



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LEANDRO MARTIN PAULINO

**ATIVIDADE ANTIVIRAL *IN VITRO* DA CATEQUINA SOBRE
O VÍRUS HERPES SIMPLES**

LEANDRO MARTIN PAULINO

**ATIVIDADE ANTIVIRAL *IN VITRO* DA CATEQUINA SOBRE
O VÍRUS HERPES SIMPLES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr^o Celso Vataru Nakamura

Coorientadora: Prof^a Dr^a Tania Ueda Nakamura

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

L437 Martin, Leandro Martin.
Atividade antiviral in vitro da Catequina sobre o vírus Herpes Simples / Leandro Martin Martin. - Londrina, 2020.
41 f. : il.

Orientador: Celso Vataru Nakamura.
Coorientador: Tania Ueda-Nakamura.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Atividade antiviral - Tese. 2. Herpes simples - Tese. 3. Catequina - Tese. 4. Microscopia Eletrônica - Tese. I. Vataru Nakamura, Celso . II. Ueda-Nakamura, Tania. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

CDU 579

LEANDRO MARTIN PAULINO

**ATIVIDADE ANTIVIRAL *IN VITRO* DA CATEQUINA SOBRE
O VÍRUS HERPES SIMPLES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Prof^a. Dr^a. Erica Benassi Zanqueta Centro
Universitário Metropolitano de Maringá – UEM

Prof^a Dr^a Ligia Carla Faccin Galhardi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 28 de fevereiro de 2020

AGRADECIMENTOS

A minha família, por todo apoio e incentivo neste período. Sem vocês, nada disso seria possível.

Ao Prof^o Dr^o Celso Vataru Nakamura e Prof^a Dr^a Tania Ueda-Nakamura pela oportunidade de orientação e por compartilharem seus conhecimentos para a execução deste trabalho.

As doutorandas Dyenefer Pereira e Thalita Zago pela orientação na execução dos experimentos de citotoxicidade e ensaios de atividade antiviral.

Aos técnicos do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP - UEM), Danielle Bidóia, César Lancheros e Versi Junior pelas orientações e auxílios no processamento de amostras e análises em Microscópio Eletrônico.

A Banca avaliadora, pelas recomendações valiosas acrescentadas a esta dissertação. A Capes e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota“.

(Madre Teresa de Calcutá)

PAULINO, Leandro Martin. **Atividade antiviral *in vitro* da catequina sobre o vírus Herpes Simples.** 2020. 42 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

O vírus Herpes simples tipo 1 (HSV-1) é um dos patógenos mais comuns entre os seres humanos e está principalmente relacionado a infecções orofaciais e genitais. O tratamento para as infecções causadas pelo vírus herpes simples utilizam análogos de nucleosídeos, como o aciclovir. No entanto, a busca de novas moléculas com atividade antiherpética torna-se importante devido à seleção de cepas virais resistentes aos medicamentos utilizados na clínica e aos efeitos adversos associados com os fármacos disponíveis. Neste sentido, a catequina, um metabólito secundário de um grande número de espécies vegetais e que possui propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antialérgicas e antimutagênicas, apresenta-se como molécula promissora. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antiviral do Hidrato de Catequina (HC) sobre o vírus Herpes simples tipo 1 (cepa KOS) e determinar o mecanismo de ação sobre as partículas virais. O HC apresentou CC50 de 855.5 μM e EC50 de 11.6 μM . Adicionalmente, verificou-se que o composto não apresenta atividade profilática, mas atua principalmente nas fases de adsorção e penetração viral, assim como possui atividade virucida, inibindo a disseminação entre células adjacentes. Análises por microscopia eletrônica demonstraram ainda que o tratamento com HC tem a capacidade de promover alterações morfológicas, principalmente na estrutura do envelope viral.

Palavras-chave: atividade antiviral; catequina; microscopia eletrônica; vírus herpes simples tipo 1.

PAULINO, Leandro Martin. **In vitro antiviral activity of catechin against Herpes Simplex virus**. 2020. 42 p. Dissertation (Master's degree in Microbiology) – State University of Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

The Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1) is one of the most common pathogens among humans and is mainly related to orofacial and genital infections. Treatment for infections caused by the Herpes simplex virus uses nucleoside analogues, such as acyclovir. However, the search for new molecules with anti-herpetic activity becomes important due to the selection of viral strains resistant to the drugs used in the clinic and the adverse effects associated with the available drugs. In this sense, catechin, a secondary metabolite of a large number of plant species and which has antioxidant, anti-inflammatory, antiallergic and antimutagenic properties, presents itself as a promising molecule. The aim of this study was to evaluate the antiviral activity of Catechin Hydrate (CH) on Herpes Simplex Virus type 1 (KOS strain) and to determine the mechanism of action on viral particles. The CH presented CC₅₀ of 855.5 μ M and EC₅₀ of 11.6 μ M. Additionally, it was found that the compound does not show prophylactic activity but acts mainly in the phases of viral adsorption and penetration, as well as having virucidal activity, inhibiting the spread between adjacent cells. Analyzes by electron microscopy also demonstrated that treatment with CH has the ability to promote morphological changes, mainly in the structure of the viral envelope.

Key-words: antiviral activity; catechin; electron microscopy; herpes simplex virus type 1.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Representação esquemática da estrutura do Vírus Herpes Simples.....	12
FIGURA 2 – Micrografia do vírus Herpes simples por Microscopia Eletrônica de Transmissão	13
FIGURA 3 – Ciclo replicativo do vírus Herpes Simples.....	15
FIGURA 4 – Propostas do processo de liberação do nucleocapsídeo na célula hospedeira.	17
FIGURA 5 – Manifestações clínicas da infecção pelo vírus Herpes Simples.....	18
FIGURA 6 – Representação do estabelecimento do estado de latência e reestabelecimento da infecção produtiva	19
FIGURA 7 – Mecanismo de ação do Aciclovir.....	20

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Percentual
>	Maior
°C	Graus Celsius
μM	Micromolar
Alfa – TIF	<i>alfa-trans-inducing factor</i>
ACV	Aciclovir
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
CC50	Concentração citotóxica para 50% das células
DMEM	<i>Dulbecco's Modified EagleMedium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC50	Concentração efetiva em 50 %
IS	Índice de seletividade
HSV	Virus Herpes Simples
LATs	Transcritos associados à latência
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	Brometo de 3- [4,5-dimetil-tiazol-1-il] -2,5-difenil tetrazólio
PBS	Tampão PBS (do inglês, <i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
RNA_m	RNA mensageiro
STEM	Microscopia eletrônica de varredura por transmissão
SBF	Soro Bovino Fetal
UFP	Unidades formadoras de placas
VHS	<i>Virion host shut-off</i>

SUMARIO

1.	INTRODUÇÃO	10
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1.	VÍRUS HERPES SIMPLES	11
2.1.1.	Classificação.....	11
2.1.2.	Morfologia.....	12
2.1.3.	Transmissão.....	14
2.1.4.	Ciclo Replicativo	14
2.1.5.	Manifestações Clínicas.....	16
2.1.6.	Latência	17
2.1.7.	Tratamento.....	18
2.1.8.	Compostos Com Potencial Atividade Antiviral	19
3.	OBJETIVOS	22
3.1.	OBJETIVO GERAL	22
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4.	REFERÊNCIAS	23
5.	ARTIGO: ANTIVIRAL ACTIVITY OF CATECHIN HYDRATE AGAINST HERPES SIMPLEX VÍRUS TYPE 1	27
6.	CONCLUSÃO	36

1. Introdução

Vírus são partículas nucleoprotéicas metabolicamente inertes, acelulares e ultramicroscópicas. Desta forma, se caracterizam como parasitas intracelulares obrigatórios, utilizando as organelas e a atividade metabólica de uma célula hospedeira para a síntese de moléculas essenciais em sua replicação (CHATTOPADHYAY & NALK, 2007; TORTORA et.al., 2017).

Devido à variação genética entre as cepas virais, da variabilidade no modo de transmissão, eficiência na replicação e habilidade de persistir no hospedeiro, os vírus se adaptaram a diferentes formas de vida e ocuparam numerosos nichos ecológicos, resultando em doenças em humanos, animais e plantas (CHATTOPADHYAY & NALK, 2007). Atualmente, existe um número considerável de vírus que provocam doenças ao ser humano, causando desde um simples resfriado até doenças graves que podem ser letais (MURRAY, 2014).

Infecções derivadas do vírus Herpes Simples são muito comuns no ser humano, estando relacionados a lesões orais, faríngeas, faciais, oculares e genitais. As manifestações clínicas associadas às suas infecções são geralmente benignas à moderadas, contudo em casos de pacientes imunocomprometidos e de neonatos, as infecções herpéticas podem provocar complicações graves, podendo em última instância ser fatais (WHITLEY & ROIZMAN, 2001; SANTOS, ROMANOS & WIGG, 2015).

Os tratamentos para as infecções causadas pelo vírus Herpes simples utilizam análogos de nucleosídeos, como por exemplo, o aciclovir (ACV). Embora o ACV e os outros medicamentos tenham sido aprovados para uso terapêutico, a busca efetiva de novos medicamentos torna-se importante devido a seleção de cepas virais resistentes aos medicamentos utilizados na clínica e aos efeitos adversos associados com os fármacos disponíveis (FIELD & BIRON, 1994; BRADY & BERNSTEIN, 2004; YARMOLINSKY et al., 2010).

A pesquisa por novas substâncias com propriedades antivirais visa identificar moléculas que apresentem diferentes mecanismos de ação, com o intuito de substituir ou complementar o uso dos fármacos atualmente utilizados (LOPES et al., 2013). Nesse sentido, a catequina, flavonóide que se caracteriza como um metabólito secundário de um grande número de espécies vegetais, apresenta-se como molécula promissora contra o HSV-1.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Vírus Herpes Simples (HSV)

2.1.1 Classificação

De acordo com a revisão atualizada do ICTV (*International Committee on Taxonomy of Virus*) no ano de 2018, o vírus Herpes Simples tipo 1 (HSV-1) pertence a ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *Alfaherpesvirinae* e gênero *Simplex virus*.

A ordem *Herpesvirales* é constituída por 3 famílias: *Herpesviridae*, compreendendo os herpesvírus de mamíferos, pássaros e répteis; *Alloherpesviridae*, incluindo vírus de peixes e anfíbios e *Malacoherpesviridae*, abrangendo os herpesvírus de moluscos (FLINT, 2007; DAVISON, 2010).

As espécies da família *Herpesviridae* codificam enzimas envolvidas na replicação viral (timidina-quinase, timidilato-sintetase, ribonucleotídeo-redutase), na síntese do ácido nucleico viral (DNA polimerase, helicase, primase) e no processamento das proteínas virais (proteína-quinase), assim como estão associadas com infecções persistentes e latentes (GELLER et al., 2012; SANTOS, ROMANOS & WIGG, 2015).

A família *Herpesviridae* é dividida em três subfamílias, de acordo com as propriedades biológicas e filogenéticas. As subfamílias são: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*. Dentre os vírus da família *Herpesviridae*, nove espécies estão associadas a infecções humanas. Dentre elas, o Alfaherpesvirus humano 1 (vírus herpes simples tipo 1), Alfaherpesvirus humano 2 (vírus herpes simples tipo 2), Alfaherpesvirus humano 3 (VZV ou vírus varicella-zoster), Gamaaherpesvirus humano 4 (EBV ou vírus Epstein-Barr), Betaherpesvirus humano 5 (HCMV ou citomegalovírus humano), Betaherpesvirus humano 6A (herpesvirus humano 6, variante A), Betaherpesvirus humano 6B (herpesvirus humano 6, variante B), Betaherpesvirus humano 7 (herpesvirus humano 7) e Betaherpesvirus humano 8 (herpesvirus associado ao Sarcoma de Kaposi) (WHITLEY & ROIZMAN, 2001; SANTOS, ROMANOS & WIGG, 2015; ICTV, 2018).

O gênero *Simplexvirus* é representado por duas espécies: Herpes simples tipo 1 (HSV-1) e Herpes simples tipo 2 (HSV-2), diferenciadas entre si por sua antigenicidade, por uma de suas glicoproteínas de superfície gC (*glycoprotein C*) e pela predileção de topografia anatômica de infecção (ZUCKERMAN et al. 2004; DAVISON, 2007).

2.1.2 Morfologia

O vírus Herpes simples - tipo 1 (HSV-1) apresenta-se como uma partícula esférica com diâmetro aproximado de 186 nm, que pode chegar a 225 nm incluindo as espículas do envelope (Figura 1 e Figura 2). A partícula viral consiste em três elementos estruturais: um nucleocapsídeo contendo o genoma; o envelope, que consiste em uma bicamada lipídica com glicoproteínas inseridas e uma região protéica, entre o capsídeo e o envelope, chamada de tegumento (ARDUINO & PORTER, 2008; SANTOS, ROMANOS & WIGG, 2015).

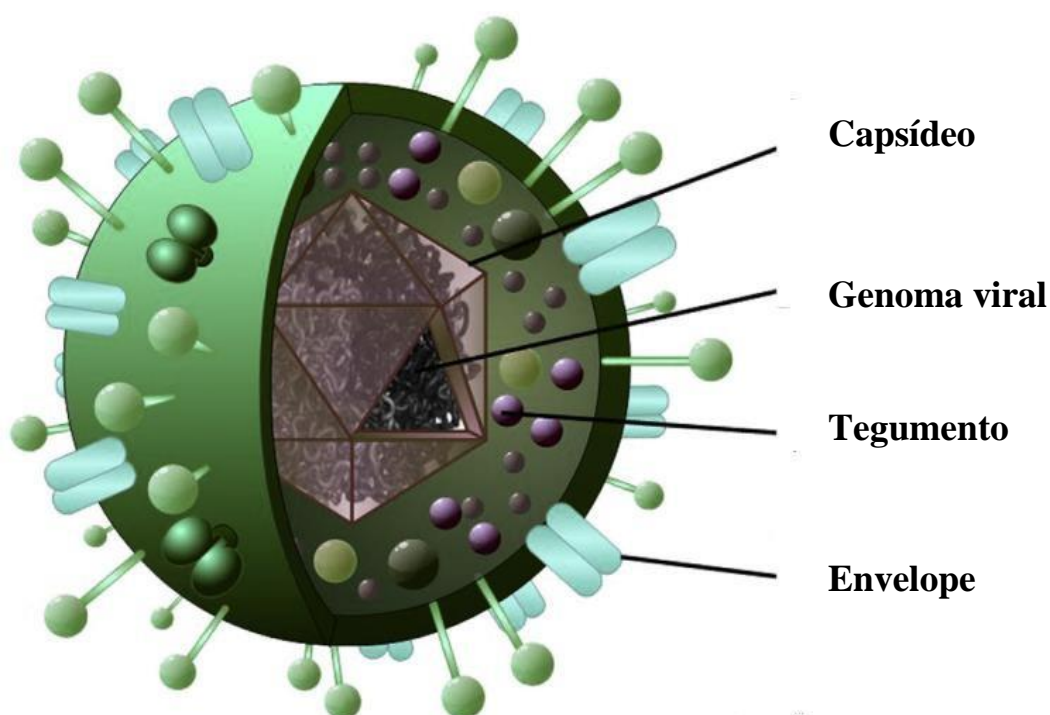


Figura 1. Representação esquemática da estrutura do Vírus Herpes Simples. **Fonte:** Adaptado de BAEZ et al. (2018).

O genoma do virion é constituído de DNA de dupla fita linear, apresenta massa molecular aproximada de 150 kbp e possui pelo menos 84 sequências abertas de leitura que codificam aproximadamente 100 proteínas estruturais e não estruturais necessárias a replicação viral (ROIZMAN et al., 2007).

O capsídeo é constituído por 162 capsômeros, sendo 150 hexaméricos e 12 pentaméricos. A parte mais externa do capsídeo é composta por quatro proteínas principais: a UL19 (VP5) que é a maior proteína do capsídeo, a UL35 (VP26), caracterizada como uma proteína acessória, e as proteínas UL18 (VP23) e a UL38 (VP19c), que exibem funções ainda desconhecidas. O capsídeo é constituído por mais duas proteínas, a U_L6 e a VP24 (U_L26), que estão relacionadas com o processo de encapsidação do DNA (ROIZMAN et al., 2007).

O envelope é constituído de uma bicamada lipídica, formada pela membrana celular durante a saída do vírus da célula. Esta estrutura está associada com 5 proteínas: UL20, UL43, UL45, UL49A e Us9, e 11 glicoproteínas: UL1 (gL), UL10 (gM), UL22 (gH), UL27 (gB), UL44 (gC), UL53 (gK), Us4 (gG), Us5 (gJ), Us6 (gD), Us7 (gI) e Us8 (gE). As glicoproteínas são essenciais na interação com os receptores da célula hospedeira, sendo determinantes no processo de entrada do vírus na célula no início da infecção. As glicoproteínas B (gB), gC, gD, gH e gL são essenciais nas etapas de adsorção, fusão com a membrana celular e internalização do vírus (METTENLEITER, 2006).

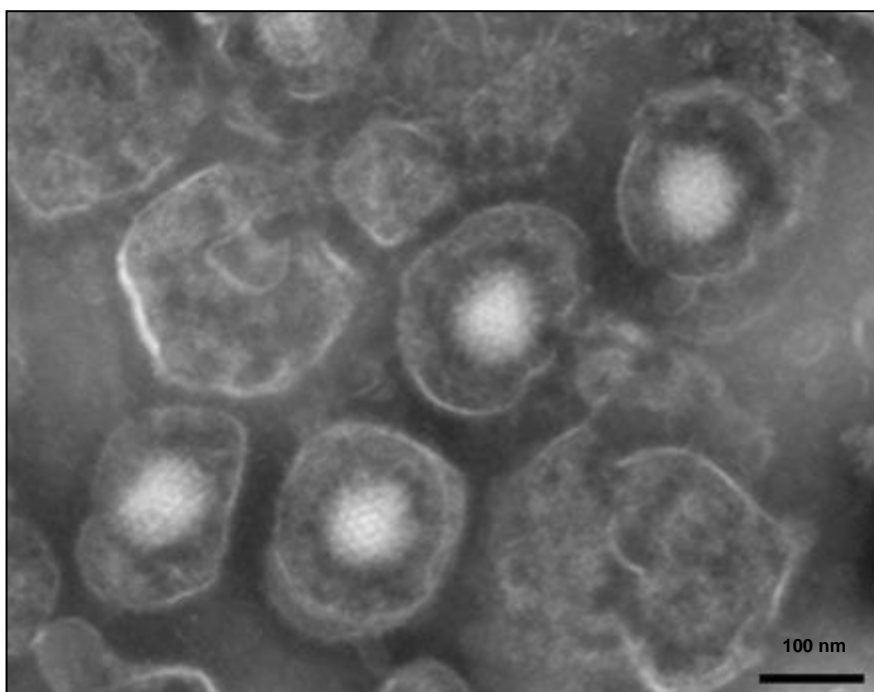


Figura 2. Micrografia do vírus Herpes simples por Microscopia Eletrônica de Transmissão. Magnificação: 100 000x. **Fonte:** GOLDSMITH & MILLER (2009).

O tegumento encontra-se entre o capsídeo e o envelope e se caracteriza como uma estrutura amorfa contendo 22 proteínas (METTENLEITER, 2006). As principais proteínas constituintes são: VHS (*host shut-off protein* ou VP22), relacionada com a regulação da transcrição de genes da célula hospedeira e a disseminação viral célula-a-célula durante a infecção; e a α -TIF (α -*trans-inducing fator*): também chamada VP16, envolvida na regulação da transcrição de genes precoces imediatos (ROIZMAN et al., 2007; SANTOS, ROMANOS & WIGG, 2015).

2.1.3 Transmissão

O vírus é transmitido entre indivíduos principalmente pela exposição direta de mucosas e/ou pele lesionada às secreções mucosas de um indivíduo com infecção recorrente. A transmissão pode ocorrer também a partir da exposição às secreções mucocutâneas de uma pessoa assintomática secretando o vírus na ausência da doença clínica (NADELMAN & NEWCOMER, 2000; SCIUBBA, 2003).

O período de incubação do vírus na infecção primária varia de 1-28 dias. Os anticorpos neutralizantes aparecem entre 4 - 7 dias após o início da doença e tem seu pico após aproximadamente 3 semanas (WHITLEY & ROIZMAN, 2001).

2.1.4 Ciclo Replicativo

A replicação do HSV-1 se inicia com a adsorção da partícula viral à célula hospedeira através da interação de regiões ricas em glicosaminoglicanas do sulfato de heparana encontradas na superfície celular com as glicoproteínas virais gB e gC (RESKE et al., 2007; AKHTAR & SHUKLA, 2009). Em seguida, a glicoproteína viral gD interage com os receptores celulares, alterando sua conformação (CAMPADDELLI-FIUME et al., 2012) (Figura 3).

Esta interação das glicoproteínas virais com os receptores celulares promove a fusão do envelope do vírus com a membrana plasmática da célula hospedeira (RESKE et al., 2007; AKHTAR & SHUKLA, 2009). Após a fusão, os componentes da partícula viral são interiorizados pela célula hospedeira. As proteínas do tegumento podem permanecer no citoplasma, como a proteína virus *host shutoff* (VHS), que inibe a tradução dos RNAs mensageiros (RNAm) da célula hospedeira, ou podem ser transportadas para o núcleo, como é o caso da proteína fator alfa trans-Indutor (VP16/alfa-TIF), que regula a transcrição dos genes α . E em uma terceira situação, as proteínas podem permanecer associadas ao capsídeo (AKHTAR & SHUKLA, 2009).

Após entrar na célula, o nucleocapsídeo é transportado ao poro nuclear, onde o genoma viral é liberado e o capsídeo vazio é deixado no citoplasma. Esse transporte é realizado pelo citoesqueleto, através da interação da proteína do tegumento U_L34 com a dineína celular. Como consequência, o DNA viral é alterado de sua forma linear de fita dupla para a forma circular. (HELDWEIN & KRUMMENACHER, 2008; KELLY et al., 2009).

As proteínas do tegumento VP16 e VHS acompanham o material genético na entrada no núcleo da célula hospedeira. A VP16, associada às proteínas celulares Oct- 1 e HCF-111

promovem a transcrição viral (NARAYANAN et al., 2005; ROIZMAN et al., 2007). No entanto, a proteína *VHS* promove a degradação do RNA celular e viral (WHITLEY & ROIZMAN, 2001).

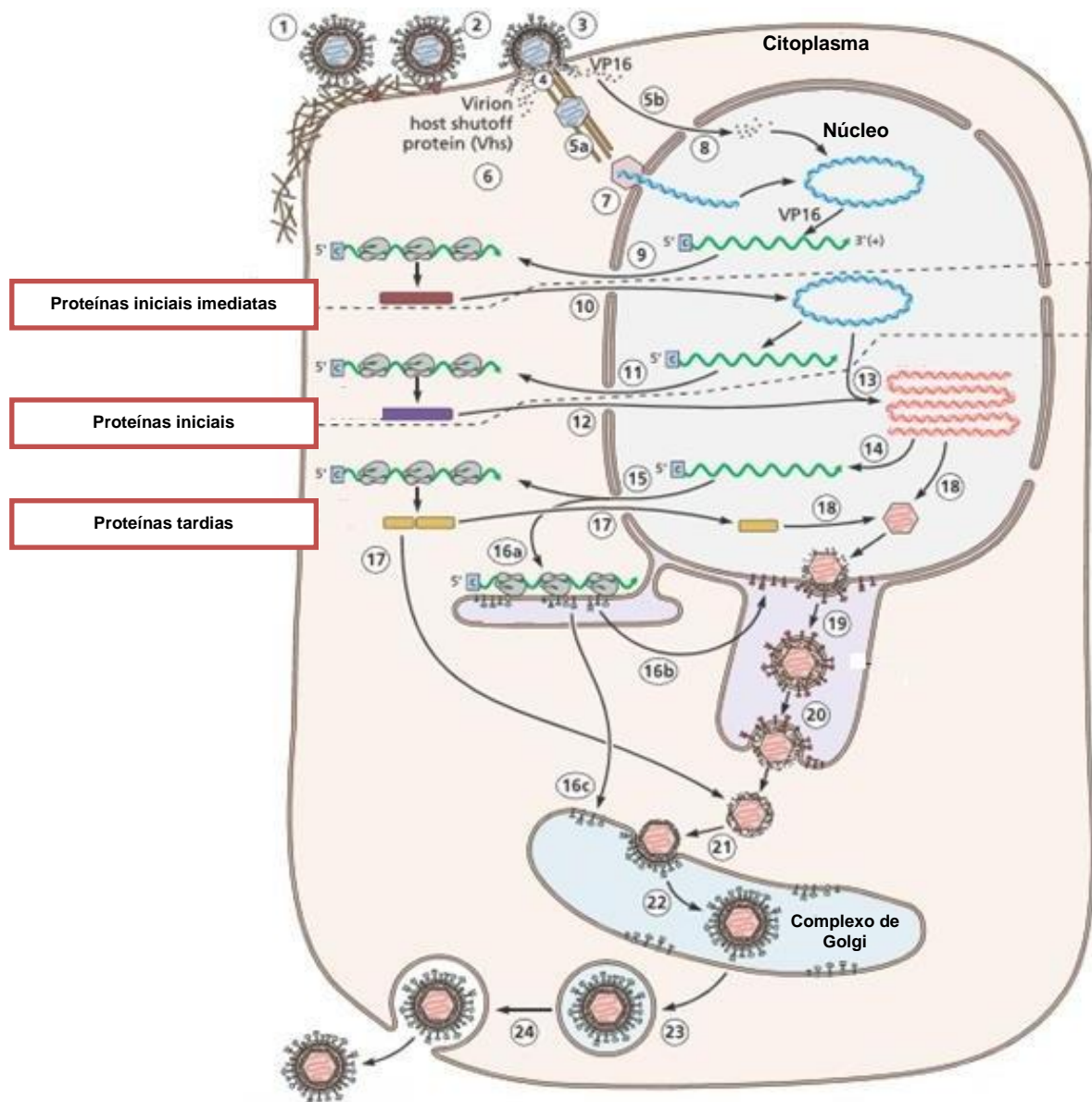


Figura 3. Ciclo replicativo do vírus Herpes Simples. Fonte: Adaptado de SANTOS, ROMANOS & WIGG (2008).

Os primeiros genes transcritos são os das proteínas precoces imediatas, que participam na regulação da transcrição gênica, sendo necessário o auxílio de uma proteína ativadora

contida no tegumento do vírus para o início desta etapa (STRANG & STOW, 2005). Em seguida, ocorre a transcrição dos genes codificadores das proteínas precoces e de enzimas necessárias na produção dos fatores da transcrição. E por último são transcritos os genes das proteínas tardias, as quais são responsáveis pela constituição estrutural das partículas virais. Após estas etapas, o DNA viral é replicado e as proteínas de suporte (*scaffolding*) se organizam e o empacotam, montando o nucleocapsídeo (SANTOS ROMANOS & WIGG, 2008).

O processo de liberação do nucleocapsídeo da membrana externa do núcleo até a membrana citoplasmática não está bem estabelecida. No entanto, três processos são atualmente sugeridos. A primeira descreve que o nucleocapsídeo sofre um primeiro envelopamento na lamela interna da membrana nuclear e perde esse envelope na membrana externa do núcleo. Em seguida, sofre um segundo envelopamento em vesículas, onde a fusão da vesícula com a membrana plasmática libera os vírions da célula (SANTOS ROMANOS & WIGG, 2008).

A segunda hipótese sugere que o nucleocapsídeo adquire o envelope na lamela interna da membrana nuclear e por brotamento da lamela externa é conduzido pelo citoplasma até a membrana citoplasmática onde o vírus é liberado. E o terceiro mecanismo descrito sugere que o nucleocapsídeo sai do núcleo através de poros nucleares aumentados, torna-se envelopado ao passar por vesículas derivadas do Complexo de Golgi e sai por fusão da membrana da vesícula com a membrana citoplasmática (Figura 6). Todo o processo de replicação demora em torno de 18 a 20 horas (SANTOS, ROMANOS & WIGG, 2008)

2.1.5 Manifestações Clínicas

As infecções causadas pelo HSV-1 são caracterizadas pelo desenvolvimento de uma ou mais vesículas pequenas e cheias de líquido, como forma de manifestação primária ou reativação do vírus. Tais vesículas comumente se rompem e causam dor. Geralmente afetam regiões como lábios, boca, região intra-oral e nariz. A infecção pode ainda afetar os órgãos genitais e acarretar lesões nos olhos (ceratite) e encefalite (SCHUSTER & BUSS, 2009; PELLET & ROIZMAN, 2013) (Figura 4).

A infecção primária pode ser inaparente ou manifestar sinais e sintomas, tais como, febre, gengivoestomatite, edema, linfadenopatia localizada e mal-estar (FATAHZADEH & SCHWARTZ, 2007; MELL, 2008). As lesões podem apresentar dor, queimação, coceira ou formigamento. As vesículas persistem por aproximadamente 48 h, progredindo para pústula e crosta em 72 a 96 h (YEUNG-YUE et al., 2002; SIEGEL, 2002)

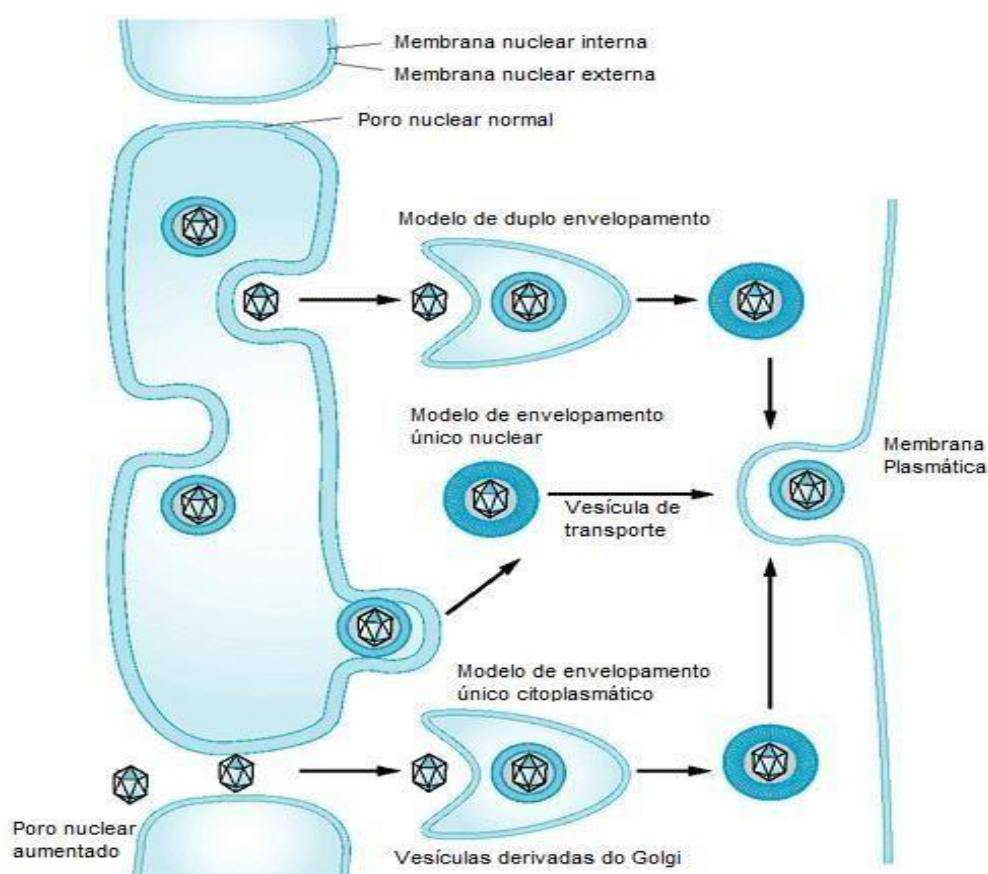


Figura 4 - Propostas do processo de liberação do nucleocapsídeo na célula hospedeira. Fonte: Adaptado de ROIZMAN, KNIPE E WHITLEY, 2007.

As manifestações clínicas da infecção por HSV-1 dependem da porta de entrada do vírus, do estado imunitário do hospedeiro e se a infecção é primária ou recorrente (BRADY & BERNSTEIN, 2004). As manifestações clínicas da doença exibem diferentes graus de severidade em indivíduos normais e imunodeficientes, sendo os imunodeficientes muito mais suscetíveis às infecções sistêmicas severas (SEVERSON & TYRING, 1999).

2.1.6 Latência

Após a replicação produtiva, o HSV-1 possui a capacidade de se manter de forma latente no hospedeiro, desta forma as partículas virais não são eliminadas pelas células do sistema imune. Nesse processo, as partículas virais são transportadas pelos axônios dos nervos sensoriais, em sentido retrógrado ao estímulo nervoso, até a raiz do gânglio, onde se estabelece a latência especialmente no trigêmeo e no sacral. A expressão gênica viral é restrita aos transcritos associados à latência (LATs) e o seu genoma não é replicado. Nesta fase, o DNA

viral circulariza-se e se mantém como epissoma não-integrado ao DNA celular (LACASSE & SCHANG, 2010) (Figura 5).



Figura 5 – Manifestações clínicas da infecção pelo vírus Herpes Simples. Lesões orofaciais (A-B), cutâneas (C) e oculares (D). **Fonte:** (A – B) ARDUINO & PORTER (2008), (C) SANTOS, ROMANOS & WIGG (2015), (D) AAO, 2020.

Devido a situações de estresse, exposição ao calor ou frio, período menstrual e imunossupressão, a infecção produtiva pode ser reestabelecida, acarretando no surgimento de novas lesões. Esses estímulos podem estar associados à elevação de prostaglandinas (E e F) sintetizadas na membrana plasmática após danos tissulares, ativando a liberação de adenosina monofosfato cíclico (AMPc). O AMPc por sua vez ativa proteíno-quinases, que podem fosforilar proteínas responsáveis pela ativação da expressão dos genes virais (NADELMAN & NEWCOMER, 2000).

2.1.7 Tratamento

Os fármacos anti-herpéticos tópicos ou sistêmicos atualmente em uso apresentam eficácia comprovada na redução dos sintomas e no tempo da manifestação clínica localizada.

Dada a ação terapêutica destas substâncias somente no momento da replicação do vírus, considerando a ocorrência do estado de latência, torna-se impossível a eliminação completa da infecção herpética. O paciente pode ter recidivas mesmo sob tratamento e continua a transmitir o vírus (WHITLEY & ROIZMAN, 2001; SANTOS, ROMANOS & WIGG, 2015.; ARDUINO; PORTER, 2008).

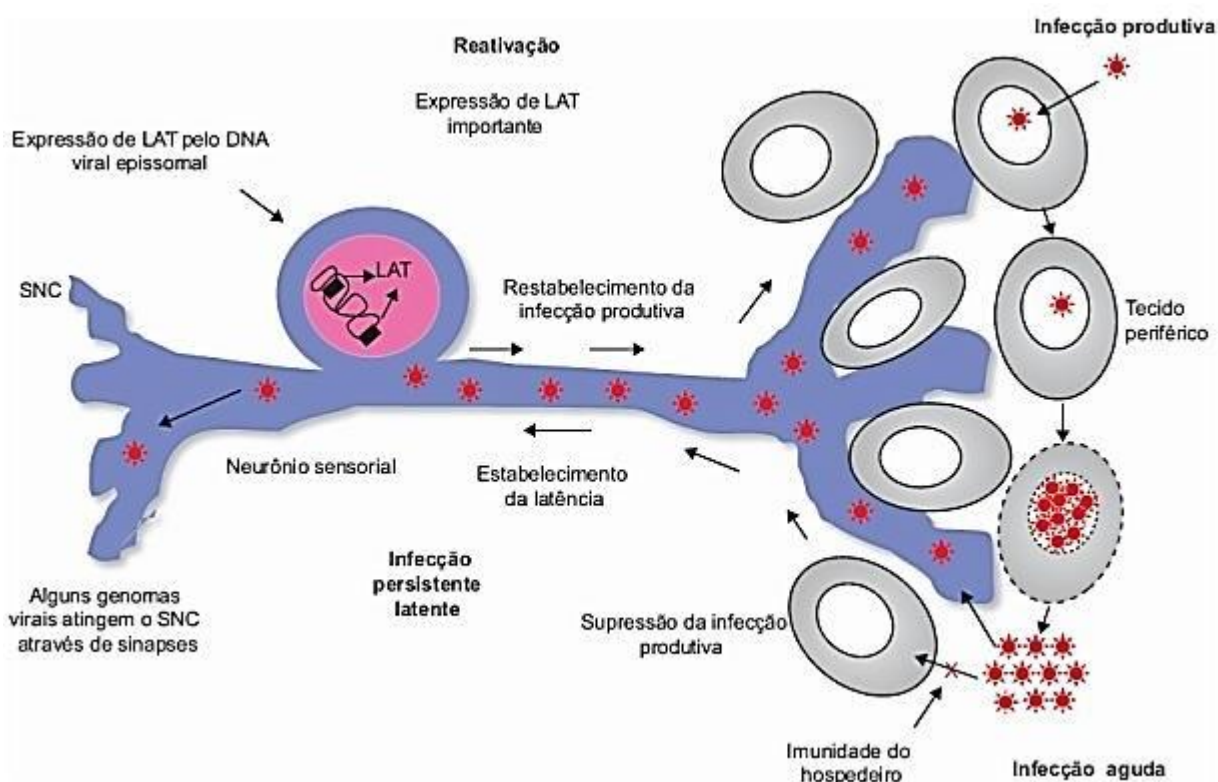


Figura 5 – Representação do estabelecimento do estado de latência e reestabelecimento da infecção produtiva..
Fonte: SANTOS, ROMANOS & WIGG (2015).

Fármacos com ação efetiva contra herpes, como o aciclovir, ganciclovir, valaciclovir, penciclovir e famciclovir estão atualmente disponíveis para utilização no tratamento da doença. Dentre estas o aciclovir é o fármaco de maior uso corrente nas infecções de HSV, seguida do penciclovir e famciclovir (ROIZMAN et al., 2007).

O aciclovir (ACV) ou acicloguanosina é um inibidor potente e seletivo da replicação do DNA dos herpesvírus. Sua ação antiviral é mediada pelo aciclovir trifosfato (ACV-TP) que inibe três etapas do ciclo replicativo: 1) o ACV-TP inibe competitivamente a utilização de GTP (guanossina tri-fosfato) pela DNA polimerase viral; 2) o ACV-TP termina o alongamento da fita de DNA do HSV quando incorporado como um substituto análogo da guanossina; 3) a DNA

polimerase viral é inativada pela ligação ao ACV-TP no molde de DNA (KESSON, 1998) (Figura 5).

A toxicidade destes análogos de nucleosídeos tem sido amplamente relatada devido ao aumento de seu uso. O aciclovir e o ganciclovir ainda podem levar à neurotoxicidade e isso ocorre particularmente nos casos de disfunção renal (WATSON et al., 2017). Além disso, diversas cepas de HSV-1 apresentam resistência ao tratamento com os fármacos utilizados atualmente (SANTOS, ROMANOS & WIGG, 2015), a resistência pode ocorrer, principalmente, por deficiência ou alteração da Timidina quinase viral (GILBERT et al. 2002), além de mutação na DNA polimerase viral (WILSON et al. 2009). Desta forma, torna-se importante o desenvolvimento de novos agentes antivirais que possam substituir ou mesmo complementar a ação dos análogos de nucleosídeos.

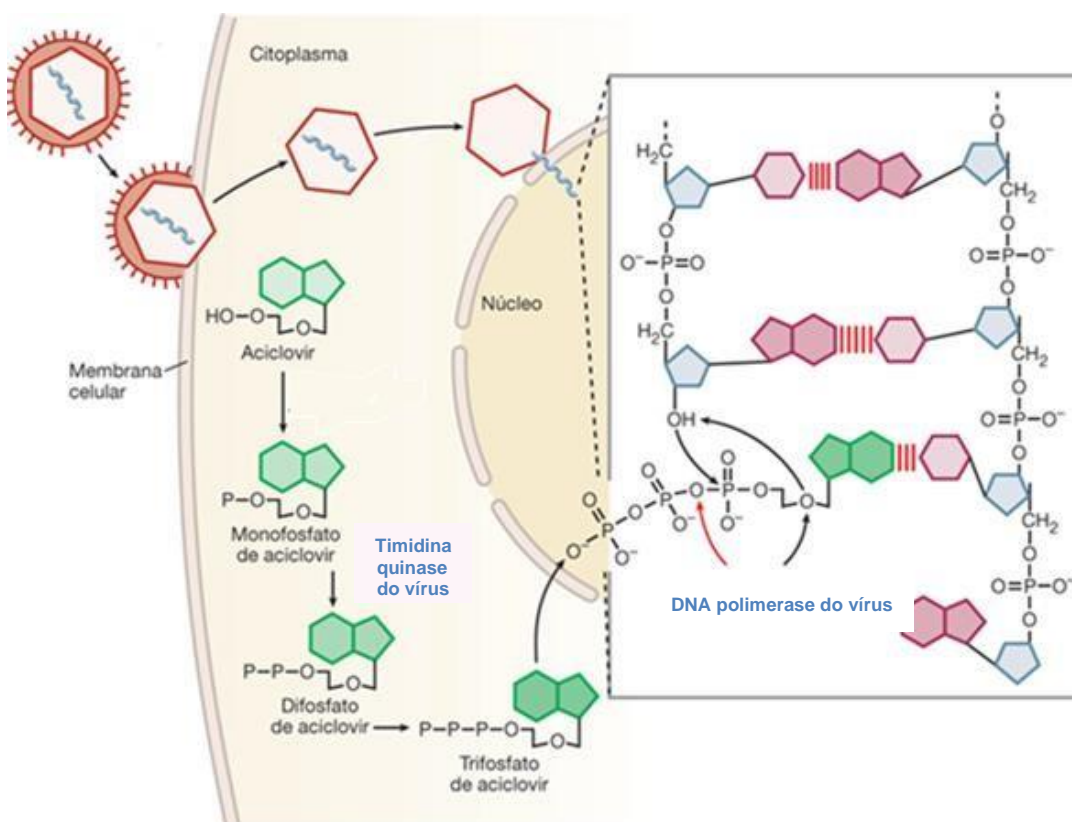


Figura 6 – Mecanismo de ação do Aciclovir (ACV). **Fonte:** Adaptado de DANDAN & BRUNTON (2015).

2.1.8 Compostos de origem natural com atividade antiviral

As plantas medicinais são amplamente empregadas no tratamento de enfermidades humanas e animais, pois funcionam como fonte de novas substâncias ativas utilizadas frequentemente no tratamento de várias doenças, inclusive as causadas por vírus (OLIVEIRA

& AKISSUE, 2005).

As plantas produzem a maioria dos compostos essenciais à sua sobrevivência e desenvolvimento pelo metabolismo primário, no entanto, também produzem uma variedade de metabólitos secundários em menor quantidade, as quais são os principais responsáveis pelas atividades farmacológicas (COS et al., 2006). Há o conhecimento prévio de que os metabólitos secundários de plantas são particulares de cada espécie e, em várias situações, são sintetizados principalmente para a defesa contra predadores. Estes produtos podem ser potenciais candidatos a serem utilizados em pesquisas de medicamentos (OLIVEIRA & AKISSUE, 2005).

Estudos anteriores relatam a atividade anti-herpética de compostos da classe dos terpenos, como o isoborneol (ARMAKA et.al., 1999), timol, citral, pineno e epineno (ASTANI et.al., 2009). Os compostos fenólicos também exibem atividade inibitória frente ao HSV, como o ácido caféico (IKEDA et.al. 2011) e a curcumina (KUTLUAY et.al. 2008).

Flavonóides são moléculas comumente encontradas em espécies vegetais e são membros de uma classe de compostos naturais que são objeto de considerável interesse científico e terapêutico. Eles são encontrados em sementes, frutas cítricas, azeite, chá e vinho tinto e são comumente consumidos na dieta humana (MIDDLETON JR, 2001). Entre os flavonóides, vale destacar o grupo das catequinas, que tem sido descrita na literatura por apresentar propriedades antivirais.

A catequina é um flavonóide caracterizado como um polifenol constituído por diferentes anéis fenólicos ligados por dois ou mais grupos hidroxila (BIASI et al., 2011). Além das propriedades antivirais, estudos anteriores atribuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antialérgicas e antimutagênicas a esta molécula (LIU, 2004; BUNKOVA, 2005; MBAVENG, 2014).

SAVI et al.,(2008) relatou a atividade anti-herpética da (-) - catequina, isômero óptico da forma levógira da molécula e Nocchi et al. (2016) relata que o extrato hidroetanólico de *Schinus terebintifolia*, que no processo de caracterização demonstrou uma presença significativa de catequina, também possui propriedades anti-HSV-1. No entanto, a ação do isômero óptico dextrógiro sobre HSV-1, assim como seu mecanismo de ação, ainda não foi avaliada.

3. Objetivo

3.1. Objetivo Geral

- Avaliar a atividade antiviral *in vitro* do Hidrato de Catequina (HC) sobre o Vírus Herpes Simples tipo 1 (HSV-1).

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a atividade citotóxica do HC sobre células Vero.
- Verificar a atividade antiviral e determinar o mecanismo de ação do HC sobre HSV-1.
- Avaliar a ação do HC sobre a morfologia das partículas virais de HSV-1.

4. Referências

AAO - American Academy of Ophthalmology. **Herpes Simplex Keratitis**. Disponível em: <<https://www.aao.org/topic-detail/herpes-simplex-keratitis--europe>>. Acesso em: 13 de Jan. de 2020.

AKHTAR, J.; SHUKLA, D. Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. **FEBS Journal**, v. 276, n. 24, p.7228-7236, 2009.

ARDUINO, P. G.; PORTER, S. R. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinic-pathological features. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 37, n. 2, p.107-121, 2008.

ARMAKA, M.; PAPANIKOLAOU, E.; SIVROPOULOU, A.; ARSENAKIS, M. Antiviral properties of isoborneol, a potent inhibitor of herpes simplex virus type 1. **Antiviral Research**. v. 43, n. 2, p.79-92, 1999.

ASTANI, A.; REICHLING, J.; SCHNITZLER, P. Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. **Phytotherapy Research**. v.24, p.673–679, 2009.

BAEZ, M.V.; AGUIRRE, A.I.; EPSTEIN, A.L.; JERUSALINSKY, D. Using Herpes Simplex Virus Type 1-Based Amplicon Vectors for Neuroscience Research and Gene Therapy of Neurologic Diseases. **Molecular-Genetic and Statistical Techniques for Behavioral and Neural Research**. p.445-477, 2018.

BIASI F., ASTEGIANO M., MAINA M., LEONARDUZZI G., POLI G. Polyphenol Supplementation as a Complementary Medicinal Approach to Treating Inflammatory Bowel Disease. **Current Medicinal Chemistry**. v.18, p.4851–4865, 2011.

BRADY, R. C; BERNSTEIN, D. J. Treatment of herpes simplex virus infections. **Antiviral Research**. v.61, p.73-81, 2004.

BUNKOVA, R.; MAROVA, I.; NEMEC, M. Antimutagenic properties of green tea. **Plant Foods for Human Nutrition**. v.60, p. 25-29, 2005.

CAMPADELLI-FIUME, G.; MENOTTI, L.; AVITABILE, E.; GIANNI, T. Viral and cellular contributions to herpes simplex virus entry into the cell. **Current Opinion in Virology**. v. 2, n. 1, p.28-36, 2012.

CHATTOPADHYAY, D.; NALK, T.N. Antivirals of ethnomedicinal origin: structure- activity relationship and scope. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. v.7, p. 275-301, 2007.

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.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**. v.23, n.2, p.174–181, 2012.

DANDAN, R. H.; BRUNTON, L. L. Manual de farmacologia e terapêutica de Goodman & Gilman. 2. ed. Porto Alegre: AMGH, 2015.

DAVISON, A. J. Herpesvirus systematics. **Veterinary Microbiology**. v. 143, n. 1, p.52-69, 2010.

FATAHZADEH, M.; SCHWARTZ, R. A. Human herpes simplex virus infections: Epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 57, n. 5, p.737-763, 2007.

FIELD, A.K.; BIRON K.K. The end of innocence revisited: resistance of herpesviruses to antiviral drugs. **Clinical Microbiology Reviews**. v.7, p.1-13, 1994.

FLINT, J.S.; ENQUIST, L.W., RACANIELLO, V.R. Principles of Virology. 3^a ed. Washington: **ASM Press**, 2007.

GELLER, M.; NETO, M.S; RIBEIRO, M.G.; OLIVEIRA, L.; , NALIATO, E.C.; ABREU, C.; SCHECHTMAN, R.C. Herpes simples: Atualização Clínica, epidemiológica e terapêutica. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**. v. 24, n. 4, p.260-266, 2012.

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

GOLDSMITH, C. S.; MILLER, S. E. Modern Uses of Electron Microscopy for Detection of Viruses. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 22, n. 4, p.552-563, 2009.

HELDWEIN, E. E.; KRUMMENACHER, C. Entry of herpesviruses into mammalian cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 65, n. 11, p.1653-1668, 2008.

ICTV-International Committee on Taxonomy of Viruses. **Virus Taxonomy: 2018b Release**. Disponível em <<https://talk.ictvonline.org>>. Acesso em: 01 de Dez. de 2019.

IKEDA K.; SUJIMOTO, K.; UOZAKI, M.; NISHIDE, M.; SUZUKI, Y.; KOYAMA, A.H.; YAMASAKI, H. Inhibition of multiplication of herpes simplex virus by caffeic acid. **International Journal of Molecular Medicine**. v.28, n.4, p.595-598, 2011.

KELLY, B.; FRAEFEL, C.; CUNNINGHAM, A.L.; DIEFENBACH, R.J. Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. **Virus Research**. v. 145, n. 2, p.173-186, 2009.

KESSON, A.M. Use of aciclovir in herpes simplex virus infections. **Journal of Pediatrics and Child Health**. v. 34, n. 1, p.9-13, 1998.

KUTLUAY, S.B.; DOROGHAZI, J.; ROEMER, M.E.; TRIEZENBERG, S.J. Curcumin inhibits herpes simplex virus immediate-early gene expression by a mechanism independent of p300/CBP histone acetyltransferase activity. **Virology**. v.373,n.2,p.239-247, 2008.

LACASSE, J. J.; SCHANG, L. M. During Lytic Infections, Herpes Simplex Virus Type 1 DNA

Is in Complexes with the Properties of Unstable Nucleosomes. **Journal of Virology**. v. 84, n. 4, p.1920-1933, 2009.

LIU, C.; CHEN, R. Y. Advance of chemistry and bioactivities of catechin and its analogues. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v.29, p.1017-1021.

LOPES, N.; FACCIN-GALHARDI, L.C; ESPADA, S.F.; PACHECO, A.C; RICARDO, N.M; LINHARES, R.E.; NOZAWA, C. Sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplex virus and poliovirus. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 60, p.93-99, 2013.

MBAVENG, A. T.; ZHAO, Q.; Kuete, V. Harmful and Protective Effects of Phenolic Compounds from African Medicinal Plants. **Toxicological Survey of African Medicinal Plants**, p.577–609, 2014.

MELL, H.K. Management of Oral and Genital Herpes in the Emergency Department. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p.457-473, 2008.

METTENLEITER, T.C.; KLUPP, B.G.; GRANZOW, H. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. **Current Opinion in Microbiology**. v. 9, n. 4, p.423-429, 2006.

MIDDLETON J.R, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C.; The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Current Medicinal Chemistry**. V.8, p.135-153, 2001.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Microbiologia Médica*. 7. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2014.

NADELMAN, C.M.; NEWCOMER, V.D. Herpes simplex virus infections. **Postgraduate Medicine**. v. 107, n. 3, p.189-200, 2000

NARAYANAN, A.; NOGUEIRA, M.L.; RUYECHAN, W.T.; KRISTIE, T.M. Combinatorial Transcription of Herpes Simplex Virus and Varicella Zoster Virus Immediate Early Genes Is Strictly Determined by the Cellular Coactivator HCF-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 2, p.1369-1375, 2004.

NOCCHI, S.R., DE MOURA-COSTA, G.F.; NOVELLO, C.R.; RODRIGUES, J.; LONGHINI R.; MELLO, J.C.P.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V.; UEDA-NAKAMURA, T. In vitro cytotoxicity and anti-herpes simplex virus type 1 activity of hydroethanolic extract, fractions, and isolated compounds from stem bark of *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Pharmacognosy Magazine**. v.12, n.4, p.160, 2016.

OLIVEIRA, F., AKISSUE, G. *Fundamentos da Farmacobotânica*. 2º ed. **Editora Atheneu**, 2005.

RESKE, A.; POLLARA, G.; KRUMMENACHER, C.; CHAIN, B.M.; KATZ, D.R. Understanding HSV-1 entry glycoproteins. **Reviews in Medical Virology**. v. 17, n. 3, p.205-215, 2007.

ROIZMAN, B; KNIPE, D.M.; WHITLEY, R.J. *Herpes Simplex Viruses and Their Replication*. **Fields virology**. 5ª ed. Pennsylvania-Philadelphia, 2007.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M.D. Introdução à Virologia Humana. 3.ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2015.

SAVI, L.A.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O. Evaluation of Antiherpetic Activity and Genotoxic Effects of Tea Catechin Derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p.2552-2557, 2006.

SCIUBBA, J.J. Herpes simplex and aphthous ulcerations: presentation, diagnosis and management --an update. **General dentistry**. v,51, n.6, p.510, 2003.

SCHUSTER, L.C.; BUSS, C. Herpes and its hearing implications: a literature review. **Revista CEFAC**. v.11, n.4, p.695-700, 2009.

SIEGEL, M.A. Diagnosis and management of recurrent herpes simplex infections. **The Journal of The American Dental Association**, v. 133, n. 9, p.1245-1249, 2002.

STRANG, B. L.; STOW, N. D. Circularization of the Herpes Simplex Virus Type 1 Genome upon Lytic Infection. **Journal of Virology**. v. 79, n. 19, p.12487-12494, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, Christine L. Microbiologia. 12ª ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2017.

WATSON, W. A.; RHODES, N. J.; ECHENIQUE, I. A.; ANGARONE, M. P.; SCHEETZ, M. H.. Resolution of acyclovir-associated neurotoxicity with the aid of improved clearance estimates using a Bayesian approach: a case report and review of the literature. **Journal Of Clinical Pharmacy And Therapeutics**, v. 42, n. 3, p. 350-355, 2017.

WHITLEY, R.J; ROIZMAN, B. Herpes simplex virus infections. **The Lancet**. v. 357, n. 9267, p.1513-1518, 2001.

WILSON, S. S.; FAKIOGLU, E.; HEROLD, B. C. Novel approaches in fighting herpes simplex virus infections. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**. v.7, n.5, p 559–568, 2009.

YARMOLINSKY, L.; ZACCAI, M.; BEN-SHABAT, S.; HULEIHEL, M. Anti-Herpetic Activity of Callissia fragrans and Simmondsia chinensis Leaf Extracts In Vitro. **The Open Virology Journal**. v. 4, n. 1, p.57-62, 2010.

YEUNG-YUE, K.; BRENTJENS, M.H.; LEE, P.C.; TYRING, S.K. Herpes simplex viruses 1 and 2. **Dermatologic Clinics**, v. 20, n. 2, p.249-266, 2002.

ZUCKERMAN, A.J.; BANATVALA, J.E.; PATTISON, J.R.; GRIFFITHSAND, P.D.; SCHOUB, BD. Principles and Practice of Clinical Virology. 5ª ed. **John Wiley & Sons Ltd.**, 2004.

5. Artigo

Antiviral activity of catechin hydrate against Herpes simplex virus type 1

Leandro Martin Paulino^{a, b}, Danielle Lazarin-Bidóia^a, Tania Ueda-Nakamura^a, Celso Vataru Nakamura^{a, b*}.

^a Department of Basic Health Sciences, State University of Maringá, Maringá, Paraná, Brazil

^b Microbiology Pos-Graduation Program, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

* Corresponding author:

Celso Vataru Nakamura

E-mail address: cvnakamura@gmail.com

Department of Basic Health Sciences, State University of Maringá
Av. Colombo, 5790 - Maringá, PR 87020-900 (Brazil)

Abstract

The herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is one of the most common pathogens among humans and is mainly related to orofacial and genital infections. Treatment for infections caused by the Herpes simplex virus uses nucleoside analogues, such as acyclovir. However, the search for new molecules with anti-herpetic activity becomes important due to the selection of viral strains resistant to the drugs used in the clinic and the adverse effects associated with the available drugs. In this sense, catechin, a secondary metabolite of a large number of plant species and which has antioxidant, anti-inflammatory, antiallergic and antimutagenic properties, presents itself as a promising molecule. The aim of this study was to evaluate the antiviral activity of Catechin Hydrate on Herpes Simplex Virus type 1 (KOS strain) and to determine the mechanism of action on viral particles. The CH presented CC₅₀ of 855.5 µM and EC₅₀ of 11.6 µM. Additionally, it was found that the compound does not show prophylactic activity but acts mainly in the phases of viral adsorption and penetration, as well as having virucidal activity, inhibiting the spread between adjacent cells. Analyzes by electron microscopy also demonstrated that treatment with CH has the ability to promote morphological changes, mainly in the structure of the viral envelope.

Keywords: Antiviral activity, Catechin, Electron Microscopy, Herpes Simplex Virus type 1

1. Introduction

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is a common human pathogen mainly associated with oral, pharyngeal, facial, ocular, and central nervous system infections [1-3].

Treatments for infections caused by the Herpes simplex virus use nucleoside analogues, such as acyclovir (ACV). Although the ACV and the other drugs have been approved for therapeutic use, the effective search for new drugs becomes important due to the selection of resistant viral strains to the drugs used in the clinic and due the adverse effects associated with the available drugs [4].

Medicinal plants are widely used in the treatment of human and animal diseases, acting as a source of new active substances used frequently in the treatment of various diseases, including those caused by viruses [5]. Plants produce most of the compounds essential to their survival and development by primary metabolism, however, they also produce a variety of secondary metabolites in smaller quantities, assigned to protection against external threats, which are mainly responsible for pharmacological activities [6]. In this sense, catechin, a flavonoid that is characterized as a secondary metabolite of a large number of plant species, was highlighted previously for presenting antioxidant, anti-inflammatory, antiallergic and antimutagenic properties [7-8].

Previous studies describe the anti-herpetic activity of (-) - catechin, the levorotary form of the tested molecule, as well as the hydroethanol extract of *Schinus terebintifolia*, which characterized a likely presence of catechin, also has anti-HSV-1 properties. However, the activity of the dextrorotary isomer and the mechanism of action of the compound have not yet been elucidated [11-12]. Thus, catechin presents itself as a promising molecule against the herpes simplex virus.

The present study investigated the *in vitro* activity of catechin hydrate on herpes simplex virus type 1, as well as investigating the mechanism of action on viral particles.

2. Materials and Methods

2.1 Cells and Virus

Vero cells (African green monkey kidney epithelial cells, ATCC CCL-81) were cultured in DMEM (Gibco) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (Gibco) in humidified 5% CO₂ atmosphere at 37 °C.

HSV-1 (KOS strain) was provided by Dr. Marcelo Alves Pinto (Fiocruz, RJ, Brazil).

Virus stocks were produced in Vero cells before the experiments. The median tissue culture infectious dose (TCID₅₀) was determined and used to prepare the viral suspensions used in all experiments.

2.2. Compound

Catechin Hydrate ((+) - Cyanidol-3, (2R, 3S) -2- (3,4-Dihydroxyphenyl) -3,4-dihydro-1 (2H) -benzopyran-3,5,7-triol) was obtained commercially (Purity $\geq 98.0\%$, HPLC) (Sigma-Aldrich®). The solubility was complete in an aqueous medium. Thus, for all the experiments, the compound was diluted in DMEM.

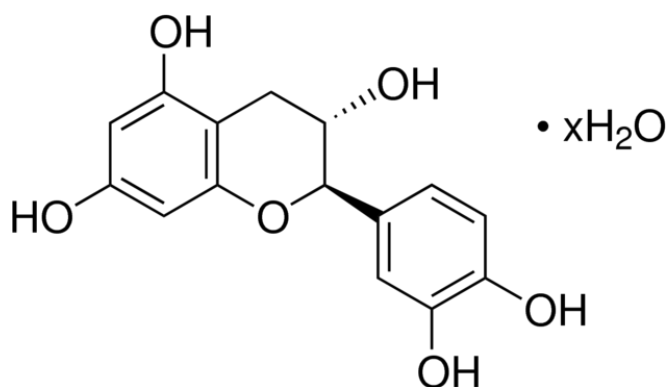


Figure 1 - Chemical structure of catechin hydrate.

2.3 Citotoxicity assay

The cytotoxicity assay was performed as described by [9] with modifications. Vero cells were seeded in 96-well tissue plates at a density of 2.5×10^5 cells/ml for 24 h. Then, the cells were treated with different concentrations of CH [3445 to 31,25 μM] or Acyclovir [4440,3 to 13,8 μM] and then was incubated at 37 °C with 5% CO₂ for 72 h. The cell viability was determined by MTT method (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide). The CC₅₀ values were determined by linear regression analysis. The tests were performed in triplicate in three independent experiments.

2.4 Antiviral assay

The assay was performed as described by [9] with modifications. Vero cells were seeded in 96-well tissue plates at a density of 2.5×10^5 cells/ml for 24 h. Then, the cells were infected with 25 μl of viral suspension for 1 h at 37 °C and the test samples were added per well [172,25 to 5,38 μM for CH and 4,44 to 0,13 μM for ACV]. The plates were incubated for 72 h in a

humid atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C. Cell control and virus control were also performed. Cell viability was determined by the MTT colorimetric method. The EC₅₀ values were determined by linear regression analysis. The tests were performed in triplicate in three independent experiments.

2.5 Mechanism of action

To determine the possible target of the compound on HSV-1, the plaque reduction assay was used [9]. Cells (density of 2.5×10^5 cells/ml) and viruses (virus suspension referring to TCID₅₀) were incubated with CH at different stages during the viral replication cycle: Pretreatment – cells were treated with HC for 1 and 24 h prior to viral infection; Adsorption – cells were treated with CH concomitantly with viral infection at 4°C; Adsorption and Penetration – cells were treated with HC concomitantly with viral infection at 37 °C; Post-entry – cells were infected with HSV-1 for 1 h and then were treated with CH; Virucidal treatment – the viral suspension was treated with CH at 37 °C for 1 h and then used to infect the cells.

After the time required for adsorption, the plates were filled with DMEM 2X + Carboxymethylcellulose, to enable the formation of lysis plate. All experiments were incubated for 72 hours, at 37°C, 5% CO₂. Then, the cells were fixed with a 10% formaldehyde solution for 24 hours at room temperature. The supernatant was discarded, the plate was washed with distilled water and stained with 0.5% violet crystal (in 20% alcoholic solution) for 10 min. The excess dye was removed by washing in water and after drying at room temperature, the plaque-forming unit (PFU) were counted and used to calculate the EC₅₀ by linear regression analysis.

Additionally, to analyze the reduction in the diameter of the lysis plates, the stained plates were observed using the inverted optical microscope Olympus CX31.

2.6 Morphological analysis by Electron Microscopy

Vero cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine, kept at 37 °C with a tension of 5% CO₂ for 72 h. Then, the cells were incubated with the HSV-1 (Multiplicity of infection =1), from 24 h until cause lysis of approximately 90% of the cells. After this period, the supernatant was removed and subjected to treatment with the EC₅₀ value found in the analysis of virucidal activity (18.67 μM) for 1h, at 37 °C. For the control samples, the supernatant was removed and kept under the same temperature and time conditions as the treated group, without adding any components.

The suspension was ultracentrifuged as described by [10] with modifications. The first centrifugation was performed at 10,000 x g for 15 min, at 4°C in Himac CP90WX Ultracentrifuge (Hitachi®), in order to separate and discard the cellular debris present in the medium. Then, the supernatant was subjected to a second ultracentrifugation (80,000 x g for 60 min) to concentrate the viral particles. The supernatant was discarded and the pellet obtained was resuspended in PBS.

The sample obtained were dripped onto 200-mesh formvar/carbon-coated copper grids (Ted Pella, Inc.). Each sample was negatively stained by placing a drop of UranylLess stain (Electron Microscopy Sciences®) on the grid. After drying, the samples were evaluated using the Transmission Electron Microscopy (*Jeol - JEM 1400*) and Scanning-Transmission Electron Microscopy (*FEI - Scios Dual Beam*).

Structural modifications were also evaluated by High-Resolution Scanning Electron microscopy. For this purpose, the suspension obtained by ultracentrifugation was dripped onto coverslips treated with poly-L-lysine, fixed with paraformaldehyde 2.5% and after drying it was subjected to the process of metallization with gold. The samples were analyzed using *FEI - Scios Dual Beam* Microscope.

3. Results and Discussion

Catechin Hydrate (CH) showed cytotoxicity on Vero cells at a concentration of 855.5 µM. Regarding antiviral activity, CH presented an EC₅₀ of 11.6 µM. In addition, the selectivity index (SI) suggests that HC is more selective for the virus than for the cells (Table 1).

Table 1. Cytotoxic and antiviral effects of catechin hydrate (CH).

	CC₅₀ (µM)	EC₅₀ (µM)	SI
HC	855.5 ± 8.09	11.62 ±0.26	73.6
ACV	2575.3 ± 2.5	0.79 ±0.7	3259.8

About the mechanism of action, it was observed that the pretreatment of cells with CH did not interfere with viral infectivity, therefore, until the highest concentration tested (344.5 µM), there was no reduction in the number of plaques

Table 2 - HC antiviral activity on viral replication

Treatment	EC₅₀ (μM) ± SD
Pretreatment	> 344.5
Virucidal	18.6 ± 0.24
Adsorption	2.3 ± 0.24
Adsorption/Penetration	5.5 ± 1.01
Post-entry	97.1 ± 3,4

The greatest activity of CH was observed in the adsorption and penetration phases, as well as showing virucidal activity, with EC₅₀ of 2.3, 5.5 and 18.7 μM, respectively. The post- entry treatment also showed activity on viral infectivity, however, in a higher concentration than in the other phases, requiring about 97.1 μM to reduce 50% of the lysis plaques (Table 2).

The results obtained suggests that CH activity is directly related to the viral particles, either by morphological alterations or by interaction with viral receptors, leading to the impossibility of adsorbing and continuing the normal replication cycle, which could prevent infection of neighboring cells, as can be seen in the size of the lysis plaques (Figure 2). Hypothesis that was corroborated with the analysis in electron microscope, which demonstrated that the treatment with CH promoted morphological changes in the viral particles, mainly in the integrity of the envelope (Figure 3, 4 and 5).

The morphological changes in the envelope could be explained by the interaction of catechins with biological membranes [13]. It was reported that catechins have a strong affinity for the lipid bilayer and can be absorbed. Affinity that can also be extended to viruses, with its outermost surface, the envelope, consisting of membranes of host cells. However, even though the host cells have the same components in relation to the outer membranes, the compound was more selective for the viral particles than for the host cell, that can have repair mechanisms to prevent cell damage.

Polyphenols exhibit anti-HSV activity in many cases, mostly by influencing the early phases of virus infection. Polyphenols bind to proteins to form unstable complexes and HSV particles may be vulnerable to the action of polyphenols because this compound can interact easily with the glycoproteins of the viral envelope [14-17].

Thus, the HC activity may be related to the binding of some constituents of the compound to viral or cellular proteins involved in the adsorption and penetration of host cells; or attributable to the damage of virions, possibly their envelopes, impairing their ability to infect host cells.

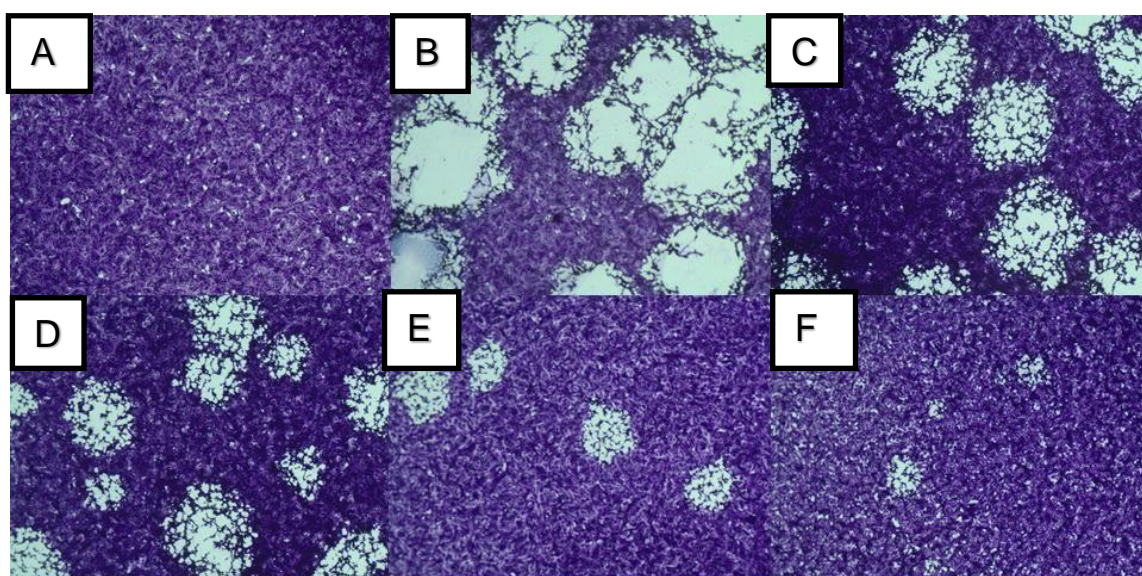


Figure 2 - Reduction in the number and diameter of the lysis plates caused by HSV-1 infecting Vero Cells and treated with CH. (A) Cell control. (B) Virus Control. Treatment with CH: (C) 21.5 μM , (D) 43.1 μM , (E) 86.1 μM and (F) 172.3 μM .

Our results corroborate with previous studies for the dextrorotary isomer. However, the levogyrous form proved to be less cytotoxic and more selective for HSV-1 than the form already studied.

The way of carrying out the antiviral activity experiments and the post-penetration test are very similar, however, the IC_{50} values were different. This difference is due to the reading method of each experiment, while in one the cell viability is evaluated, in the other the reduction in the number of lysis plates is used. As already discussed, HC seems to interfere after the virus leaves the cell, thus, the amount of lysis plaques will be maintained, with the reduction of plaque formation only being noticed in a high concentration of compound.

In addition, electron microscopy analysis provides valuable information in virus studies. Whether it allows the visualization of normal characteristics as well as allowing the analysis of morphological changes resulting from treatments, which is an important tool in the study of potential bioactive compounds.

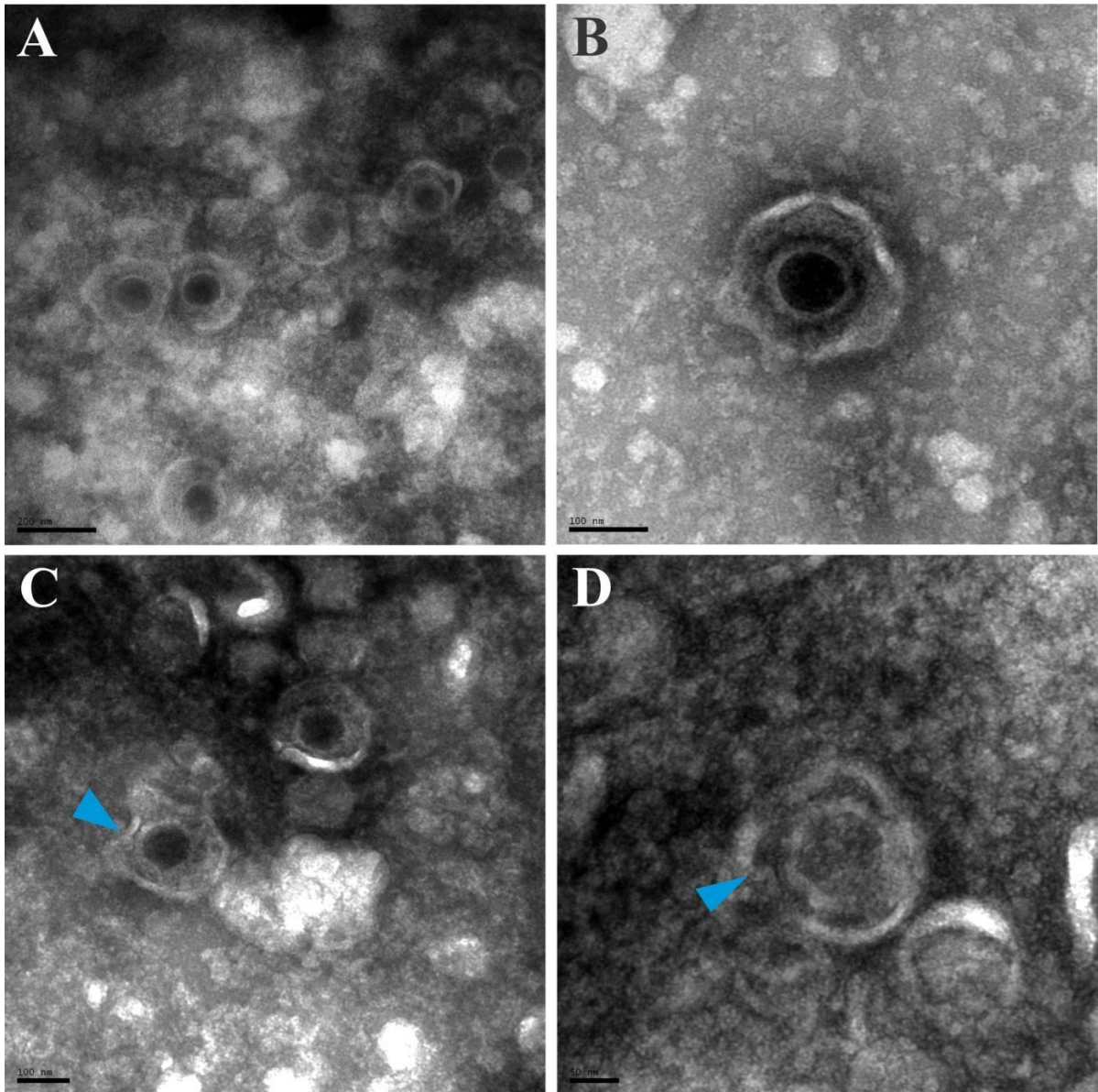


Figure 3 – Micrograph of Herpes simplex virus type 1, obtained by Transmission Electron Microscopy. (A-B) Control (C-D) Treated with 18.67 μ M Catechin Hydrate. **Magnification:** (A, C) 80,000x and (B, D) 150,000x. **Scale Bar:** (A) 200 nm (B) 50 nm (C) 100 nm (D) 50 nm. Arrowheads show morphological changes in the envelope of HSV-1 particles.

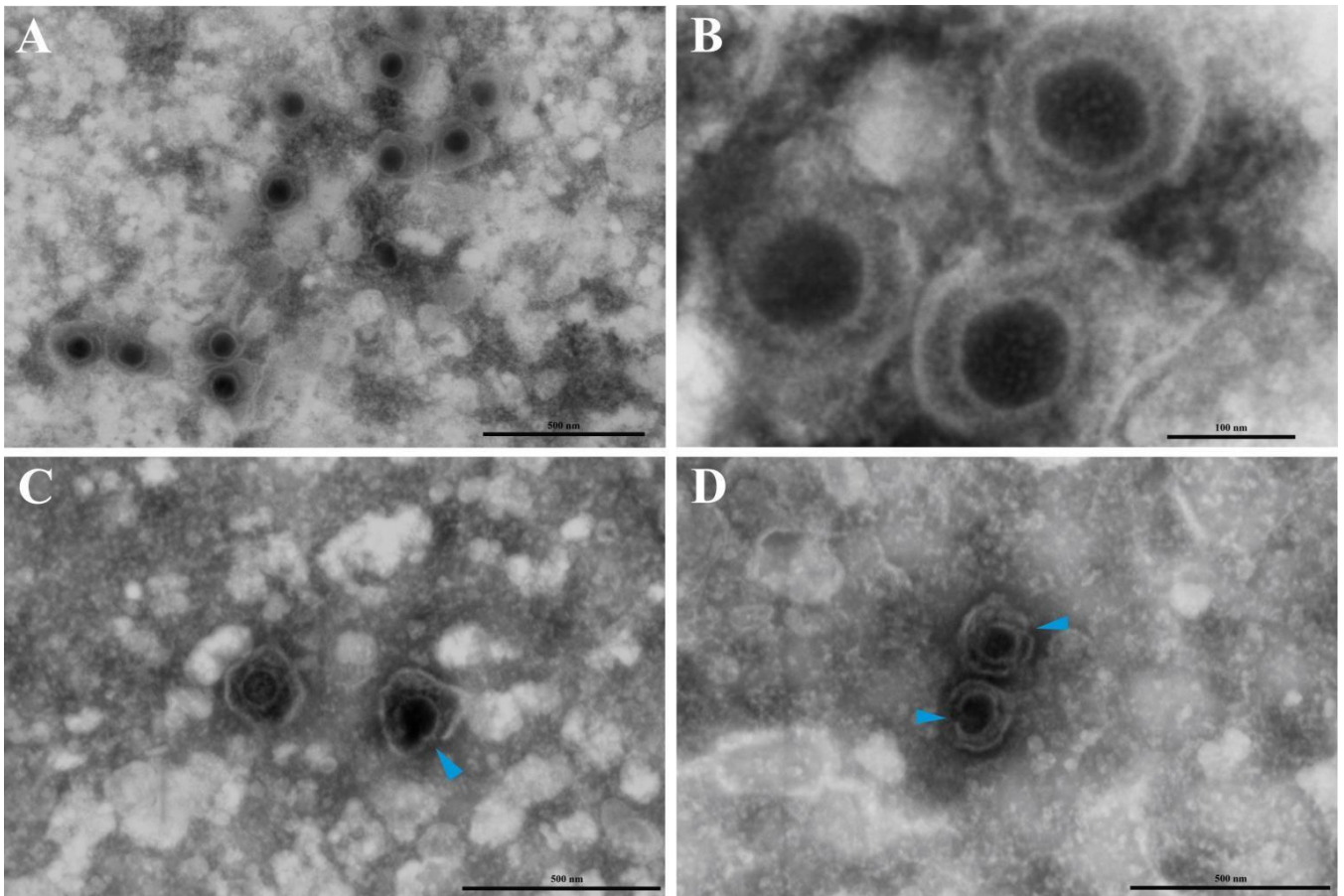


Figure 4 – Micrograph of Herpes simplex virus type 1, obtained by Scanning-Transmission Electron Microscopy. (A-B) Control (C-D) Treated with 18.67 μ M Catechin Hydrate. **Magnification:** (A, C) 80,000x and (B, D) 150,000x. **Scale Bar:** (A) 200 nm (B) 50 nm (C) 100 nm (D) 50 nm. Arrowheads show morphological changes in the envelope of HSV-1 particles.

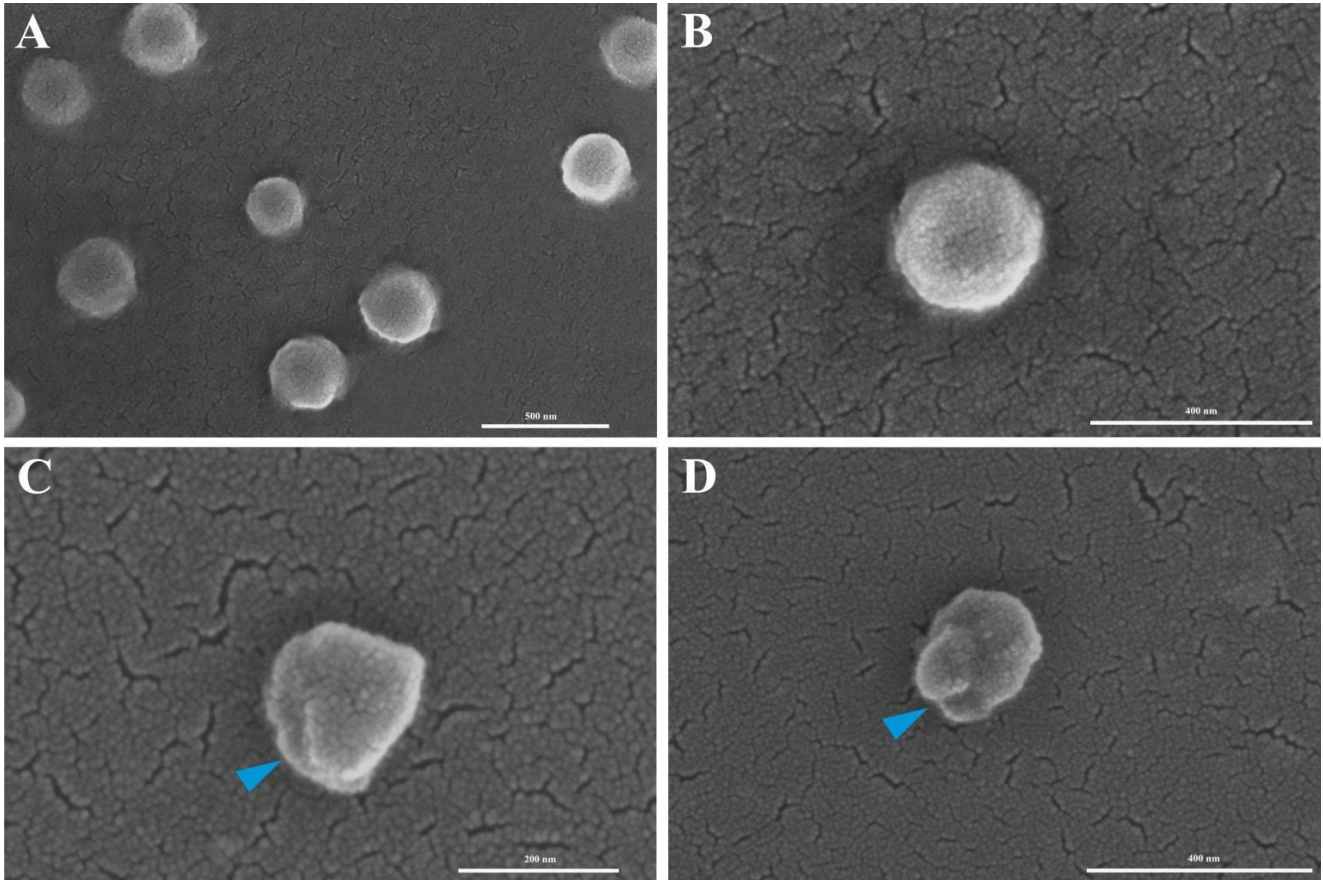


Figure 5 – Micrograph of Herpes simplex virus type 1, obtained by High-Resolution Scanning Eletron Microscopy. (A-B) Control (C-D) Treated with 18.67 μM Catechin Hydrate. **Magnification:** (A, C) 80,000x and (B, D) 150,000x. **Scale Bar:** (A) 200 nm (B) 50 nm (C) 100 nm (D) 50 nm. Arrowheads show morphological changes in the envelope of HSV-1 particles.

4. Conclusion

Catechin Hydrate showed antiviral activity against the Herpes Simplex virus type 1 (KOS strain), acting mainly in the phases of viral adsorption and penetration, as well as virucidal activity, directly interfering in the viral particle, causing morphological changes in the structure of the viral envelope and inhibiting the adsorption process and consequently the spread of viral particles between adjacent cells.

The results found for a levogyrous form of the molecule corroborate previous work for a dextrogyrous form, characterizing a catechin as a promising molecule for the development of new antiviral alternatives to HSV-1.

5. Acknowledgements

We are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support.

6. References

- [1] Brady RC, Bernstein DI. Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Res* 2004;**61**:73–81.
- [2] Fatahzadeh M., Schwartz RA. Human herpes simplex virus infections: Epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *J. Am. Acad. Dermatol* 2007;**57**: 737-763.
- [3] Nadelman CM, Newcomer VD. Herpes simplex virus infections. *Postgrad. Med* 2000; **107**:189–200.
- [4] Yarmolinsky L, Zaccai M, Ben-Shabat S, Huleihel M. Anti-Herpetic Activity of *Callisia fragrans* and *Simmondsia chinensis* Leaf Extracts In Vitro. *The Open Virology Journal* 2010;**4**: 57-62.
- [5] Sofowora A, Ogunbodede E, Onayade, A. The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 2013;**10**: 210-229.
- [6] Liu C.; Chen RY. Advance of chemistry and bioactivities of catechin and its analogues. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2004;**29**:1017-1021.
- [7] Bunkova R, Marova, I, Nemeč M. Antimutagenic properties of green tea. *Plant Foods for Human Nutrition* 2005;**60**:25-29.
- [8] Mbaveng AT, Zhao Q, Kuete, V. Harmful and Protective Effects of Phenolic Compounds from African Medicinal Plants. *Toxicological Survey of African Medicinal Plants* 2014;**577**–609.
- [9] Onozato T, Nakamura CV, Cortez, DAG, Filho BPD, Ueda-Nakamura T. *Tanacetum*

vulgare: antiherpes virus activity of crude extract and the purified compound parthenolide. *Phytotherapy Research* 2009;**23**:791–796.

[10] Dai X, Zhou ZH. Purification of Herpesvirus Virions and Capsids. *Bio-Protocol* 2014;**4**:1-5.

[11] Savi LA, Barardi CRM, Simões CMO. Evaluation of Antiherpetic Activity and Genotoxic Effects of Tea Catechin Derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006;**54**:2552-2557.

[12] Nocchi SR, De Moura-Costa GF, Novello CR, Rodrigues J, Longhini R, Mello JCP, Filho BPD, Nakamura CV, Ueda-Nakamura T. In vitro cytotoxicity and anti-herpes simplex virus type 1 activity of hydroethanolic extract, fractions, and isolated compounds from stem bark of *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Pharmacognosy Magazine* 2016;**12**:160-168.

[13] Sirk TW, Brown EF, Friedman M, Sum AK. Molecular Binding of Catechins to Biomembranes: Relationship to Biological Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009;**57**: 6720–6728.

[14] Gescher K, Hensel A, Hafezi W, Derksen A, Kühn J. Oligomeric proanthocyanidins from *Rumex acetosa* L. inhibit the attachment of herpes simplex virus type-1. *Antiviral Res* 2011;**89**:9-18.

[15] Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. *J Nat Prod* 1996;**59**:205-15.

[16] Serkedjieva J, Ivancheva S. Antiherpes virus activity of extracts from the medicinal plant *Geranium sanguineum* L. *J Ethnopharmacol* 1999;**64**:59-68

[17] Nolkemper S, Reichling J, Sensch KH, Schnitzler P. Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts. *Phytomedicine*. 2010;**17**:132-8

4. Conclusão

O Hidrato de Catequina (HC) apresentou atividade antiviral sobre o vírus Herpes Simples tipo 1 (cepa KOS), atuando principalmente nas fases de adsorção e penetração viral, assim como possui atividade virucida, interferindo diretamente na partícula viral, causando alterações morfológicas na estrutura do envelope viral, o que impede a adsorção e impossibilita a disseminação das partículas virais entre células adjacentes.

Os resultados encontrados para a forma levógira da molécula corroboram com os trabalhos previamente descritos para a forma dextrógira, caracterizando a catequina como uma molécula promissora para o desenvolvimento de novas alternativas de antivirais frente ao HSV-1.