentes ao tratamento simultâneo à infecção viral, com o composto 4 (0,13  $\mu$ M), aciclovir (ACV - 5  $\mu$ M) ou furosemida (FUR - fármaco depletor de  $K^+$  - 500  $\mu$ M) estão representados na Figura 16.

Além dos tratamentos realizados com cada umas destas amostras individualmente (colunas 3, 4 e 8), foram também realizados tratamentos concomitantes com o composto 4 e o ACV (coluna 5); o composto 4 e a furosemida (coluna 7); o composto 4 na presença de  $K^+$ , através da adição de KCl (27 mM) ao meio de cultura (coluna 9); e, por fim, foi feito um controle viral na presença de  $K^+$ , pela adição de KCl (27 mM) ao meio de cultura (coluna 10).



**Figura 16:** Efeito do tratamento simultâneo (vírus + amostras, 1 h) com o composto 4, aciclovir (ACV) ou furosemida (ELION et al.) e suas combinações na expressão gênica de  $U_L54$  (HSV-1 cepa KOS), através da técnica de RT-PCR. **Colunas:** 1- Controle negativo da reação; 2- Controle viral - CV (sem tratamento); 3- tratamento com o composto 4; 4- tratamento com o ACV; 5- tratamento com o composto 4 + ACV; 6- Controle celular (CC); 7- tratamento com o composto 4 + FUR; 8- tratamento com FUR; 9- tratamento com o composto 4 na presença de meio suplementado com KCl; 10- CV na presença de meio suplementado com KCl.

A Figura 16 mostra que os RNAm virais não foram detectados nas células não infectadas (CC - coluna 6) e no controle negativo da reação (coluna 1), sendo fortemente detectados nas células infectadas e não tratadas (CV - coluna 2).

A análise do tratamento individual realizado com o composto 4 revelou que ele reduziu a expressão dos RNAm (quando comparado com o CV) referente à codificação da proteína ICP27 (coluna 3), assim como aconteceu, em menor intensidade, com o aciclovir (coluna 4) e com a furosemida (coluna 8). Entretanto, ficou claro que a maior inibição da transcrição foi ocasionada pelo composto 4 (coluna 3).

Quando se realizou a adição concomitante do composto 4 e do ACV (coluna 5), ocorreu uma maior inibição da expressão gênica do que quando o tratamento foi realizado apenas com o ACV (coluna 4); porém, esta inibição parece ser semelhante àquela obtida com o tratamento feito apenas com o composto 4 (coluna 3). Estes resultados sugerem que o composto 4 parece exercer um efeito sinérgico ou aditivo, quando utilizado juntamente com o ACV.

Uma inibição importante da expressão gênica também ocorreu quando o tratamento foi realizado com o composto 4 e a furosemida (coluna 7), em comparação com os tratamentos realizados com os mesmos compostos, mas individualmente (colunas 3 e 8). Isto também sugere que tal combinação poderia acarretar um efeito sinérgico em relação à atividade antiviral. É importante ressaltar que a furosemida é um fármaco que inibe a ação da bomba transportadora dos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , chamada de NKCC. A inibição da NKCC pela furosemida inibe a entrada nas células do íon  $\text{K}^+$  (RUSSEL, 2000), e assim falta potássio para que o processo de replicação viral ocorra normalmente. Desta forma, quando ambos os compostos foram utilizados juntos, ocorreu a inibição da NKATPase e da NKCC pelo composto 4 e furosemida, respectivamente. A inibição ocasionada pelo composto 4 é esperada por ele ser um cardenolídeo, e sua capacidade de inibição da bomba NKATPase foi detectada neste estudo e será demonstrada posteriormente no item 5.5.

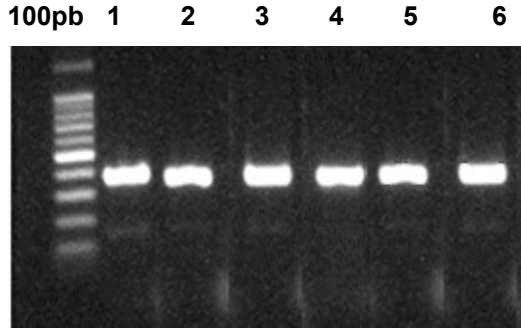
Hartley e colaboradores (2008) patentearam a formulação de um gel antiviral contendo um fármaco diurético (furosemida) e um cardenolídeo (digoxina). De acordo com os inventores, este gel poderá ser usado no tratamento de infecções causadas por vírus DNA, tais como o adenovírus, citomegalovírus, vírus da varicela zoster e os HSV. Esta proposta demonstra o efeito sinérgico destes compostos sobre a inibição

da replicação viral, deixando evidente sua importância na P&D de novos fármacos antivirais.

Por fim, foi analisado o comportamento do composto 4 quando o meio utilizado continha uma concentração de  $K^+$  5X maior do que aquela do meio de cultura geralmente usado (meio MEM), que contém 5,4 mM de KCl (coluna 9). A coluna 10 representa as células infectadas que receberam meio suplementado com KCl e não foram tratadas. A replicação herpética ocorreu normalmente na presença da alta concentração do íon, sugerindo através da intensidade da banda, que ocorreu um aumento no processo de transcrição gênica, em comparação com o controle viral (coluna 2). Já quando as células infectadas receberam o composto 4, no meio suplementado com KCl (coluna 9), ocorreu a inibição da expressão gênica; no entanto, essa inibição foi menor do que aquela detectada quando as células foram tratadas apenas com o composto 4 e permaneceram em um meio não suplementado com KCl (coluna 3).

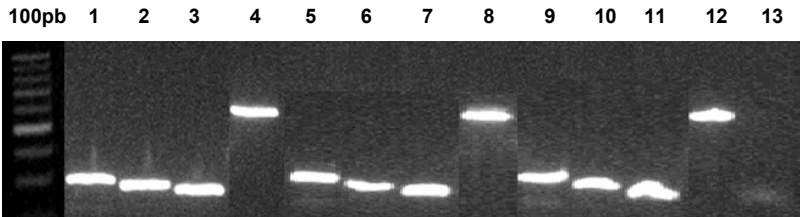
Estes resultados indicam que, realmente, o íon  $K^+$  é necessário para a replicação herpética, comprovando o estudo de Nagai e colaboradores (1972).

A análise da expressão gênica da proteína constitutiva celular  $\beta$ -actina também foi realizada a fim de avaliar se a sua transcrição não havia sido afetada pelos tratamentos realizados. A Figura 17 mostra que o processo de transcrição referente ao RNAm da  $\beta$ -actina não foi alterado em nenhum dos tratamentos.



**Figura 17:** Efeito do tratamento simultâneo (vírus + amostras, 1 h) com o composto 4, aciclovir (ACV) e furosemida (ELION et al.) e suas combinações na expressão gênica da  $\beta$ -actina, através da técnica de RT-PCR. **Colunas:** 1- Controle viral - CV (sem tratamento); 2- tratamento com o composto 4 + ACV; 3- tratamento com o composto 4; 4- tratamento com o composto 4 + FUR; 5- tratamento com o composto 4 na presença de meio suplementado com KCl; 6- tratamento com o ACV.

A Figura 18 mostra alguns dos resultados obtidos quando os tratamentos foram feitos 1 h P.I. e duraram 12 h; após este período os RNAs foram extraídos.



**Figura 18:** Efeito do tratamento de 12 h P.I. com o composto 4, aciclovir (ACV) e furosemida (ELION et al.) e suas combinações na expressão gênica do HSV-1 (cepa KOS), através da técnica do RT-PCR. **Colunas:** 1 a 4- tratamento com o composto 4 e ACV; **colunas 5 a 8-** tratamento com o ACV; **colunas 9 a 12-** controle viral- CV (sem tratamento); **coluna 13-** controle negativo da reação; Genes avaliados: **colunas 1, 5 e 9 –** ACTB ( $\beta$ -actina – 315pb); **colunas 2, 6 e 10:** U<sub>L</sub>54 (ICP27 – 283pb); **colunas 3, 7 e 11:** U<sub>L</sub>52 (259pb); **colunas 4, 8 e 12:** U<sub>L</sub>13 (600pb).



Pode-se constatar que todos os tratamentos não foram capazes de inibir a expressão gênica, ou seja, a transcrição dos genes  $\alpha$  (ICP27 - colunas 2, 6 e 10),  $\beta$  (U<sub>L</sub>52 - colunas 3, 7 e 11) e  $\gamma$  (U<sub>L</sub>13 - colunas 4, 8 e 12). Os mesmos resultados foram obtidos quando as células foram infectadas por 1 h e foram posteriormente tratadas por 6 h (dados não mostrados). A expressão gênica do RNAm da  $\beta$ -actina também não foi alterado (colunas 1, 5 e 9).

A partir dos resultados obtidos, ou seja, a inibição da expressão gênica viral, quando do tratamento simultâneo, e ausência de inibição no tratamento pós-infecção, é possível supor que o composto 4, a furosemida e o aciclovir não inibem o processo de transcrição, já que a inibição ocorreu apenas quando o tratamento foi simultâneo, ou seja, quando o processo de infecção ocorreu na presença dos compostos, no período de 1 h P.I. Assim, não foi possível concluir que os compostos interferiram diretamente na transcrição, já que qualquer processo ocorrido após a entrada dos vírus nas células poderia estar sendo alterado pela presença dos mesmos. Para melhor entender o ocorrido, outras estratégias metodológicas poderão ser utilizadas para comprovar tal efeito.

#### **5.4.6 Avaliação do efeito das amostras na expressão das proteínas virais**

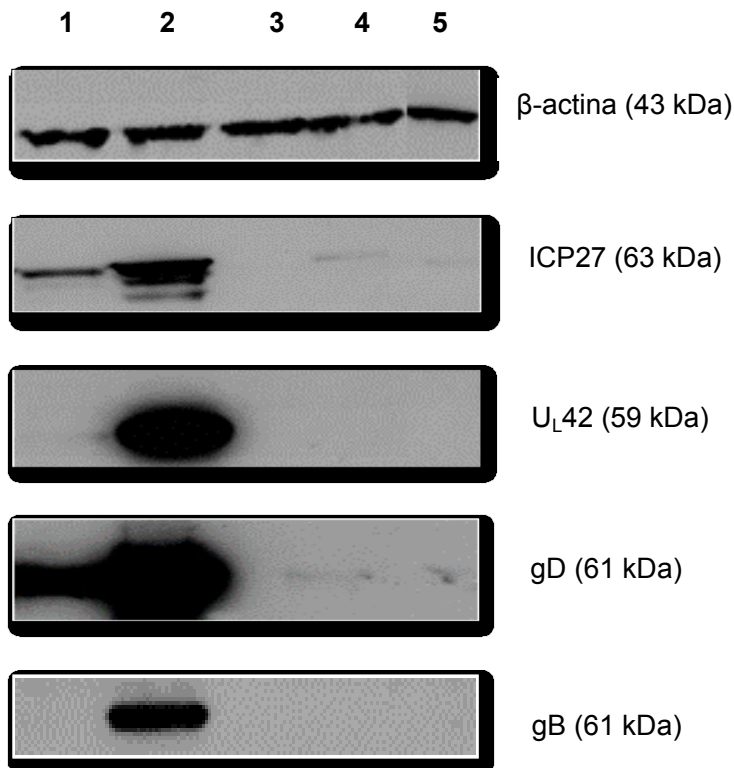
A expressão das proteínas virais ICP27 ( $\alpha$ ), U<sub>L</sub>42 ( $\beta$ ), gB e gD ( $\gamma$ ) e da proteína constitutiva celular,  $\beta$ -actina, foi analisada pelo método de *Western blotting*.

Como relatado no item anterior em relação à expressão gênica viral, os resultados referentes à curva de adição e remoção das amostras também sugeriram que o mecanismo de ação dos compostos 4 e 12 poderia ocorrer através da 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). A inibição desta síntese em células GMK AH1 infectadas com o HSV-2 não foi realizada neste estudo, pois o laboratório não possui os anticorpos específicos para este sorotipo.

Os tratamentos das culturas de células VERO infectadas com HSV-1 foram feitos, separadamente, com os compostos 4 e

12, nas concentrações que inibiram 90 a 100% da replicação viral. Portanto, o composto 4 foi testado a 0,26  $\mu\text{M}$  e o composto 12 a 0,54  $\mu\text{M}$ . O aciclovir foi utilizado como controle positivo na concentração de 15  $\mu\text{M}$ , que inibe 100% a replicação viral. Os tratamentos foram realizados após 1 h de adsorção viral e seu término ocorreu 18 h P.I., quando completou-se um ciclo de replicação viral. Assim, as proteínas foram extraídas (aproximadamente 5  $\mu\text{g}$ ) 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 19. 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 19, percebe-se que as proteínas virais não foram detectadas nas células não infectadas (CC - coluna 3) e que todos esses produtos gênicos foram detectados nas células infectadas e não tratadas (CV - coluna 2).



**Figura 19:** Efeitos dos compostos 4 e 12 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 *Western Blotting*. **Coluna 1:** células infectadas e tratadas com 15  $\mu$ M de aciclovir; **Coluna 2:** células infectadas e sem tratamento (controle viral - CV); **Coluna 3:** células não infectadas (controle celular - CC); **Coluna 4:** células infectadas e tratadas com o composto 4 (0,26  $\mu$ M); **Coluna 5:** células infectadas e tratadas com o composto 12 (0,54  $\mu$ M).

Os compostos 4 e 12 inibiram a expressão das quatro proteínas testadas (colunas 4 e 5). Esta inibição foi total para as proteínas precoce ( $\beta$ ) U<sub>L</sub>42 e tardia ( $\gamma$ ) gB, sendo que a expressão da proteínas imediata ( $\alpha$ ) ICP27 e tardia ( $\gamma$ ) gD também foi quase totalmente suprimida.

De acordo com Jones (2003), apesar da síntese proteica viral ocorrer em cascata, ou seja, as proteínas imediatas induzem a tradução das precoces, que, por sua vez, induzirão as tardias, a expressão do RNAm das proteínas  $\beta$  e  $\gamma$  necessita da presença de proteínas  $\alpha$  e, portanto, esses produtos gênicos são requeridos durante todo o processo de síntese proteica. A ICP27 ( $\alpha$ ) tem diversas funções na replicação viral, entre elas: redistribuir os complexos ribonucleoproteicos; interferir no processo de *splicing* (remoção dos íntrons) dos transcritos imediatos; transportar RNAs tardios do núcleo para o citoplasma e bloquear o processamento do mRNA, acarretando a diminuição da produção de proteínas celulares. Mais especificamente, esta proteína é necessária para a replicação eficiente do DNA, por promover o acúmulo de proteínas  $\beta$  e, após isto, reprimir os genes  $\alpha$  e  $\beta$ , promovendo a transição da expressão gênica de  $\beta$  para  $\gamma$  (JONES, 2003; SMITH; MALIK; CLEMENTS, 2005). Assim, a proteína ICP27 é de fundamental importância para todas as etapas dos processos de transcrição e tradução viral.

Como pode ser visto na Figura 19, a ICP27 teve sua expressão bastante reduzida pelos compostos 4 e 12, sendo que esta redução poderia ser a causa da inibição ou da redução da síntese das demais proteínas virais testadas, conforme pode também ser observado nesta mesma Figura 19.

Estes resultados podem ser correlacionados com aqueles obtidos e apresentados no item 5.4.2, quando foi demonstrado que estes dois compostos exercem sua ação antiviral se adicionados até 12 h P.I., sendo que neste período de tempo ocorrerá a expressão de todas as proteínas virais (COLBERE, 1975). Portanto, estas amostras atuariam diretamente no processo de tradução viral, em qualquer um dos estágios de síntese proteica ( $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ ). Isto fica mais claro se for considerado, por exemplo, o fato de que a porcentagem de inibição do composto 4, quando adicionado apenas 12 h P.I., foi de 97%, quando grande parte da expressão das proteínas  $\alpha$  e  $\beta$  já ocorreu sem nenhuma intervenção, ocorrendo, principalmente, a expressão das proteínas  $\gamma$ .

Dodson e colaboradores (2007) relataram a atividade anti-herpética da ouabaína e também investigaram sua ação sobre a expressão da proteína ICP27. Estes autores também demonstraram que a síntese desta proteína foi totalmente inibida pela ouabaína, concluindo que ela atua no processo de síntese

das proteínas  $\alpha$ . Em outro estudo, Su e colaboradores (2008) relataram que a digitoxina inibiu a expressão da proteína gD ( $\gamma$ ). Portanto, os resultados do presente trabalho corroboram os já existentes na literatura.

Sabe-se que para que ocorra a síntese dos polipeptídeos  $\gamma$  é necessário que a síntese do DNA viral esteja ocorrendo normalmente, já que o DNA viral ativa a síntese destas proteínas virais tardias (HONNESS; ROIZMAN, 1975). Além disso, já foi relatado que os promotores de transcrição dos genes tardios são relativamente fracos e, por isso, um número alto de cópias é requerido para sua expressão eficiente (JOHNSON et al., 1986). Estes dados sugerem que o processo de replicação do DNA do HSV-1 poderia estar sendo inibido pela ação dos cardenolídeos testados, assim como ocorre com o aciclovir, o qual inibe o processo de replicação viral e, conseqüentemente, reduz a expressão gênica.

Em relação ao tratamento com o fármaco aciclovir (coluna 1), foi obtido o mesmo padrão de inibição da expressão proteica, ou seja, as proteínas U<sub>L</sub>42 e gB foram completamente inibidas e as proteínas ICP27 e gD foram inibidas em menor intensidade.

O aciclovir quando em contato com uma célula infectada pelo HSV, será fosforilado pela timidina quinase viral e as demais fosforilações serão realizadas pelas timidinas quinases 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, sendo incorporado no DNA viral que está em processo de síntese, inibindo o término da síntese da cadeia do DNA viral e sua conseqüente replicação (ELION et al., 1977). Portanto, a inibição total ou parcial da atividade da DNA polimerase viral acarretará a redução do processo de síntese das demais proteínas virais, já que o acúmulo de DNA viral influencia diretamente o processo de transição da transcrição dos genes  $\beta$  para genes  $\gamma$ , funcionando como um ativador deste processo, juntamente com as proteínas  $\beta$ . Então, o número de vírions formados será menor ou nulo, dependendo da concentração de aciclovir utilizada, e a atividade antiviral observada será atribuída apenas à inibição da enzima viral e não à capacidade de inibição de alguma fase da síntese proteica, sendo esta, apenas uma conseqüência (BOEHMER; LEHMAN, 1997; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007).

#### 5.4.7 Avaliação do efeito das amostras sobre a liberação viral

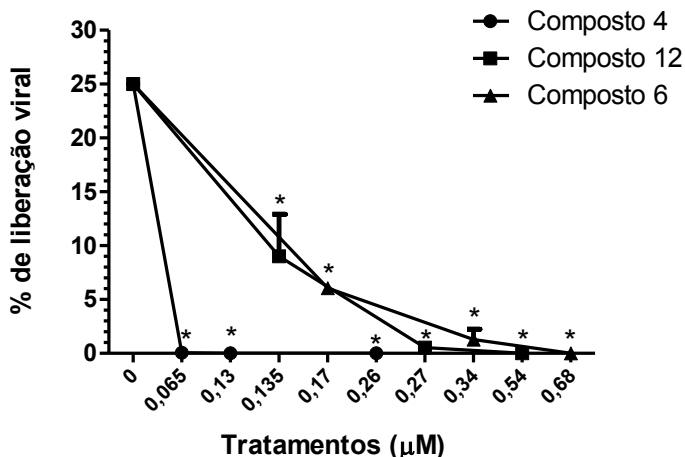
Os resultados obtidos no ensaio de redução do número de partículas virais infecciosas (item 5.3) possibilitaram a formulação da hipótese de que os compostos 4 e 12 poderiam inibir a liberação viral; por isso, esta avaliação tornou-se necessária.

Este processo final do ciclo de replicação herpética ainda não está completamente desvendado, pois existem diferentes teorias quanto à forma pela qual os vírions deixam as células infectadas para alcançarem as células vizinhas e continuarem se replicando. Entretanto, todas as teorias estão de acordo de que os HSV podem ser envelopados na membrana nuclear interna e para que isso ocorra é necessário que a membrana interna e a lâmina nuclear passem por extensivos rearranjos executados por, pelo menos, três proteínas virais: U<sub>S</sub>3 PK, U<sub>L</sub>31 e U<sub>L</sub>34 (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007).

A via de liberação herpética mais aceita seria o envelopamento dos capsídeos na membrana nuclear interna, estas estruturas fusionam-se à membrana externa nuclear, se tornam desenvolvidos e o capsídeo nu é liberado no citoplasma. As vesículas citoplasmáticas envelopam esses capsídeos e os transportam até a membrana plasmática celular. No momento em que eles são liberados das vesículas, são novamente envelopados e seus envelopes externos se fundem à membrana plasmática, sendo liberados no espaço extracelular (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007).

Para a realização deste ensaio, foram utilizados os valores de CI<sub>50</sub> (Tabela 2) de cada composto, frente às diferentes cepas virais, e também foram testadas 2X CI<sub>50</sub> e CI<sub>50</sub>/2. O uso destas concentrações é justificado pela intenção de se verificar a dependência da concentração *versus* atividade antiviral.

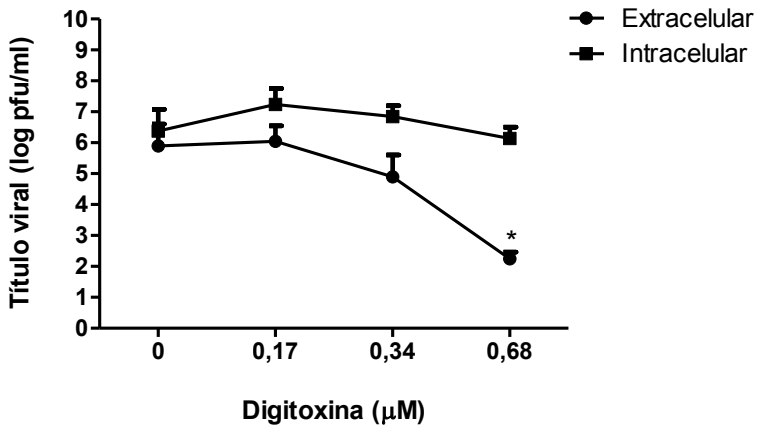
A inibição da liberação do HSV-1 (cepa KOS) causada pelos compostos 4 e 12 está representada na Figura 20. Como controle positivo da inibição desta etapa foi usada a digitoxina (composto 6), tendo em vista os resultados obtidos por Su e colaboradores (2008).



**Figura 20:** Efeito dos compostos 4 e 12 e da digitoxina (composto 6) sobre a liberação do HSV-1 (cepa KOS). Os resultados representam a média de dois experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. (\*) indica  $p < 0,0001$ , teste ANOVA/Dunnett em relação ao controle viral, sem tratamento.

Todas as concentrações testadas dos três cardenólídeos inibiram a liberação viral. Além disso, pode-se notar que os percentuais de vírus liberados foram gradualmente diminuídos, à medida que a concentração das amostras aumentou, ou seja, os perfis de inibição da liberação viral são concentração-dependentes. Entretanto, o composto 4 se mostrou muito mais eficaz na inibição desta etapa da replicação viral, visto que na menor concentração (0,065  $\mu$ M) apresentou 99,7% de inibição da liberação do HSV-1 (cepa KOS). Os compostos 6 e 12, nas suas menores concentrações (0,17 e 0,135  $\mu$ M, respectivamente), inibiram 76 e 64% da capacidade de liberação viral, respectivamente. Os resultados obtidos com o composto 6 confirmaram os dados apresentados por Su e colaboradores (2008).

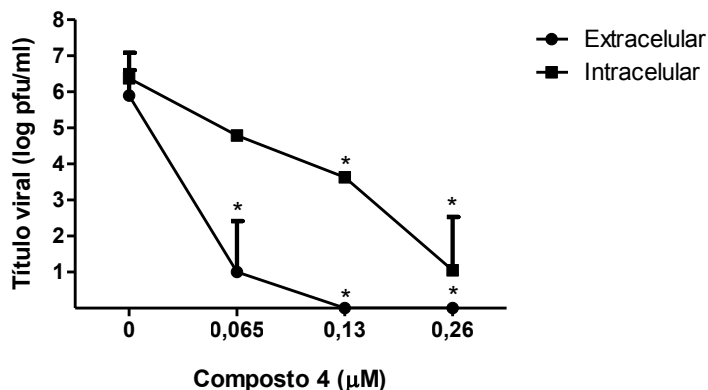
A quantificação das partículas virais presentes no sobrenadante (extracelular) e no interior das células infectadas (intracelular) permitiu, além da investigação da inibição da liberação viral, a análise da capacidade de inibição dos vírus intracelulares pelos compostos 6, 4 e 12 (Figuras 21, 22 e 23).



**Figura 21:** Título viral (HSV-1 cepa KOS) intracelular e extracelular na presença da digitoxina (composto 6). Os resultados representam a média de dois experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. (\*) indica  $p < 0,0001$ , teste ANOVA/Dunnett em relação ao controle viral, sem tratamento.

A análise dos resultados da Figura 21 indica que a digitoxina, utilizada como controle positivo, realmente inibiu a liberação viral, já que foi possível detectar que o título viral extracelular foi reduzido bruscamente e de forma significativa, quando comparado ao título do controle viral, na maior concentração testada (0,68  $\mu\text{M}$ ), sendo essa uma redução maior que 99,9% das partículas virais, que deveriam ter sido liberadas. Esta redução do número de vírus extracelulares indica que as partículas virais não foram liberadas do interior da célula para o meio extracelular.

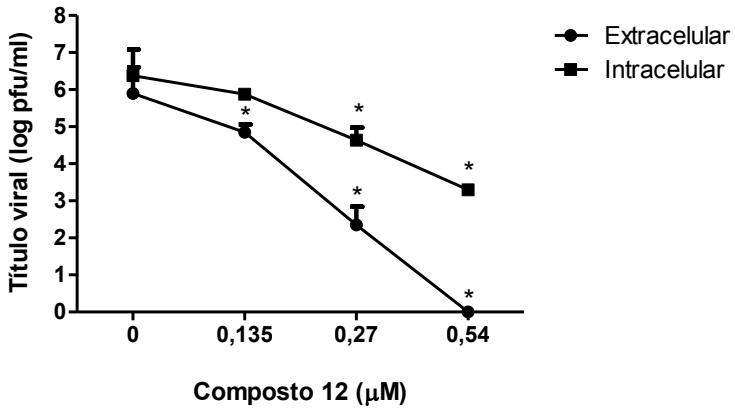




**Figura 22:** Título viral (HSV-1 cepa KOS) intracelular e extracelular na presença do composto 4. Os resultados representam a média de dois experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. (\*) indica  $p < 0,001$ , teste ANOVA/Dunnett em relação ao controle viral, sem tratamento.

Os resultados da avaliação do efeito do composto 4 nos títulos intracelulares e extracelulares do HSV-1 (cepa KOS) (Figura 22) confirmaram o seu potencial de inibição da liberação viral, devido à importante e significativa redução do título viral extracelular, quando comparado ao título do controle viral, alcançando mais do que 99,99% de redução, na menor concentração testada (0,065  $\mu\text{M}$ ).

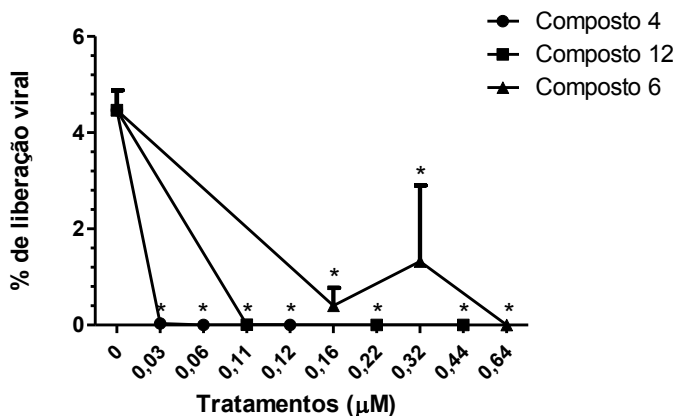
Ao contrário do composto 6, o composto 4 provocou um decaimento significativo do título viral intracelular, nas duas maiores concentrações testadas (0,13 e 0,26  $\mu\text{M}$ ), o que significa capacidade de inibir as partículas virais intracelulares, além de inibir a liberação viral. Isto demonstra que, além de inibir a saída da progênie viral das células, ele inibe também a replicação intracelular viral, reduzindo o número de integrantes desta progênie. No caso do composto 4 (0,26  $\mu\text{M}$ ), esta inibição do número de partículas virais intracelulares representa mais do que 99,999% de redução, quando comparado ao controle viral.



**Figura 23:** Título viral (HSV-1 cepa KOS) intracelular e extracelular na presença do composto 12. Os resultados representam a média de dois experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. (\*) indica  $p < 0,05$ , teste ANOVA/Dunnett em relação ao controle viral, sem tratamento.

A análise da Figura 23 indicou que o composto 12 também inibiu significativamente a liberação viral, já que o título viral extracelular foi reduzido em mais de 99,9% na concentração intermediária (0,27  $\mu\text{M}$ ) testada, quando comparado ao título do controle viral. Assim como aconteceu com o composto 4 (Figura 22), o título viral intracelular também foi reduzido em mais do que 99,9%, quando este composto foi testado na sua maior concentração (0,54  $\mu\text{M}$ ). Entretanto, esta redução foi menos significativa quando comparada à do composto 4.

A mesma avaliação, em relação aos percentuais de vírus liberados, foi realizada para o HSV-1 (cepa 29R) (Figura 24) e foi visto que todas as concentrações testadas dos três cardenólídeos inibiram a liberação viral. Além disso, pode-se constatar que os compostos 4 e 12 foram mais eficazes em relação à esta cepa do que o composto 6, enfatizando a maior sensibilidade dos compostos 4 e 12 à cepa resistente ao ACV.



**Figura 24:** Efeito dos compostos 4 e 12, e da digitoxina (composto 6), sobre a liberação do HSV-1 (cepa 29R). Os resultados representam a média de dois experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. (\*) indica  $p < 0,001$ , teste ANOVA/Dunnett em relação ao controle viral, sem tratamento.

O padrão de inibição da liberação viral exibido pelos compostos 4 e 12 foi muito semelhante, pois ambos inibiram 100% da liberação viral, em concentrações intermediárias (0,06 e 0,22  $\mu$ M, respectivamente), e apresentaram uma média de inibição da liberação viral de 99,5% na menor concentração testada (0,03 e 0,11  $\mu$ M, respectivamente).

O composto 6 inibiu a liberação viral, em todas as concentrações testadas; entretanto, isto não ocorreu de maneira concentração-dependente, mas mesmo assim ele inibiu 100% da liberação viral, na maior concentração testada (0,64  $\mu$ M).

Os resultados da redução dos títulos virais do HSV-1 (cepa 29R), pelos três cardenólídeos, constam na Tabela 5. Cabe ressaltar que foram testadas três concentrações de cada composto, mas os resultados apresentados referem-se à menor concentração testada, equivalente ao  $CI_{50}/2$ .

Os resultados revelam que o composto 4 apresentou o maior % de redução dos títulos virais intra e extracelulares, demonstrando seu maior potencial de inibição tanto da liberação quanto da replicação viral.

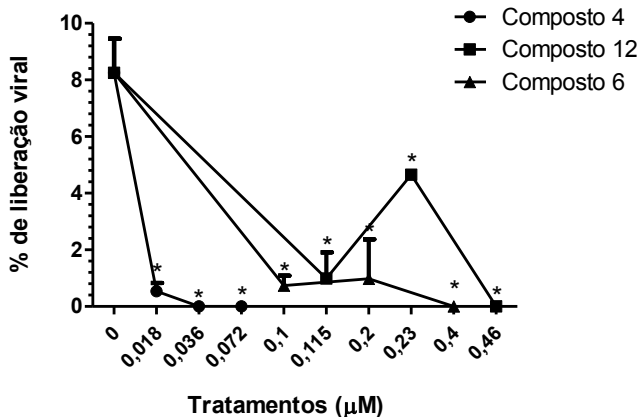
Os compostos 12 e 6 não apresentaram % de redução dos títulos virais intracelulares significativos nestas concentrações, que são seus valores de  $CI_{50}/2$ .

**Tabela 5:** Efeito dos compostos 4, 12 e 6 sobre a redução dos títulos virais (%), intra e extracelulares, do HSV-1 (cepa 29R).

Amostras (menor concentração testada - $\mu\text{M}$ )	Redução dos títulos virais (%)	
	Intracelular	Extracelular
Composto 4 (0,03)	99*	> 99,99*
Composto 12 (0,11)	< 90	99,9*
Composto 6 (C+ - 0,16)	< 90	99*

Os resultados representam a média de dois experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. (\*) indica  $p < 0,05$ , teste de Dunnett em relação ao controle viral, sem tratamento.

Para finalizar, os resultados obtidos para os três compostos, em relação à capacidade de inibição da liberação do HSV-2 (cepa 333) estão apresentados na Figura 25. Assim como aconteceu com o HSV-1 (cepas KOS e 29R), os três compostos inibiram, de forma significativa, ( $p < 0,001$ ), a liberação do HSV-2.



**Figura 25:** Efeito dos compostos 4 e 12, e da digitoxina (composto 6) sobre a liberação do HSV-2 (cepa 333). Os resultados representam a média de dois experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. (\*) indica  $p < 0,001$ , teste ANOVA/Dunnett em relação ao controle viral, sem tratamento.

Além disso, o composto 4 foi mais eficaz em relação a esta cepa do que os demais compostos testados, pois nas concentrações de 0,036 e 0,072  $\mu\text{M}$  ocorreu a inibição total da liberação viral, fato que não aconteceu com os compostos 12 e 6. O composto 4, na sua menor concentração (0,018  $\mu\text{M}$ ) inibiu 93% da liberação viral.

Os compostos 6 e 12 inibiram totalmente a liberação viral, apenas nas maiores concentrações testadas (0,4 e 0,46  $\mu\text{M}$ , respectivamente).

Os resultados da redução dos títulos virais do HSV-2 (cepa 333), pelos três cardenólídeos, constam na Tabela 6. Cabe ressaltar que foram testadas três concentrações de cada composto, mas os resultados apresentados referem-se à menor concentração testada, equivalente ao  $\text{CI}_{50}/2$ .

**Tabela 6:** Efeito dos compostos 4, 12 e 6 sobre a redução dos títulos virais (%), intra e extracelulares, do HSV-2 (cepa 333).

Amostras (menor concentração testada - $\mu\text{M}$ )	Redução dos títulos virais (%)	
	Intracelular	Extracelular
<b>Composto 4 (0,018)</b>	> 90*	> 99*
<b>Composto 12 (0,115)</b>	90*	> 99*
<b>Composto 6 (C+ - 0,1)</b>	< 90	99*

Os resultados representam a média de dois experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. (\*) indica  $p < 0,05$ , teste de Dunnett em relação ao controle viral, sem tratamento.

O composto 4 apresentou a maior inibição da replicação dos vírus intracelulares (> 90%), seguido do composto 12 (90%), ambos nas menores concentrações testadas. Já o composto 6 não apresentou inibição significativa do título viral intracelular na menor concentração (0,1  $\mu\text{M}$ ), apenas quando testado no valor da sua  $\text{CI}_{50}$  (0,2  $\mu\text{M}$ ).

Em relação à redução dos títulos virais extracelulares, os compostos 4 e 12 apresentaram % de redução muito semelhantes e superiores ao % de redução do composto 6.

Como mostrado em todos os resultados obtidos neste ensaio, os três compostos testados inibiram significativamente a

liberação viral e, quando seus títulos virais (log ufp/mL) intra ou extracelulares foram comparados com seus respectivos controles virais, todos os compostos apresentaram perfis de inibição concentração/dependente.

#### **5.4.8 Avaliação do efeito das amostras na propagação intercelular viral**

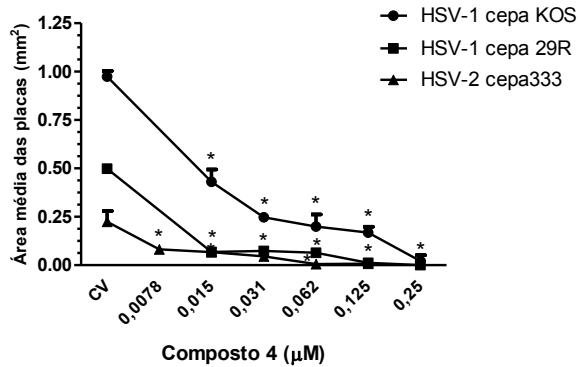
Os HSV infectam as células do epitélio escamoso estratificado, que formam a epiderme e a mucosa, em diferentes sítios anatômicos, incluindo as regiões orais e genitais. A rápida propagação desses vírus de célula para célula é de vital importância para que ocorra o estabelecimento da infecção primária produtiva ou da infecção recorrente, em humanos. Por isso, essa dispersão dos vírus para as células é um alvo atrativo para uma intervenção antiviral (AMMENDOLIA; MARCHETTI; SUPERTI, 2007; NYBERG et al., 2004).

*In vitro*, os HSV infectam as células através do processo de adsorção, seguido pela fusão do envelope viral com a membrana celular plasmática, ou através da dispersão viral célula a célula, por um mecanismo que ainda é pouco compreendido. A dispersão viral célula a célula nos tecidos epiteliais envolve o movimento das partículas virais através das junções celulares, em um espaço que é resistente aos efeitos dos anticorpos que neutralizariam os vírus. Acredita-se que as mesmas glicoproteínas e os mesmos receptores celulares que mediam a entrada dos HSV na superfície apical celular, promovem a dispersão radial dos vírus (COCCHI et al., 2000; ROLLER; RAUCH, 1998). Sabe-se que o complexo glicoproteico gE/gI promove a dispersão célula a célula dos vírus, ordenando novos vírions em direção às junções celulares epiteliais, sendo que poucos vírions chegarão na superfície apical celular. Esse complexo proteico é requerido para a dispersão eficiente dos vírus através de células epiteliais, neurônios e outras células polarizadas com junções celulares. Os HSV mutantes, sem gE ou apenas sem o domínio citoplasmático de gE, são raramente encontrados nas junções celulares, sendo encontrados nas superfícies celulares, fluidos das culturas celulares e acumulados no citoplasma (JOHNSON et al., 2001; MCMILLAN; JOHNSON, 2001; WISNER et al., 2000).

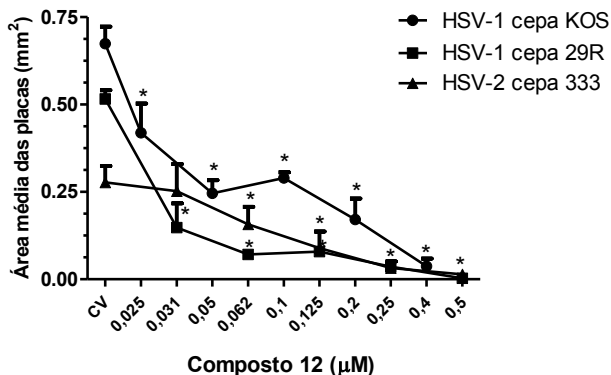
Este ensaio foi realizado com o intuito de avaliar se os compostos 4 e 12 eram capazes de promover a inibição da dispersão radial dos vírus herpéticos célula a célula e, assim, reduzirem o tamanho da área das placas de lise formadas (JENSSEN et al., 2008). Sendo assim, os efeitos destes compostos na dispersão radial celular do HSV-1 (cepas KOS e 29R) e do HSV-2 (cepa 333) foram investigados. Neste experimento, foi utilizado o agente espessante carboximetilcelulose (CMC) para assegurar que a dispersão dos vírus estava ocorrendo somente pela transmissão célula a célula. Os resultados obtidos foram expressos como a área ( $\text{mm}^2$ ) das placas de lise virais formadas, em comparação com aquelas dos controles virais não tratados.

Os compostos 4 e 12 reduziram a área das placas de lise formadas pelos vírus HSV-1 (cepas KOS e 29R) e HSV-2 (cepa 333), sugerindo que eles, além de inibirem a replicação viral, também reduzem a dispersão viral célula a célula (*cell to cell spread*).

Em todas as concentrações testadas, os compostos 4 e 12 reduziram significativamente ( $p < 0,001$ ) a área das placas de lise formadas pelas três cepas virais (Figuras 26 e 27, respectivamente).



**Figura 26:** Efeito do composto 4 na inibição da propagação intercelular dos vírus HSV-1 (cepas KOS e 29R) e HSV-2 (cepa 333). Foram medidas as áreas de 20 placas de lise formadas pelos diferentes vírus na presença da amostra (0,0078 a 0,25  $\mu\text{M}$ ). Os resultados foram analisados com relação ao controle viral (CV) pelo teste ANOVA/Dunnett e expressos como média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes. (\*)  $p < 0,001$ .



**Figura 27:** Efeito do composto 12 na inibição da propagação intercelular dos vírus HSV-1 (cepas KOS e 29R) e HSV-2 (cepa 333). Foram medidas as áreas de 20 placas de lise formadas pelos diferentes vírus na presença da amostra (0,025 a 0,5  $\mu\text{M}$ ). Os resultados foram analisados com relação ao controle viral (CV) pelo teste ANOVA/Dunnett e expressos como média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes. (\*)  $p < 0,05$ .



A análise destes resultados pode ser ambígua, pois um composto antiviral, ou seja, que é capaz de inibir a replicação viral e, conseqüentemente, diminuir o número de placas de lise formadas, pode também reduzir a área das placas de lise apenas por diminuir o número de vírus formados intracelularmente. Portanto, quanto menor o número de vírus, menor será sua capacidade de infecção e dispersão para as células. Por isso, para que se possa concluir que os compostos 4 e 12 afetam diretamente o processo de dispersão viral seria necessário a condução de experimentos mais específicos. Para tal, pode-se utilizar gamaglobulina humana, que irá prevenir o movimento dos vírus através do compartimento extracelular, ou seja, a dispersão viral ocorrerá apenas através das junções celulares, já que os vírus presentes no meio extracelular serão inativados pelos anticorpos adicionados ao meio de cultura (WISNER et al., 2000).

Porém, os resultados aqui obtidos são um indício de que este processo está sendo afetado pelos cardenólídeos testados, visto que o tratamento acarretou a redução do tamanho das placas de lise, até mesmo nas menores concentrações testadas.

Apesar do conhecimento de que os cardenólídeos afetam a replicação herpética (DODSON et al., 2007; HARTLEY et al., 2006; SU et al., 2008), pouco foi estudado em relação ao efeito destes compostos na transmissão intercelular dos HSV. Apenas o trabalho de Su e colaboradores (2008) relatou brevemente que os cardenólídeos por eles testados (digitoxina, digoxina, ouabaína octahidratada e G-estrofantina) reduziram o tamanho das placas de lise.

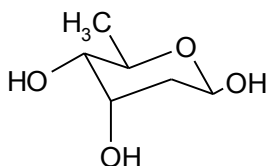
## **5.5 Avaliação da potencial atividade anti-ATPásica das amostras**

Alguns estudos já relataram a importância dos íons  $K^+$  (HARTLEY et al., 1993) e  $Na^+$  (HOFFMANN; PALESE; SHAW, 2008) para o processo de replicação viral.

Portanto, sabendo-se que os cardenólídeos são inibidores da bomba NKATPase e, conseqüentemente, reduzem a quantidade de íons  $K^+$  e aumentam as dos íons  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$ , foi necessário investigar a potencial atividade anti-ATPásica dos compostos 4 e 12, já que não há dados publicados a esse respeito.

Para a realização deste ensaio foi utilizado o kit ATPase/GTPase (Bioassay), como descrito no item 4.8.

Além dos compostos 4 e 12, foram utilizados os cardenolídeos digitoxina e digoxina (compostos 6 e 29, respectivamente) e suas agliconas: digitoxigenina e digoxigenina (compostos 1 e 28, respectivamente). Todos esses compostos inibem a bomba NKATPase (PULLEN; BROOKS; EDWARDS, 2004). Como controle negativo foi utilizado a D-(+)-digitoxose (Figura 28) que é um dos açúcares que pode se ligar à aglicona dos cardenolídeos, sem atividade anti-ATPásica e antiviral.



**Figura 28:** Estrutura química da D-(+)-digitoxose.

Foram testadas cinco concentrações de cada composto, partindo-se de 100  $\mu\text{M}$  e realizando-se uma diluição 1:10, tendo sido construídas as curvas dos percentuais de inibição de cada composto. Por fim, através da análise de regressão linear, foram calculados os valores de  $\text{CI}_{50}$ , ou seja, a concentração de cada amostra que inibiu 50% da atividade enzimática. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 7.

**Tabela 7:** Inibição da atividade da enzima ATPase ocasionada pelos cardenólídeos testados.

<b>Composto</b>	<b>CI<sub>50</sub> (µM)</b>
<b>1</b>	0,34±0,03
<b>4</b>	0,67±0,16
<b>6</b>	0,34±0,01
<b>12</b>	0,80±0,13
<b>28</b>	1,04±0,19
<b>29</b>	4,98±0,6
<b>Digitoxose (C-)</b>	<b>SA</b>

SA: sem atividade. Os valores obtidos representam a média ± desvio padrão de dois experimentos independentes. C- (controle negativo).

De acordo com os resultados obtidos, todos os compostos apresentaram atividade anti-ATPásica, em diferentes graus.

Os compostos testados mais ativos foram digitoxigenina (1), digitoxina (6) e o composto 4 (glucoevatromonosídeo), sendo que os compostos 4 e 6 (heterosídeos) possuem como aglicona a digitoxigenina (composto 1).

No outro grupo, os compostos com menor atividade foram digoxigenina (28), digoxina (29) e o composto 12 (digoxigenina-bisdigitoxosídeo); da mesma forma, os compostos 12 e 29 possuem como aglicona a digoxigenina (composto 28).

As diferenças detectadas em relação ao potencial de inibição da atividade anti-ATPásica pelos compostos 4 e 12 poderiam estar correlacionados com sua ação antiviral, pois o composto 4 é mais ativo do que o composto 12.

A inibição da bomba NKATPase também poderia justificar a possível inibição dos estágios de montagem e liberação dos vírions, visto que a energia utilizada para que estes processos ocorram pode ser obtida por esta enzima (NAGAI et al., 1972).

Di Cera (2006) relatou que várias enzimas, incluindo aquelas relacionadas à síntese proteica, requerem K<sup>+</sup> para sua ativação. Portanto, a inibição da síntese das proteínas virais, ocasionada pelos cardenólídeos testados, poderia ser explicada pela redução da concentração do K<sup>+</sup> no interior das células.

A importância do íon  $K^+$  para a replicação viral já havia sido comprovada pelo trabalho de Nagai e colaboradores (1972). Eles demonstraram que a ouabaina perdia sua capacidade de inibição da replicação do vírus Sendai quando o meio utilizado era suplementado com uma concentração de  $K^+$  5X maior que a concentração normal dos meios de cultura.

Em outro trabalho, o efeito de alguns cátions na replicação dos vírus herpéticos também foi investigado e foi demonstrado que cálcio, sódio e magnésio, quando adicionados, individualmente, em altas concentrações no meio de realização do experimento, não afetaram a replicação viral. Entretanto, quando as células não infectadas foram mantidas por 18 h, em um meio sem  $K^+$  e, após este período, foram infectadas com o HSV-1, não ocorreu a síntese do DNA viral. No entanto, quando estas mesmas células infectadas, na ausência de  $K^+$ , receberam meio de cultura suplementado com este íon, a síntese do DNA viral foi restabelecida aos níveis normais. Os autores enfatizaram que esta inibição da síntese do DNA poderia ter ocorrido pelos efeitos citotóxicos decorrentes da falta de  $K^+$ , mas em experimentos onde as células passaram por um processo de privação de  $K^+$  por 36 h antes da infecção, a replicação viral voltou a ocorrer em níveis usuais, após o restabelecimento das concentrações deste íon (HARTLEY et al., 1993).

O conjunto dos resultados sugere que a inibição da síntese das macromoléculas virais pelos cardenolídeos não é completa, devido à falta de  $K^+$  ocasionada pela inibição da bomba NKATPase, visto que a atividade antiviral é reversível caso a concentração de potássio seja restabelecida.

Além disso, a hipótese formulada no item 5.2.2 (p. 81) foi confirmada, pois com a comprovação de que os compostos 4 e 12 inibem a NKATPase, a ação antiviral dos cardenolídeos é, então, uma consequência da sua ação primária sobre o gradiente eletroquímico celular, levando a uma ação secundária, que é a inibição da replicação viral. Entretanto, a depleção do íon  $K^+$  altera o metabolismo celular, mas sem causar danos às mesmas (HARTLEY, 2009).

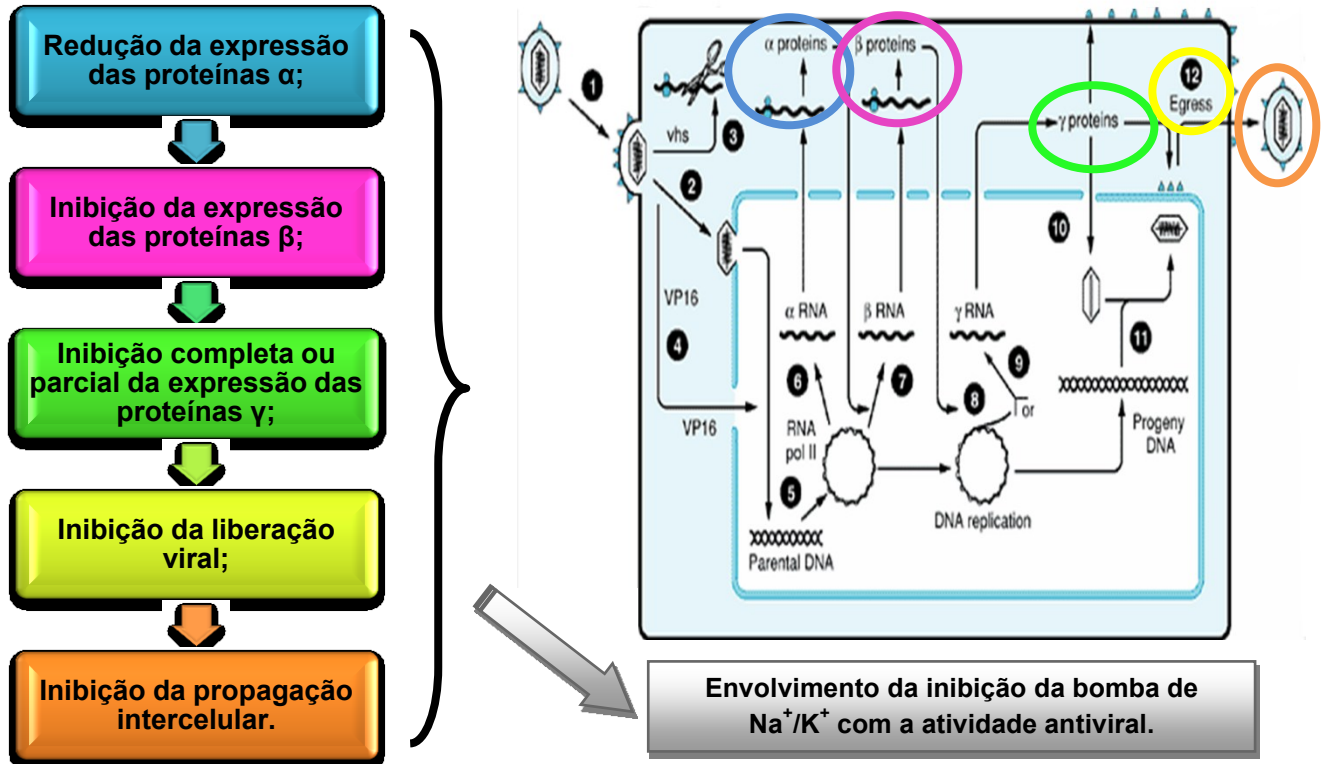
## **5.6 Proposta do mecanismo da ação anti-herpética dos compostos 4 e 12**

A partir dos resultados obtidos, foi proposto o mecanismo da ação anti-herpética dos cardenolídeos 4 e 12, frente ao HSV-1 (cepas KOS e 29R) e ao HSV-2 (cepa 333), como pode ser visualizado na Figura 29.

Como o mecanismo da ação anti-herpética foi similar para os dois cardenolídeos, frente às três cepas virais testadas, o esquema apresentado é representativo de todas elas e também dos dois compostos testados.

Seria importante salientar que, apesar da promissora ação anti-herpética detectada neste trabalho e em outros, publicados por diferentes grupos de pesquisadores, os cardenolídeos não podem ser considerados como potenciais candidatos a fármacos antivirais, por sua já reconhecida toxicidade oral em humanos (BARRUETO et al., 2003; RATES; BRIDI, 2003; SLIFMAN et al., 1998). No entanto, seu mecanismo de ação, principalmente, em relação ao controle dos teores intracelulares de potássio, é bastante interessante e poderia ser uma estratégia para a P&D de outros fármacos antivirais.

No entanto, pouco ainda se conhece sobre a absorção tópica dos cardenolídeos em geral, e esta abordagem já começou a ser investigada no nosso laboratório (CARVALHO, 2010-2012; SCNHEIDER, 2011), cujos resultados serão publicados oportunamente.



**Figura 29:** Proposta do mecanismo da ação anti-HSV-1 e anti-HSV-2 dos cardenólídeos glucoevatromonosídeo (4) e digoxigenina-bisdigitoxosídeo (12).



## 6 CONCLUSÕES

- ✓ As concentrações que apresentaram 50% de toxicidade ( $CC_{50}$ ) frente às células VERO e GMK AH1 foram, no geral, superiores as concentrações que apresentaram atividade antiviral ( $CI_{50}$ );
- ✓ Dos 65 cardenólídeos e derivados testados, os compostos 4 (glucoevatromonosídeo) e 12 (digoxigenina-bisdigitoxosídeo) apresentaram atividade antiviral promissora durante a triagem da atividade anti-HSV-1 (cepa KOS), com elevados valores de IS (2.107 e 645, respectivamente). Eles também apresentaram altos valores de IS quando foi investigada sua ação anti-HSV-1 (cepa 29R) e anti-HSV-2 (cepa 333), sendo que o composto 4 apresentou valores de IS de 4.566 e >6.944, respectivamente. O composto 12 apresentou IS de 792 em relação à atividade anti- HSV-1 (cepa 29R) e IS de 1.238 frente ao vírus HSV-2 (cepa 333). Portanto, eles foram selecionados para a realização do estudo do seu mecanismo de ação anti-herpética;
- ✓ A avaliação da atividade antiviral, dos compostos 4 e 12, na presença de concentrações virais elevadas, demonstrou que sua atividade inibitória viral foi mantida mesmo no maior MOI testado (0,4), que apresenta 1.000 partículas virais a mais que no MOI (0,0004) usado para a determinação dos valores de  $CI_{50}$ ;
- ✓ Os compostos 4 e 12 não apresentaram ação virucida direta;
- ✓ O pré-tratamento e o tratamento simultâneo com os compostos 4 e 12 não inibiram a replicação herpética, indicando que estes compostos não apresentam efeito profilático *in vitro* e nem atuam nos processos de entrada dos vírus (adsorção e penetração virais), respectivamente;



- ✓ Os tratamentos com os compostos 4 e 12, realizados após 1 h de infecção, quando os mesmos foram adicionados ou removidos, indicaram que eles mantêm sua atividade antiviral se adicionados até 12 h P.I. e, caso sejam removidos antes deste período, tal atividade diminui consideravelmente. Estes dados sugerem uma provável interferência na síntese proteica, já que o pré-tratamento e o tratamento simultâneo não resultaram em inibição viral;
- ✓ Na avaliação do efeito do composto 4 sobre a transcrição dos genes do HSV-1 (cepa KOS), este aparentemente não afetou esta etapa do ciclo de replicação viral. A expressão do RNAm referente à proteína celular  $\beta$ -actina não foi alterada;
- ✓ A suplementação do meio de cultura com KCl, durante os experimentos de RT-PCR, demonstrou que os íons  $K^+$  exercem papel fundamental no processo da replicação viral, pois quando este íon estava presente, juntamente com os compostos 4 e 12, a replicação viral foi restituída parcialmente;
- ✓ Na avaliação da interferência sobre a síntese proteica do HSV-1 (cepa KOS), os compostos 4 e 12 inibiram a expressão das proteínas  $U_{L42}$  ( $\beta$ ) e gB ( $\gamma$ ), além de reduzirem a expressão das proteínas ICP27 ( $\alpha$ ) e gD ( $\gamma$ ). A expressão da proteína celular  $\beta$ -actina não foi alterada;
- ✓ Os compostos 4 e 12 inibiram significativamente a liberação viral;
- ✓ Além de inibirem a liberação viral, os compostos 4 e 12 reduziram significativamente os títulos virais intracelulares, confirmando que houve inibição da replicação viral intracelular;
- ✓ A difusão intercelular viral foi inibida significativamente pelos compostos 4 e 12;

- ✓ Os compostos 4 e 12 apresentaram atividade anti-ATPásica, podendo indicar que na inibição do ciclo de replicação viral, houve alteração do gradiente eletroquímico celular.



## 7 PERSPECTIVAS

- ❖ Avaliar a integridade dos vírions após contato com os compostos 4 e 12 por microscopia eletrônica de varredura;
- ❖ Avaliar o efeito das amostras 4 e 12 na síntese do DNA viral em células VERO e GMK AH1, utilizando a técnica da PCR e iniciadores específicos;
- ❖ Reavaliar o efeito dos compostos 4 e 12 durante o processo de transcrição (mRNA) em células VERO e GMK AH1, 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 o possível sinergismo das amostras 4 e 12 com o aciclovir;
- ❖ Verificar o possível sinergismo com fármacos depletors de  $K^+$  intracelular;
- ❖ Avaliar a possível interferência dos compostos 4 e 12 na expressão das proteínas virais durante o ciclo de replicação do HSV-2 (cepa 333), utilizando o ensaio do *Western blotting*;
- ❖ Avaliar a possível interferência dos compostos 4 e 12 na expressão das proteínas US3 PK, UL31 e UL34, as quais estão envolvidas no processo de liberação viral, utilizando o ensaio do *Western blotting*;
- ❖ Avaliar a possível interferência dos compostos 4 e 12 na expressão das glicoproteínas gE e gI, as quais estão envolvidas no processo de dispersão radial, utilizando o ensaio do *Western blotting*;
- ❖ Avaliar a genotoxicidade dos compostos 4 e 12 em células VERO, através do ensaio do Cometa;

- ❖ Realizar o experimento de inibição da dispersão radial viral na presença de gamaglobulina humana;
- ❖ Avaliar a atividade citotóxica da série de cardenólídeos e derivados testados, através de ensaios antiproliferativos em células tumorais;
- ❖ Investigar o efeito da concentração dos íons  $K^+$  em células infectadas e não infectadas, e que foram tratadas com os compostos 4 e 12;
- ❖ Investigar o efeito da alteração da concentração do íon  $K^+$  no meio de cultura utilizado durante os experimentos de avaliação da atividade antiviral;
- ❖ Investigar a capacidade de reversibilidade da inibição da atividade antiviral quando o meio de cultura utilizado for suplementado com altas concentrações de  $K^+$ ;
- ❖ Avaliar os efeitos citotóxicos que a depleção de  $K^+$  poderá causar às células VERO e GMK AH1;
- ❖ Avaliar o efeito dos cardenólídeos sobre o funcionamento da NKCC.

## REFERÊNCIAS

- ABRANTES, J. L.; BARBOSA, J.; CAVALCANTI, D.; PEREIRA, R. C.; FONTES, C. F. L.; TEIXEIRA, V. L.; SOUZA, T. M. L.; PAÍXÃO, I. C. P. The effects of the diterpenes isolated from the brazilian brown algae *Dictyota pfaffii* and *Dictyota menstrualis* against the herpes simplex type-1 replicative cycle. **Planta Medica**, v. 76, p. 339-344, 2010.
- 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, p. 241-248, 2007.
- AMMENDOLIA, M. G.; MARCHETTI, M.; SUPERTI, F. Bovine lactoferrin prevents the entry and intercellular spread of herpes simplex virus type 1 in Green Monkey Kidney cells. **Antiviral Research**, v. 76, p. 252-262, 2007.
- BAGROV, A. Y.; SHAPIRO, J. I.; FEDOROVA, O. V. Endogenous cardiogenic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. **Pharmacological Reviews**, v. 61, p. 9-38, 2009.
- BARRUETO, F. J.; JORTANI, S. A.; VALDES, R. J.; HOFFMANN, R. S.; NELSON, L. S. Cardioactive steroid poisoning from an herbal cleansing preparation. **Toxicology**, v. 41, p. 396-399, 2003.
- 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, p. 11588-11597, 2005.
- BIELAWSKI, K.; WINNICKA, K.; BIELAWSKA, A. Inhibition of DNA topoisomerases I and II, and growth inhibition of breast cancer MCF-7 cells by ouabain, digoxin and proscillaridin. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 1493-1497, 2006.

## 150 Referências

BLACKISTON, D. J.; MCLAUGHLIN, K. A.; LEVIN, M. Bioelectric controls of cell proliferation: Ion channels, membrane voltage and the cell cycle. **Cell Cycle**, v. 8, p. 3527-3536, 2009.

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

BOHLIN, L.; GÖRANSSON, U.; ALSMARK, C.; WEDÉN, C.; BACKLUND, A. Natural products in modern life science. **Phytochemistry Reviews**, v., p. 1-23, 2010.

BRADFORD, M. 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, D. I. Treatment of herpes simplex virus infections. **Antiviral Research**, v. 61, p. 73-81, 2004.

BRASIL. *Bulário Eletrônico*. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2008. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/BularioEletronico>>. Acesso em: 14 de janeiro de 2011.

BULTMANN, H.; TEUTON, J.; BRANDT, C. R. Addition of a C-terminal cysteine ithe 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, p. 1596-1607, 2007.

BURLESON, F. G.; CHAMBERTS, T. M.; WIEDBRAUK, D. L. **Virology: A laboratory manual**. San Diego: Academic, 1992, p. 250.

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

BUTLER, M. S.; NEWMAN, D. J. Mother Nature's gifts to diseases of man: the impact of natural products on anti-infective, anticholesteremics and anticancer drug discovery. **Progress in Drug Research**, v. 65, p. 2-44, 2008.

CARVALHO, A. **Novas abordagens no estudo da ação anti-herpética de cardenolídeos. 2010-2012.** p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010-2012.

CELUM, C.; WALD, A.; HUGHES, J.; SANCHEZ, J.; REID, S.; DELANY-MORETWE, S.; COWAN, F.; CASAPIA, M.; ORTIZ, A.; FUCHS, J.; BUCHBINDER, S.; KOBLIN, B.; ZWERSKI, S.; ROSE, S.; WANG, J.; COREY, L. Effect of acyclovir on HIV-1 acquisition in herpes simplex virus 2 seropositive women and men who have sex men: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 371, p. 2109-2119, 2008.

CHALLAND, R.; YOUNG, R. J. **Antiviral Chemotherapy**. New York: Oxford University Press, 1998.

CHANDY, K. G.; DECOURSEY, T. E.; CAHALAN, M. D.; MCLAUGHLIN, C.; GUPTA, S. Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 160, p. 369-385, 1984.

CHIU, S. Y.; WILSON, G. F. The role of potassium channels in Schwann cell proliferation in Wallerian degeneration of explant rabbit sciatic nerves. **Journal of Physiology**, v. 408, p. 199-222, 1989.

COCCHI, F.; MENOTTI, L.; DUBREUIL, P.; LOPEZ, M.; CAMPADELLI, G. Cell-to-cell spread of wild-type herpes simplex virus type 1, but not of syncytial strains, is mediated by the



## 152 Referências

immunoglobulin-like receptors that mediate virion entry, nectin1 (PRR1/HveC/HlgR) and nectin2 (PRR2/HveB). **Journal of Virology**, v. 74, p. 3909-3917, 2000.

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: KNIFE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D.; LAMB, R.; MARTIN, M.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. **Fields Virology**. 5.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, p. 290-302, 2006.

DE CLERCQ, E. Antiviral chemotherapy in 2009: *quo vadis?* **Future Medicine**, v. 4, p. 313-315, 2009a.

DE CLERCQ, E. The history of antiretrovirals: key discoveries over the past 25 years. **Reviews in Medical Virology**, v. 19, p. 287-299, 2009b.

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, p. 177-185, 2000.

DENG, L.; DAI, P.; CIRO, A.; SMEE, D. F.; DJABALLAH, H.; SHUMAN, S. Identification of novel antipoxviral agents: Mitoxantrone inhibits vaccinia virus replication by blocking virion assembly. **Journal of Virology**, v. 81, p. 13392-13402, 2007.

DI CERA, E. A structural perspective on enzymes activated by monovalent cations. **JBC**, v. 281, p. 1305-1308, 2006.

DODSON, A. W.; TAYLOR, T. J.; KNIPE, D. M.; COEN, D. M. Inhibitors of the sodium potassium ATPase that impair herpes simplex virus replication identified via a chemical screening approach. **Virology**, v. 366, p. 340-348, 2007.

DOSTANIC-LARSON, I.; LORENZ, J. N.; VAN HUYSSSE, J. W.; NEUMANN, J. C.; MOSELEY, A. E.; LINGREL, J. B. Physiological role of the  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -isoforms of the  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase and biological significance of their cardiac glycoside binding site. **american Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, p. R524-R528, 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, p. 193-236, 2002.

EKBLAD, M.; ADAMIK, 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 Res.**, v. 86, p. 196-203, 2010.

ELION, G. B.; FURMAN, P. A.; FYFE, J. A.; MIRANDA, P.; BEAUCHAMP, L.; SCHAEFFER, H. J. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9- (2-hydroxyethoxymethyl) guanine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 12, p. 5716-5720, 1977.

ELLERMANN-ERIKSEN, S. Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus. **Virology Journal**, v. 2, p. 1-30, 2005.

EVANSA, S. M.; CASARTELLI, A.; HERREROSC, E.; MINNICKD, D. T.; DAYA, C.; GEORGEA, E.; WESTMORELANDA, C.

Development of a high throughput in vitro toxicity screen predictive of high acute in vivo toxic potential. **Toxicology in vitro**, v. 15, p. 579-584, 2001.

FLINT, S. J.; ENQUIST, L. W.; KRUG, R. M.; RACANIELLO, V. R.; SKALKA, A. M. **Principles of virology: molecular, biology, pathogenesis and control**. Washington: ASM, 2000. p. 662-714.

FRAMPTON JR, A. R.; GOINS, W. F.; NAKANO, K.; BURTON, E. A.; GLORIOSO, J. C. HSV trafficking and development of gene therapy vectors with applications in the nervous system. **Gene Therapy**, v. 12, p. 891-901, 2005.

FRESHNEY, I. **Culture of animal cells: A manual of basic technique**. 5.ed.: John Wiley & Sons, 2005.

GOLDSMITH, K.; CHEN, W.; JOHNSON, D. C.; HENDRICKS, R. L. Infected cell protein (ICP)47 enhances herpes simplex virus neurovirulence by blocking the CD8+ T cell response. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 187, p. 341-348, 1998.

GOTO, A.; ISHIGURO, T.; YAMADA, K.; ISHII, M.; YOSHIOKA, M.; EGUCHI, C.; SHIMORA, M.; SUGIMOTO, T. Isolation of a urinary digitalis-like factor indistinguishable from digoxin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 173, p. 1093-1101, 1990.

GU, B.; DELUCA, N. Requirements for activation of the herpes simplex virus glycoprotein C promoter in vitro by the viral regulatory protein ICP4. **Journal of Virology**, v. 68, p. 7953-7965, 1994.

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

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Genetic control of protein synthesis, cell function, and cell reproduction. In: GUYTON, A. C.; HALL, J. E.

**Textbook of Medical Physiology.** 11.ed. Philadelphia: Elseviers Saunders, 2006. p. 27-42.

HAEFELI, W. E.; SCHOENENBERGER, R. A.; WEISS, P.; RITZ, R. F. Acyclovir-induced neurotoxicity: concentration-side effect relationship in acyclovir overdose. **The American Journal of Medicine**, v. 94, p. 212-215, 1993.

HAMLYN, J. M.; BLAUSTEIN, M. P.; BOVA, S.; DUCHARME, D. W.; HARRIS, D. W.; MANDEL, F.; MATHEWS, W. R.; LUDENS, J. H. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 6259-6263, 1991.

HARDY, W. R.; SANDRI-GOLDIN, R. M. Herpes simplex virus inhibits host cell splicing, and regulatory protein ICP27 is required for this effect. **Journal of Virology**, v. 68, p. 7790-7799, 1994.

HARTLEY, C. **Treatment of DNA viral infections.** USA n. US 7,534,768 B2, December 17, 2004

HARTLEY, C.; HARTLEY, M.; PARDOE, I.; KNIGHT, A. Ionic Contra-Viral Therapy (ICVT); a new approach to the treatment of DNA virus infections. **Arch. Virol.**, v. 151, p. 2495-2501, 2006.

HARTLEY, C.; PARDOE, I. **Anti-viral topical gel formulations containing diuretic such as furosemide and/or a cardiac glycoside such as digoxin.** USA n. US 2008/0220066 A1, August 22, 2006.

HARTLEY, C. E.; BUCHAN, A.; RANDALL, S.; SKINNER, G. R.; OSBORNE, M.; TOMKINS, L. M. The effects of lithium and potassium on macromolecular synthesis in herpes simplex virus infected cells. **J. Gen. Virol.**, v. 74, p. 1519-1525, 1993.

HELDWEIN, E. E.; LOU, H.; BENDER, F. C.; COHEN, G. H.; EISENBERG, R. J.; HARRISON, S. C. Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. **Science**, v. 313, p. 217-220, 2006.

HILL, A.; JUGOVIC, P.; YORK, I.; RUSS, G.; BENNINK, J.; YEWDELL, J.; PLOEGH, H.; JOHNSON, D. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. **Nature**, v. 375, p. 411-415, 1995.

HOFFMANN, H. H.; PALESE, P.; SHAW, M. L. Modulation of influenza virus replication by alteration of sodium ion transport and protein kinase C activity. **Antiviral Res.**, v. 80, p. 124-134, 2008.

HONESS, R. W.; ROIZMAN, B. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis: sequential transition of polypeptide synthesis requires functional viral polypeptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, p. 1276-1280, 1975.

HORISBERGER, J.-D. Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. **Physiology**, v. 19, p. 377-387, 2004.

HUSSEIN, I. T. M.; MENASHY, R. V.; FIELD, H. J. Penciclovir is a potent inhibitor of feline herpesvirus-1 with susceptibility determined at the level of virus-encoded thymidine kinase. **Antiviral Res.**, v. 78, p. 268-274, 2008.

JOELS, M.; DE KLOET, E. R. Control of neuronal excitability by corticosteroid hormones. **Trends in Neurosciences**, v. 15, p. 25-30, 1992.

JOHANSSON, S.; LINDHOLM, P.; GULLBO, J.; LARSSON, R. Cytotoxicity of digitoxin and related cardiac glycosides in human tumor cells. **Anticancer Drugs**, v. 12, p. 475-483, 2001.

JOHNSON, D.; WEBB, M.; WISNER, T. W.; BRUNETTI, C. Herpes simplex virus gE/gI sorts nascent virions to epithelial cell junctions, promoting virus spread. **Journal of Virology**, v. 75, p. 821-833, 2001.

JOHNSON, P. A.; MACLEAN, C.; MARSDEN, H. S.; DALZIEL, R. G.; EVERETT, R. D. The product of gene US1 1 of herpes simplex virus type 1 is expressed as a true late gene **Journal of General Virology**, v. 67, p. 871-883, 1986.

JONES, C. Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p. 79-95, 2003.

KAOLA, I.; LANDIS, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? **Nature Reviews**, v. 3, p. 711-715, 2004.

KIMBERLIN, D. W.; COEN, D. M.; BIRON, K. K.; COHEN, J. I.; LAMB, R. A.; MCKINLAY, M.; EMINI, E. A.; WHITLEY, R. J. Molecular mechanisms of antiviral resistance. **Antiviral Research**, v. 26, p. 369-401, 1995.

KLEYMANN, G.; FISCHER, R.; BETZ, U. A. K.; HENDRIX, M.; BENDER, W.; SCHNEIDER, U.; HANDKE, G.; ECKENBERG, P.; HEWLETT, G.; PEVZNER, V.; BAUMEISTER, J.; WEBER, O.; HENNINGER, K.; KELDENICH, J.; JENSEN, A.; KOLB, J.; BACH, U.; POPP, A.; MABEN, J.; FRAPPA, I.; HAEBICH, D.; LOCKHOFF, O.; RÜBSAMEN-WAIGMANN, H. New helicase-primase inhibitors as drug candidates for the treatment of herpes simplex disease. **Nat. Med.**, v. 8, p. 392-398, 2002.

KOELLE, D. M.; COREY, L. Herpes Simplex: insights on pathogenesis and possible vaccines. **Annual Review of Medicine**, v. 59, p. 381-395, 2008.

KREIS, W.; HENSEL, A.; STUHLEMMER, U. Cardenolides biosynthesis in floxgove. **Planta Medica**, v. 64, p. 491-499, 1998.

KULIKOV, A.; EVA, A.; KIRCH, U.; BOLDYREV, A.; SCHEINER, B. G. Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, p. 1691-1702, 2007.

KWONG, A. D.; FRENKEL, N. The herpes simplex virus virion host shutoff function. **Journal of Virology**, v. 63, p. 4834-4839, 1989.

LIUM, E. K.; PANAGIOTIDIS, C. A.; WEN, X.; SILVERSTEIN, S. J. The NH<sub>2</sub> terminus of the herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0 contains a promoter-specific transcription activation domain. **Journal of Virology**, v. 72, p. 7785-7795, 1998.

LOPEZ-LAZARO, M.; PASTOR, N.; SAMI, S.; AZRAK, M. J. A.; AUSTIN, C. A.; CORTÉS, F. Digitoxin inhibits the growth of cancer cell lines at concentrations commonly found in cardiac patients. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1642-1645, 2005.

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.

MARCHETTI, M.; PISANI, S.; PIETROPAOLO, N.; SEGANTI, L.; NICOLETTI, R.; ORSI, N. Inhibition of herpes simplex virus infection by negative charged and neutral carbohydrate polymers. **Journal of Chemotherapy**, v. 7, p. 90-96, 1995.

MCMILLAN, T. N.; JOHNSON, D. C. Cytoplasmic domain of herpes simplex virus gE causes accumulation in the trans-Golgi network, a site of virus envelopment and sorting of virions to cell junctions. **Journal of Virology**, v. 75, p. 1928-1940, 2001.

MIJATOVIC, T.; QUAQUEBEKE, E. V.; DELEST, B.; DEBEIR, O.; DARRO, F.; KISS, R. Cardiotoxic steroids on the road to anti-cancer therapy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1176, p. 32-57, 2007.

MORI, I.; NISHIYAMA, Y. Herpes simplex virus and varicella-zoster virus: why do these human alphaherpes viruses behave so differently from one another? **Reviews in Medical Virology**, v. 15, p. 393-406, 2005.

NAGAI, Y.; MAENO, K.; IINUMA, M.; YOSHIDA, T.; MATSUMOTO, T. Inhibition of virus growth by ouabain: effect of ouabain on the growth of HVJ in chick embryo cells. **J. Virol.**, v. 9, p. 234-243, 1972.

NARAYANAN, A.; NOGUEIRA, M. L.; RUYECHAN, W. T.; KRISTIE, T. M. Combinatorial transcription of HSV and VZV IE genes is strictly determined by the cellular coactivator HCF-1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 1369-1375, 2005.

NICOLA, A. V.; STRAUS, S. E. Cellular and viral requirements for rapid endocytic entry of herpes simplex virus. **Journal of Virology**, v. 78, p. 7508-7517, 2004.

NYBERG, K.; EKBLAD, M.; BERGSTROM, 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 Res.**, v. 63, p. 15-24, 2004.

ORMROD, D.; SCOTT, L. J.; PERRY, C. M. Valaciclovir: a review of its long term utility in the management of genital herpes simplex virus and cytomegalovirus infections. **Drugs**, v. 59, p. 839-863, 2000.

ORR, C. W.; YOSHIKAWA-FUKADA, M.; EBERT, J. D. Potassium: effect on DNA synthesis and multiplication of baby-hamster kidney cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 69, p. 243-247, 1972.

PERNG, G.-C.; JONES, C. Towards an understanding of the herpes simplex virus type 1 latency-reactivation cycle. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2010, p. 1-18, 2010.



PRASSAS, I.; DIAMANDIS, E. P. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. **Nature**, v. 7, p. 926-935, 2008.

PRICE, M.; LEE, S. C.; DEUTSCH, C. Charybdotoxin inhibits proliferation and interleukin 2 production in human peripheral blood lymphocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, p. 10171-10175, 1989.

PULLEN, M. A.; BROOKS, D. P.; EDWARDS, R. M. Characterization of the neutralizing activity of digoxin-specific Fab toward ouabain-like steroids. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 310, p. 319-325, 2004.

QAZZAZ, H. M. A. M.; CAO, Z.; BOLANOWSKI, D. D.; CLARK, B. J.; VALDES, R. J. *De Novo* biosynthesis and radiolabeling of mammalian digitalis-like factors. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 612-620, 2004.

RAGHAVENDRA, P. B.; SREENIVASAN, Y.; RAMESH, G. T.; MANNA, S. K. Cardiac glycoside induces cell death via FasL by activating calcineurin and NF-AT, but apoptosis initially proceeds through activation of caspases. **Apoptosis**, v. 12, p. 307-318, 2007.

RAHIMTOOLA, S. H.; TAK, T. The use of digitalis in heart failure. **Current Problems in Cardiology**, v. 21, p. 781-853, 1996.

RATES, S. M. K.; BRIDI, R. Heterosídeos cardioativos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFGRS / Ed. da UFSC, 2003. p. 685-710.

REZUCHOVÁ, I.; KÚDELOVÁ, M.; DURMANOVÁ, V.; VOJVODOVÁ, A.; KOSOVCKÝ, J.; RAJCÁNI, J. Transcription at early stages of Herpes Simplex Virus 1 infection and during reactivation. **Intervirolgy**, v. 46, p. 25-34, 2003.

RICE, S. A.; LONG, M. C.; LAM, V.; SCHAFFER, P. A.; SPENCER, C. A. Herpes simplex virus immediate-early protein ICP22 is required for viral modification of host RNA polymerase II and establishment of the normal viral transcription program. **Journal of Virology**, v. 69, p. 5550-5559, 1995.

ROIZMAN, B.; KNIPE, D.; WHITLEY, R. Herpes simplex viruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D.; LAMB, R.; MARTIN, M.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. **Fields Virology**. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins., 2007. p. 2502–2601.

ROLLER, R. J.; RAUCH, D. Herpesvirus entry mediator HVEM mediates cell-cell spread in BHK(TK2) cell clones. **Journal of Virology**, v. 72, p. 1411-147, 1998.

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.

RUSSEL, J. M. Sodium-potassium-chloride cotransport. **Physiol. Rev.**, v. 80, p. 211-276, 2000.

SAKDARAT, S.; SHUYPRON, A.; PIENTONG, C.; EKALAKSANANAN, T.; THONGCHAI, S. Bioactive constituents from the leaves of *Clinacanthus nutans* Lindau. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 1857-1860, 2009.

SCHANG, L. M.; PHILLIPS, J.; SCHAFFER, P. A. Requirement for cellular cyclin-dependent kinases in herpes simplex virus replication and transcription. **Journal of Virology**, v. 72, p. 5626-5637, 1998.

SCHANG, L. M.; ROSENBERG, A.; SCHAFFER, P. A. Transcription of herpes simplex virus immediate-early and early genes is inhibited by roscovitine, an inhibitor specific for cellular cyclin-dependent kinases. **Journal of Virology**, v. 73, p. 2161-2172, 1999.

SCNHEIDER, N. F. Z. **Padronização do ensaio PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeation Assay*) - Avaliação *in vitro* da permeabilidade intestinal e cutânea de compostos de origem natural e sintética.** 2011. 110 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

SLIFMAN, N.; OBERMEYER, W. R.; ALOI, B. K.; MUSSER, S. M.; CORREL, W. A.; CICHOWICZ, S. M.; BETZ, J. M.; LOVE, L. A. Contamination of botanical dietary supplements by *Digitalis lanata*. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, p. 806-811, 1998.

SMITH, J. A.; MARTIN, L. Do cells cycle? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, p. 1263-1267, 1973.

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, p. 499-501, 2005.

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

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

STEINER, I.; KENNEDY, P. G.; PACHNER, A. R. The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster. **Lancet Neurology**, v. 6, n. 11, p. 1015-1028, 2007.

STEVENS, J. G.; COOK, M. L. Latent infections induced by herpes simplex viruses. **Cancer Research**, v. 33, p. 1399-1401, 1973.

STEVENS, J. G.; WAGNER, E. K.; DEVI-RAO, G. B.; COOK, M. L.; FELDMAN, L. T. RNA complementary to a herpesvirus alpha gene

mRNA is prominent in latently infected neurons. **Science**, v. 235, p. 1056-1059, 1987.

STRASFELD, L.; CHOU, S. Antiviral drug resistance: mechanisms and clinical implications. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 24, p. 809-833, 2010.

SU, C. T.; HSU, J. T.; 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 Res.**, v. 79, p. 62-70, Jul 2008.

TAL-SINGER, R.; LASNER, T. M.; PODRZUCKI, W.; SKOKOTAS, A.; LEARY, J. J.; BERGER, S. L.; FRASER, N. W. Gene expression during reactivation of herpes simplex virus type 1 from latency in the peripheral nervous system is different from that during lytic infection of tissue cultures. **J. Virol.**, v. 71, p. 5268-5276, 1997.

TALARICO, L. B.; DAMONTE, E. B. Interference in dengue virus adsorption and uncoating by carrageenans. **Virology**, v. 363, p. 473-485, 2007.

TASKOVA, R. M.; GOTFREDSEN, C. H.; JENSEN, S. R. Chemotaxonomic markers in Digitalideae (Plantaginaceae). **Phytochemistry**, v. 66, p. 1440-1447, 2005.

TOMITA, Y.; KUWATA, T. Suppression of murine leukaemia virus production by ouabain and interferon in mouse cells. **Journal of General Virology**, v. 38, p. 223-230, 1978.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8.ed. São Paulo: Atrmed, 2008.

TYMIAK, A. A.; NORMAN, J. A.; BOLGAR, M.; DIDONATO, G.; LEE, H.; PARKER, W. L.; LO, L. C.; BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; HABER, E.; HAUPERT, G. T. Physico-chemical characterization of a

ouabain isomer isolated from bovine hypothalamus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 8189-8193, 1993.

VAN DE PERRE, P.; SEGONDY, M.; FOULONGNE, V.; OUEDRAOGO, A.; KONATE, I.; HURAU, J.; MAYAUD, P.; NAGOT, N. Herpes simplex vírus and HIV-1: deciphering viral synergy. **Lancet Infectious Diseases**, v. 8, p. 490-497, 2008.

VAN GENDEREN, I. L.; BRANDIMARTI, R.; TORRISI, M. R.; CAMPADELLI, G.; VAN MEER, G. The phospholipid composition of extracellular herpes simplex virions differs from that of host cell nuclei. **Virology**, v. 200, p. 831-836, 1994.

VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J.; VAN HOOF, L. Plant products as potential antiviral agents. **Bulletin de l'Institut Pasteur**, v. 84, p. 101-105, 1986.

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

WAGSTAFF, A. J.; FAULDS, D.; GOA, K. L. Aciclovir. A reappraisal of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. **Drugs**, v. 47, p. 153-205, 1994.

WATANABE, D. Medical application of herpes simplex virus. **Journal of Dermatological Science**, v. 57, p. 75-82, 2010.

WHITE, D. O.; FENNER, F. J. **Medical Virology**. 4.ed. San Diego: Academic, 1994, p. 318-346.

WHITLEY, R. J.; ROIZMAN, B. Herpes simplex virus infections. **Lancet**, v. 357, p. 1513-1518, 2001.

WILSON, G. F.; CHIU, S. Y. Mitogenic factors regulate ion channels in Schwann cells cultured from newborn rat sciatic nerve. **Journal of Physiology**, v. 470, p. 501-520, 1993.

WISNER, T.; BRUNETTI, C.; DINGWELL, K.; JOHNSON, D. C. The extracellular domain of herpes simplex virus gE is sufficient for accumulation at cell junctions but not for cell-to-cell spread. **Journal of Virology**, v. 74, p. 2278-2287, 2000.

WISNER, T. W.; JOHNSON, D. C. Redistribution of cellular and herpes simplex virus proteins from the trans-golgi network to cell junctions without enveloped capsids. **Journal of Virology**, v. 78, p. 11519-11535, 2004.

WYSOCKA, J.; HERR, W. The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, p. 294-304, 2003.

YE, G. J.; VAUGHAN, K. T.; VALLEE, R. B.; ROIZMAN, B. The herpes simplex virus 1 U(L)34 protein interacts with a cytoplasmic dynein intermediate chain and targets nuclear membrane. **Journal of Virology**, v. 74, p. 1355-1363, 2000.