



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

DANIELE ZENDRINI RECHENCHOSKI

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE
FORMULAÇÕES CONTENDO POLISSACARÍDEO DE
Adenantha pavonina E MANGIFERINA CONTRA
HERPESVÍRUS, *IN VIVO***

DANIELE ZENDRINI RECHENCHOSKI

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE
FORMULAÇÕES CONTENDO POLISSACARÍDEO DE
Adenantha pavonina E MANGIFERINA CONTRA
HERPESVÍRUS, *IN VIVO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rosa Elisa Carvalho Linhares

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ligia Carla Faccin-Galhardi

Londrina
2019

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

Rechenchoski, Daniele Zandrini .

Desenvolvimento e avaliação da ação de formulações contendo polissacarídeo de *Adenantha pavonina* e mangiferina contra herpesvírus, *in vivo*. / Daniele Zandrini Rechenchoski. - Londrina, 2019.
98 f. : il.

Orientador: Rosa Elisa Carvalho Linhares.

Coorientador: Ligia Carla Faccin Galhardi.

Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2019.
Inclui bibliografia.

1. Mangiferina - Tese. 2. *Adenantha pavonina* - Tese. 3. Herpes simplex - Tese. 4. Antivirais - Tese. I. Linhares, Rosa Elisa Carvalho. II. Faccin-Galhardi, Ligia Carla . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

DANIELE ZENDRINI RECHENCHOSKI

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE FORMULAÇÕES
CONTENDO POLISSACARÍDEO DE *Adenantha pavonina* E
MANGIFERINA CONTRA HERPESVÍRUS, *IN VIVO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA



Prof.ª Dr.ª Rosa Elisa Carvalho Linhares
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Carlos Nozawa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof.ª Dr.ª Renata Katsuko Takayama Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof.ª Dr.ª Eliana Carolina Vespero
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof.ª Dr.ª Audrey Alesandra Stinghen Garcia Lonni
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 14 de fevereiro de 2019.

Aos meus queridos pais, Antonio e Deonice, por confiarem em mim e pelos ensinamentos transmitidos no decorrer da minha vida; à minha irmã, Denise, pelas vibrações positivas; e ao meu noivo Bruno, por seu amor e sua cumplicidade.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela dádiva da vida e, também, por me guiar, iluminar e conceder tranquilidade para que eu não desanimasse dos meus sonhos perante às dificuldades. Agradeço por me permitir errar, aprender e crescer! Sua graça me sustenta e me capacita, provendo a força necessária para enfrentar qualquer desafio, pois “tudo posso naquele que me fortalece” (Filipenses, 4:13).

À minha família, em especial, aos meus pais, Antonio Rechenchoski Sobrinho e Deonice Aparecida Zandrini Rechenchoski, que acreditaram em mim sem hesitar e embarcaram junto comigo neste meu sonho. Agradeço pelo valioso e incansável apoio para superação de todos os obstáculos que surgiram ao longo desta caminhada e pelo amor incondicional. Obrigada pelo incentivo constante em meus estudos, vocês são meus exemplos e me sinto muito privilegiada em fazer parte desta família. À vocês, meu profundo apreço, pois também entenderam minhas ausências e meus momentos de reclusão. Amo vocês!

À minha irmã, Denise Zandrini Rechenchoski, que mesmo estando distante fisicamente, torce e vibra com as minhas conquistas e me inspira com a sua coragem e ousadia em encarar a vida.

Ao meu noivo, Bruno Possani Rodrigues, pelo carinho e dedicação constantes, por compreender as minhas ausências e por me estimular, mostrando que sou mais capaz do que imagino.

Ao meu querido “dziadzio” David Rechenchosky (*in memoriam*), por ter transmitido princípios valiosos como honestidade e humildade, sendo o alicerce de nossa família.

À professora Rosa Elisa Carvalho Linhares, por me acolher no Laboratório de Virologia, pela paciência em me orientar desde o mestrado e por todo o conhecimento compartilhado.

À minha co-orientadora Ligia Carla Faccin-Galhardi que sempre esteve à disposição para sanar as minhas dúvidas e que me ensinou muito durante esses anos.

Ao professor Carlos Nozawa, por estimular minha capacidade crítica e argumentativa e pela revisão impecável dos artigos científicos que me despertou profunda admiração.

Às amigas que fiz durante esses anos de laboratório e que levarei para sempre comigo: Ananda Marques de Godoi e Karoline Fontana Agostinho. Obrigada

meninas, pelos momentos de descontração, pelos experimentos compartilhados e pela mão estendida quando precisei. Levo vocês com carinho no coração!

Ao pessoal do Laboratório de Virologia, inclusive a cada estagiário que esteve por lá contribuindo, cada um da sua maneira.

Ao pessoal do Laboratório de Histologia, representados pelo professor Fábio Goulart de Andrade, por me auxiliarem na análise histológica da pele dos animais e pela análise estatística dos dados.

Ao pessoal da Universidade Federal do Ceará, por cederem as substâncias naturais isoladas e purificadas para a realização deste estudo.

Ao pessoal da Universidade Estadual de Maringá, por cederem as cepas do vírus e, em especial, à Érica Benassi Zanqueta, por toda a sua paciência e experiência compartilhada quanto à experimentação *in vivo*.

À professora Audrey Alesandra Stinghen Garcia Lonni pelo auxílio no desenvolvimento e caracterização farmacotécnica das formulações.

Às professoras que despertaram em mim o amor pela Microbiologia desde a graduação: Renata Katsuko Takayama Kobayashi, Eliana Carolina Vespero e Marcia Regina Eches Perugini, servindo de inspiração para que eu pudesse concluir mais esta etapa.

Aos meus alunos, por me fazerem acreditar que estou no caminho certo e que a educação é a base de tudo.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, pelo conhecimento transmitido.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, pela colaboração no suporte técnico.

Aos membros da banca, por avaliarem e melhorarem a qualidade desta tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida durante esses anos de estudo.

Enfim, sou eternamente grata a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que eu pudesse concluir mais esta etapa importante da minha vida. Muito obrigada!

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.”

(Ayrton Senna da Silva)

RECHENCHOSKI, Daniele Zendrini. **Desenvolvimento e avaliação da ação de formulações contendo polissacarídeo de *Adenantha pavonina* e mangiferina contra herpesvírus, *in vivo***. 2019. 98 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

A alta prevalência de infecções pelo vírus herpes simplex (HSV) e a emergência de cepas resistentes ao aciclovir têm estimulado a pesquisa e o desenvolvimento de novos agentes antivirais. Neste contexto, os produtos naturais representam uma excelente fonte de descoberta de compostos bioativos com grande diversidade estrutural e química, capazes de apresentar múltiplos mecanismos de ação e, em geral, com baixa toxicidade. A mangiferina é uma xantona glicosilada encontrada em muitas espécies de plantas, entre elas a mangueira (*Mangifera indica*). *Adenantha pavonina* é uma árvore nativa da África e da Ásia, introduzida no Brasil para reflorestamento e indústria madeireira. Ambas são tradicionalmente utilizadas para o tratamento de muitas doenças e possuem diversas atividades farmacológicas descritas cientificamente, inclusive atividade antiviral. O objetivo deste estudo foi investigar a atividade anti-HSV-1 da mangiferina e do polissacarídeo sulfatado de *A. pavonina* (SPAp), bem como, desenvolver formulações tópicas contendo estes compostos. Duas cepas virais foram utilizadas, uma resistente (AR-29) e outra sensível (KOS) ao aciclovir. A citotoxicidade dos compostos foi avaliada pelo método colorimétrico de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-difeniltetrazólio, em células Vero. A atividade antiviral, *in vitro*, foi previamente realizada por ensaio de redução de plaque, utilizando diferentes protocolos de tratamento, tais como, tempo 0 h, virucida e inibição da adsorção para mangiferina e simultâneo para SPAp. A inibição da síntese da proteína ICP4 pela mangiferina também foi avaliada pelo ensaio de imunofluorescência. As formulações tópicas foram desenvolvidas, contendo 0,7% (p/p) de mangiferina e 0,5% (p/p) de SPAp. A atividade antiviral, *in vivo*, foi realizada em camundongos Balb/c infectados por escarificação da pele e tratados com estas formulações, quatro horas após a infecção, em intervalos de aproximadamente três horas, exceto a noite, durante oito a dez dias. A análise histológica da pele dos animais também foi realizada. As concentrações citotóxicas de 50% (CC₅₀) foram acima de 500 µg/mL para mangiferina e de 47,81 µg/mL para SPAp. As concentrações inibitórias 50% (CI₅₀) para mangiferina foram de 2,9 µg/mL (Índice de seletividade - IS > 172,4) e 3,5 µg/mL (IS > 142,8), para as cepas AR-29 e KOS, respectivamente. A mangiferina inibiu principalmente a cepa AR-29, por contato direto com o vírus, mas também foi capaz de interferir nos processos de adsorção e síntese de proteínas. As CI₅₀ encontradas para SPAp foram de 0,54 µg/mL (IS = 88,5) e 0,49 µg/mL (IS = 97,5), para as cepas AR-29 e KOS, respectivamente. No ensaio antiviral, *in vivo*, os animais tratados com as formulações contendo mangiferina e SPAp apresentaram um atraso no desenvolvimento e na progressão das lesões de pele em comparação ao grupo controle. Portanto, estas formulações exibiram atividade anti-herpética promissora, com ênfase na potencialidade da mangiferina no controle da infecção pela cepa AR-29, resistente ao aciclovir.

Palavras-chave: Mangiferina. *Adenantha pavonina*. Herpes simplex. Formulações. Antiviral. Resistência. Aciclovir.

RECHENCHOSKI, Daniele Zendrini. **Development and evaluation of the action of formulations containing polysaccharide of *Adenantha pavonina* and mangiferin against herpesvirus, *in vivo***. 2019. 98 p. Thesis (Doctorate in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

The high prevalence of herpes simplex virus (HSV) infections and the emergence of resistant strains to acyclovir have stimulated the search and development of new antiviral agents. In this context, the natural products represent an excellent source of discovery of bioactive compounds with great structural and chemical diversity, capable of presenting multiple mechanisms of action and, in general, with low toxicity. Mangiferin is a glycosylated xanthone found in many plant species, among them the mango tree (*Mangifera indica*). *Adenantha pavonina* is a native tree of Africa and Asia, introduced in Brazil for reforestation and wood industry. Both are traditionally used for the treatment of many diseases and have several pharmacological activities described scientifically, including antiviral activity. The aim of this study was to investigate the anti-HSV-1 activity of mangiferin and sulfated polysaccharide of *A. pavonina* (SPAp), as well as, to develop topical formulations containing these compounds. Two viral strains were used, one resistant (AR-29) and another sensitive (KOS) to acyclovir. The cytotoxicity of the compounds was evaluated by the colorimetric assay (dimethyl-thiazolyl-diphenyltetrazolium bromide), in Vero cells. The *in vitro* antiviral activity was previously performed by plaque reduction assay, using different treatment protocols, such as, time 0 h, virucidal and inhibition of adsorption for mangiferin and simultaneous for SPAp. Inhibition of ICP4 protein synthesis by mangiferin was also evaluated by the immunofluorescence assay. Topical formulations were developed containing 0.7% (w/w) mangiferin and 0.5% (w/w) SPAp. The *in vivo* antiviral activity was performed in Balb/c mice infected by skin scarification and treated with these formulations, four hours after infection, at approximately three hour intervals, except at night, for eight to ten days. Histological analysis of the skin of animals was also performed. The cytotoxic concentrations 50% (CC₅₀) were above 500 µg/mL for mangiferin and of 47.81 µg/mL for SPAp. The inhibitory concentrations 50% (IC₅₀) for mangiferin were 2.9 µg/mL (Selectivity index - SI > 172.4) and 3.5 µg/mL (SI > 142.8), for strains AR-29 and KOS, respectively. Mangiferin inhibited mainly the AR-29 strain, by direct contact with the virus, but was also able of interfering in the processes of adsorption and protein synthesis. The IC₅₀ found for SPAp were 0.54 µg/mL (SI = 88.5) and 0.49 µg/mL (SI = 97.5) for the AR-29 and KOS strains, respectively. In the *in vivo* antiviral assay, the animals treated with the formulations containing mangiferin and SPAp presented a delay in the development and progression of skin lesions in comparison to control group. Therefore, these formulations exhibited promising anti-herpetic activity, with emphasis in the potentiality of mangiferin in the control of infection by strain AR-29, aciclovir resistant.

Keywords: Mangiferin. *Adenantha pavonina*. Herpes simplex. Formulations. Antiviral. Resistance. Acyclovir.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A) Representação diagramática dos principais componentes estruturais do HSV; B) Micrografia eletrônica do HSV	22
Figura 2 - Interações moleculares que ocorrem durante a adsorção e a penetração do HSV nas células	25
Figura 3 - Envelopamento e saída do HSV da célula hospedeira	28
Figura 4 - Etapas do ciclo de replicação do HSV	29
Figura 5 - Fases de estabelecimento e reativação da latência do HSV	31
Figura 6 - Representação da manifestação clínica da reativação do HSV. A) Vesículas produzidas pelo HSV no período clínico ativo; B) Vesículas secas formando crostas no período reparatório da infecção.....	33
Figura 7 - Resumo das técnicas disponíveis de diagnóstico da infecção pelo HSV	35
Figura 8 - Pesquisa e desenvolvimento de algumas vacinas para o HSV-2	38
Figura 9 - Mecanismo de ação do aciclovir nas células infectadas pelo HSV.....	39
Figura 10 - Folhas, frutos e flores da mangueira (<i>Mangifera indica</i>)	43
Figura 11 - Aspectos gerais da árvore e semente de <i>Adenanthera pavonina</i>	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos herpesvírus humanos (HHV)	20
Tabela 2 - Glicoproteínas do envelope do HSV e suas respectivas funções	24
Tabela 3 - Proteínas precoces imediatas codificadas pelo genoma do HSV	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-OS-HS	Sulfato de heparana 3-O-sulfatado
a.C	Antes de Cristo
A/T -	Adenina/timina
ACV	Aciclovir
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
Alfa-TIF	<i>alfa- Trans-inducing factor</i>
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
Ap -	<i>Adenantha pavonina</i>
BF -	Formulação base - sem mangiferina
BoHV-1	Herpesvírus bovino tipo 1
CC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50%
CMV	Citomegalovírus
CPE	Efeito citopático
CS	Sulfato de condroitina
CV	Viabilidade celular
CVB3	Coxsackievírus B3
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EBV	Vírus Epstein-Barr
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FM	Formulação contendo 0,7% de mangiferina
G	Glicoproteínas
G/C	Guanina/citosina
HCF	Fator celular do hospedeiro
HE	Hematoxilina eosina
HeLa	Células de carcinoma uterino humano
HEp-2	élulas epiteliais de carcinoma de laringe humano
HHV	Herpesvírus humanos
HHV-1	Herpesvírus humano tipo 1

HHV-2	Herpesvírus humano tipo 2
HHV-3	Herpesvírus humano tipo 3
HHV-4	Herpesvírus humano tipo 4
HHV-5	Herpesvírus humano tipo 5
HHV-6	Herpesvírus humano tipo 6
HHV-7	Herpesvírus humano tipo 7
HHV-8	Herpesvírus humano tipo 8
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HS	Sulfato de heparana
HSV	Vírus herpes simplex
HSV-1	Vírus herpes simplex tipo 1
HSV-2	Vírus herpes simplex tipo 2
HVEM	Receptor mediador de entrada de herpesvírus
ICP	<i>Infected cell protein</i>
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus
IDU	Iododesoxiuridina
IFA	Ensaio de Imunofluorescência
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL-6	Interleucina-6
IRF3	Fator regulatório 3 de interferons
IS	Índice de seletividade
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
JNK	Quinase c-jun N-terminal
Kpb	Kilopares de bases
KSHV	Herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi
LAHip	Laboratório de Análise Histopatológica
LATs	Transcritos associados à latência
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LITD	Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos
MAG	Glicoproteína associada à mielina
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-difeniltetrazólio

ND10	Domínio nuclear 10
NGF	Fator de crescimento do nervo
nm	Nanômetros
NMHC-IIA	Cadeia pesada de miosina IIA não muscular
OBP	Proteína de ligação à origem
Oct-1	Octâmero 1
Oct-2	Octâmero 2
OD	Densidade ótica
ORF	Quadros abertos de leitura
PAP	Polissacarídeo de <i>Adenantha pavonina</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFU	Unidade formadora de plaque
pH	Potencial hidrogeniônico
PILRa	<i>Paired immunoglobulin-like receptor</i>
PKA	Proteína quinase A
PODs	Domínios oncogênicos da proteína nuclear da leucemia promielocítica
PRA	Ensaio de redução de plaque
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
SD	Desvio padrão
SNC	Sistema nervoso central
SPAP	Polissacarídeo sulfatado de <i>Adenantha pavonina</i>
SSB	Proteína de ligação ao DNA de fita simples
TAP	Proteína transportadora associada com o processamento do antígeno
TK	Timidino quinase
UTM	Meio de transporte universal
Vero	Células epiteliais de rim de macaco verde africano (<i>Cercopithecus aethiops</i>)
VHS	<i>Virion host shut-off protein</i>
VI	Inibição viral
VP	<i>Virion protein</i>
VZV	Vírus varicela-zoster
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	VÍRUS HERPES SIMPLEX	19
3.1.1	Histórico	19
3.1.2	Família <i>Herpesviridae</i>	20
3.1.3	Estrutura do HSV.....	22
3.1.4	Replicação Viral	24
3.1.5	Patogênese	29
3.1.6	Manifestações Clínicas	33
3.1.7	Diagnóstico Laboratorial	34
3.1.8	Vacinas	37
3.1.9	Tratamento	38
3.1.10	Epidemiologia.....	40
3.2	PRÍNCÍPIOS ATIVOS DE ORIGEM NATURAL	42
3.2.1	Mangiferina.....	43
3.2.2	<i>Adenantha pavonina</i>	44
	REFERÊNCIAS	46
4	ARTIGOS	56
4.1	ARTIGO I.....	56
4.1.1	PATENTE	82
4.2	ARTIGO II	83
5	CONCLUSÃO	98

1 INTRODUÇÃO

As infecções virais continuam sendo responsáveis por elevadas taxas de morbidade e mortalidade, sendo notória a ameaça que elas representam principalmente à saúde pública, além de gerarem um pesado ônus socioeconômico. As infecções causadas pelo vírus herpes simplex (HSV), por exemplo, estão entre as infecções humanas mais comuns, apresentando grande importância médica e epidemiológica (CHENTOUFI et al., 2012).

Uma vez adquirido, o vírus persiste no organismo por toda a vida do hospedeiro, pois tem a capacidade de estabelecer latência, sendo reativado periodicamente. As infecções causadas por estes vírus são, normalmente, benignas. Porém, um aumento da morbidade e da mortalidade é reportado em indivíduos transplantados, imunossuprimidos ou em recém-nascidos. A intervenção terapêutica ainda é uma estratégia crucial no controle das infecções por HSV, devido à ausência de uma vacina efetiva e segura disponível para preveni-las (BRODOEFEL et al., 2012; CARDOZO et al., 2013; CAVINESS, 2013).

Clinicamente, vários análogos de nucleosídeos têm sido utilizados para tratar a infecção por HSV, pois inibem a replicação viral e reduzem a frequência das ulcerações. Dentre eles, o aciclovir (ACV), que por apresentar um alto índice de seletividade, é considerado o fármaco de escolha. Entretanto, o número de indivíduos infectados com HSV resistente ao ACV e, conseqüentemente, aos seus pró-fármacos, tem aumentado de forma significativa. Este fato, corrobora a necessidade da pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos anti-herpéticos, com mecanismos de ação diferenciados, que atuem em outras etapas da replicação viral ou em sinergismo com os fármacos já disponíveis (FROBERT et al., 2014). As terapias antivirais de segunda linha para infecções por HSV resistentes ao ACV consistem no uso de fosfonoformato (foscarnet) e cidofovir, porém eles podem desencadear diversos efeitos colaterais, além da inconveniência da administração, que deve ser realizada em ambiente ambulatorial (JAMES; PRICHARD, 2014).

Os primeiros indícios da utilização de compostos derivados de plantas como produtos medicinais foram representados em tábuas de argila na Mesopotâmia (2.600 a.C.) e estes continuam sendo a fonte mais comum para o tratamento de várias doenças (BERNARDINI et al., 2018). Estima-se que um terço dos medicamentos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA), nos últimos vinte anos, são baseados em ativos naturais ou seus derivados (THOMFORD et al., 2018). Os ativos naturais são, em geral, metabólitos secundários produzidos e utilizados pelos organismos para fins de defesa ou

adaptação. Como potenciais medicamentos antivirais, eles oferecem algumas vantagens, tais como, efeitos colaterais reduzidos, baixa toxicidade, múltiplos mecanismos de ação, com menor seleção de cepas resistentes. Além disso, apresentam uma grande diversidade química, resultado de milhões de anos de evolução, com modificação das vias biossintéticas das plantas, em resposta a várias tensões bióticas e abióticas (HASSAN; MASARČÍKOVÁ; BERCHOVÁ, 2015; BERNARDINI et al., 2018). Os ambientes tropicais, como os biomas brasileiros, oferecem um potencial particularmente rico em compostos biologicamente ativos com estruturas únicas e que podem contribuir para a descoberta de novos fármacos (BOLZANI et al., 2012).

A mangiferina é uma xantona glicosilada isolada de várias plantas, tais como a mangueira (*Mangifera indica*), que pertence à família *Anacardiaceae*. Ela exerce efeito preventivo e terapêutico contra uma considerável gama de doenças, pois apresenta as seguintes atividades farmacológicas: antitumoral (GOLD-SMITH; FERNANDEZ; BISHOP et al, 2016), imunomoduladora (RAJENDRAN et al., 2013), anti-inflamatória (SAHA; SADHUKHAN; SIL, 2016), antinociceptiva (LOPES et al., 2013) e antimicrobiana (SINGH et al., 2012). Em razão do grande número de estudos farmacológicos mostrando os efeitos benéficos da mangiferina para a saúde, tem tido um interesse no desenvolvimento de formulações contendo esta substância polifenólica (CANUTO, 2009).

Adenantha pavonina é uma planta da família *Fabaceae*, conhecida popularmente como “carolina” ou “olho de pavão”. Alguns estudos evidenciam o uso desta planta para finalidade medicinal, demonstrando sua atividade anti-inflamatória (JAYAKUMARI et al., 2012), antioxidante (MUJAHID et al., 2015), anti-hipertensiva (ADEDAPPO et al., 2009) e antimicrobiana (ADEYEMI et al., 2015). Em especial, seus polissacarídeos sulfatados têm sido reportados como potentes inibidores virais. Eles mimetizam o receptor celular sulfato de heparana, por apresentarem uma alta densidade de carga negativa e desta forma bloqueiam a adsorção do vírus às células (GHOSH et al., 2008).

Neste contexto, o desenvolvimento de novas formulações contendo diferentes compostos anti-HSV torna-se necessário, devido à alta prevalência de infecções por HSV e à emergência de cepas resistentes ao aciclovir (NOCCHI, 2016). Este trabalho teve a finalidade de investigar a atividade anti-HSV-1 de formulações contendo mangiferina e polissacarídeo sulfatado de *A. pavonina*. A triagem desses compostos ativos de origem natural pode direcionar a execução de estudos mais aprofundados e promover a inserção dessas substâncias como opções para o controle e tratamento da infecção por HSV.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito antiviral, *in vivo*, de formulações farmacêuticas contendo mangiferina e polissacarídeo sulfatado de *Adenanthera pavonina*, além do efeito, *in vitro*, dos mesmos em etapas da replicação do HSV.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar a toxicidade dos compostos em células Vero, utilizando o teste do MTT;
- b) Analisar o efeito dos compostos nas várias etapas da replicação viral, *in vitro*, utilizando diferentes protocolos de tratamento (ensaio de redução de plaque e imunofluorescência);
- c) Desenvolver formulações tópicas contendo a mangiferina e o polissacarídeo sulfatado de *Adenanthera pavonina*;
- d) Analisar o efeito antiviral, das formulações, *in vivo*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 VÍRUS HERPES SIMPLEX

3.1.1 Histórico

As primeiras descrições de lesões genitais herpéticas foram feitas nas Tábuas Sumerianas (3.000 a.C.) e no Papiro de Ebers (1.500 a.C.), um dos tratados médicos mais antigos. Hipócrates, célebre médico grego, foi o primeiro a utilizar a palavra "herpes" para relatar como as lesões ulcerativas da doença pareciam se arrastar ou rastejar pela pele. O historiador grego Heródoto descreveu a infecção herpética como capaz de causar vesículas nos lábios e úlceras na boca além de febre, denominando-a de "*herpes febrilis*" (PELLET; ROIZMAN, 2013). Porém, no início a palavra "herpes" foi usada, genericamente, para descrever muitas doenças de pele, do lúpus ao zoster. A definição de herpes tornou-se mais rigorosa apenas no século XVII. Posteriormente, o médico Galeno notou que as recorrências se desenvolviam no mesmo local anatômico e dizia que as lesões eram uma maneira de o corpo liberar os humores malignos, denominando-as de excretinas herpéticas (PARKS, 2006; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015). Em 1736, um relato importante sobre a doença foi feito por Jean Astruc, médico do rei Luís XIV, ao perceber a ocorrência de herpes genital em prostitutas francesas (PELLET; ROIZMAN, 2013).

Experimentos realizados por Vidal (1873), em humanos, e Gruter (1924), em coelhos, demonstraram pela primeira vez que o vírus poderia ser transmitido através do material obtido de lesões vesiculares. Lowestein repetiu e aprimorou os experimentos realizados por Gruter e foi reconhecido pela comunidade científica como o responsável pelo primeiro isolamento do vírus em 1919 (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015). Uma descoberta verdadeiramente revolucionária sobre os herpesvírus foi feita por Andrewes e Carmichael (1930), que mostraram que o herpes labial recorrente ocorria apenas em adultos que já tinham anticorpos neutralizantes contra o vírus. Os pesquisadores Nahmias e Dowdle (1968) classificaram o vírus herpes no gênero *Simplex* e, com base em diferenças antigênicas e biológicas foi dividido em herpes simplex 1 (HSV-1) e herpes simplex 2 (HSV-2).

3.1.2 Família *Herpesviridae*

Os herpesvírus são muito antigos e podem ser encontrados infectando mamíferos, aves, répteis, peixes e até mesmo moluscos. Existem mais de cem membros diferentes, dos quais nove infectam humanos: herpes simplex 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2), vírus varicela-zoster (VZV), vírus Epstein-Barr (EBV), citomegalovírus (CMV), herpesvírus humano tipo 6A, 6B e 7 (HHV-6A e HHV-6B e HHV-7) e o herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV). O Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV), com base nas propriedades biológicas, morfológicas, dados antigênicos e sequenciamento genético, dividiu os herpesvírus em três subfamílias, denominadas *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae* (DAVISON, 2010; RIDDELL; JEFFERY-SMITH; TONG, 2017). A classificação dos herpesvírus humanos em suas respectivas subfamílias pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação dos herpesvírus humanos (HHV)

Subfamília	Gênero	Vírus	Abreviaturas
α	<i>Simplexvirus</i>	Herpes simplex 1	HHV-1 / HSV-1
		Herpes simplex 2	HHV-2 / HSV-2
	<i>Varicellovirus</i>	Varicela-zoster	HHV-3 / VZV
β	<i>Cytomegalovirus</i>	Citomegalovírus	HHV-5 / CMV
	<i>Roseolovirus</i>	Herpesvírus 6A, 6B	HHV-6A, HHV-6B
		Herpesvírus 7	HHV-7
γ	<i>Lymphocryptovirus</i>	Epstein-Barr	HHV-4 / EBV
	<i>Rhadinovirus</i>	Herpesvírus 8	HHV-8 / KSHV

Fonte: adaptado de Riddell, Jeffery-Smith e Tong (2017)

Os membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* (HSV-1, HSV-2 e VZV) têm uma ampla gama de hospedeiros, ciclos reprodutivos curtos e estabelecem latência em células neuronais sensoriais. O HSV geralmente causa infecções orais ou genitais, o que pode resultar em uma ampla gama de condições clínicas, desde lesões cutâneas autolimitadas até encefalite fatal. O VZV causa a doença infantil varicela, mais comumente conhecida como catapora, caracterizada por lesões cutâneas disseminadas. Este vírus estabelece latência e, principalmente em idosos, a reativação resulta em herpes zoster, uma erupção vesicular

localizada (KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014; RIAZ; MURTAZ-UL-HASAN; AKHTAR, 2017).

Diferentemente, a subfamília *Betaherpesvirinae* (CMV, HHV-6A e 6B e HHV-7) inclui vírus com uma variedade restrita de hospedeiros, ciclo reprodutivo longo, com progressão lenta da infecção. As células infectadas tornam-se maiores (citomegalia), ao invés de sofrerem lise. Neste caso, a infecção latente localiza-se nas glândulas secretoras, células linforreticulares e outros tecidos. Condições clínicas graves do CMV são geralmente observadas em neonatos e indivíduos imunossuprimidos. A infecção congênita pelo CMV, por exemplo, pode resultar em púrpura, hepatoesplenomegalia, microcefalia e perda auditiva (KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014; RIAZ; MURTAZ-UL-HASAN; AKHTAR, 2017). O HHV-6 e o HHV-7 também são conhecidos como roseolovírus, porque a infecção primária por esses vírus causa a *roseola infantum*, uma doença caracterizada por erupções cutâneas e febre em crianças com menos de quatro anos de idade (CRUZ-MUÑOZ; FUENTES-PANANÁ, 2018). Posteriormente, duas variantes do HHV-6 foram reconhecidas, HHV-6A e HHV-6B, devido a diferenças genéticas, variações na reatividade com anticorpos monoclonais, tropismo celular e manifestações das doenças (DOCKRELL, 2003).

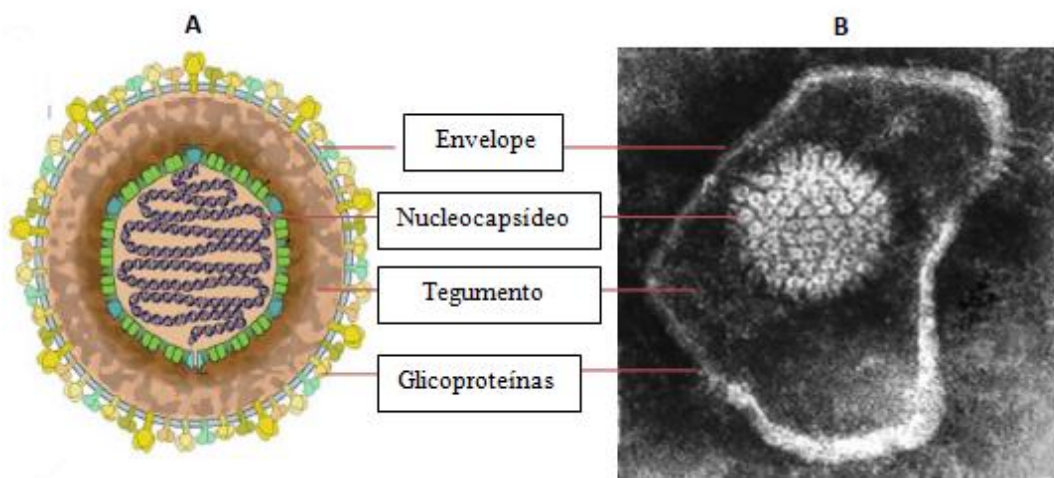
Por fim, os membros da subfamília *Gammaherpesvirinae* (EBV e KSHV) têm um espectro limitado de hospedeiros e estabelecem e mantêm latência em células B ou T. O EBV causa a mononucleose infecciosa e também tem sido associado a numerosos linfomas em indivíduos imunossuprimidos como o linfoma de Burkitt, o linfoma de Hodgkin, o carcinoma nasofaríngeo e a doença linfoproliferativa pós-transplante (RIAZ; MURTAZ-UL-HASAN; AKHTAR, 2017). O KSHV é menos prevalente que o EBV, mas tem uma associação semelhante com distúrbios linfoproliferativos e malignidades. Ele é responsável por causar principalmente o sarcoma de Kaposi, mas também pode gerar o linfoma de efusão primário e a doença de Castleman (RIDDELL; JEFFERY-SMITH; TONG, 2017).

Entretanto, apesar das diferenças relatadas, os herpesvírus têm algumas propriedades biológicas comuns, incluindo a codificação de diferentes enzimas importantes para a síntese e metabolismo do ácido nucleico viral (timidino quinase, DNA polimerase) e regulação de proteínas (cinases). A replicação dos herpesvírus ocorre no núcleo e todos são capazes de estabelecer e manter latência na célula hospedeira (RIAZ; MURTAZ-UL-HASAN; AKHTAR, 2017).

3.1.3 Estrutura do HSV

O vírion consiste em quatro componentes: (I) o genoma de DNA fita dupla linear, (II) um capsídeo icosaédrico, (III) um tegumento contendo mais de 20 proteínas que circundam o capsídeo, e (IV) um envelope de bicamada lipídica com glicoproteínas (KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014), como representado na Figura 1.

Figura 1 - A) Representação diagramática dos principais componentes estruturais do HSV; B) Micrografia eletrônica do HSV



Fonte: adaptado de Riaz, Murtaz-Ul-Hasan e Akhtar (2017)

O genoma fita dupla linear do HSV possui 152 kbp de comprimento com 68% de G/C, mais de 90 quadros abertos de leitura (*open reading frames* – ORF) e codifica pelo menos 84 proteínas diferentes. Ele é composto por duas regiões de sequências únicas (U), designadas de L (*long*) e S (*short*), U_L e U_S , respectivamente, ligadas covalentemente umas às outras e separadas por um conjunto de repetições invertidas (KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014; SZCZUBIALKA; PYRĆ; NOWAKOWSKA, 2016). O HSV possui três origens de replicação (*ori*): uma cópia do *oriL* e duas cópias do *oriS*. Estas origens são sequências palindrômicas e qualquer uma das três regiões é suficiente para iniciar a replicação (VADLAPUDI; VADLAPATLA; MITRA, 2013).

O capsídeo é formado pelas proteínas virais (VP- *virion protein*): VP5 (U_L19), VP26 (U_L35), VP23 (U_L18) e VP19C (U_L38). Ele é icosaédrico, com diâmetro externo de 100-110 nm e é formado por 162 capsômeros, incluindo 150 hexons e 12 pentons, cada um contendo

seis ou cinco cópias, respectivamente, da principal proteína do capsídeo, a VP5. Além disso, seis cópias de VP26 ocupam as superfícies externas dos hexons formados por VP5. Uma única molécula de VP19C e duas cópias de VP23 formam um triplex que liga os capsômeros circundantes, conectando-os. O capsídeo contém também a proteína codificada pelo gene *UL6*, que forma um dodecâmero constituindo um portal, através do qual ocorre o empacotamento e a liberação do DNA viral e, a protease VP24 (*UL26*), que desempenha um papel importante durante a encapsidação do DNA (DAVISON, 2010; KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014; RIAZ; MURTAZ-UL-HASAN; AKHTAR, 2017).

O tegumento, localizado entre o capsídeo e o envelope, é composto por cerca de 26 proteínas. Algumas delas participam no transporte do capsídeo para o núcleo e outras organelas (*UL36*, *UL37*, ICP0, *infected cell protein*), na entrada do DNA viral no núcleo (VP1-2, *UL36*), na ativação da transcrição de genes precoces imediatos (VP16, também conhecida a *α -trans-inducing factor* - α -TIF, *UL48*) e na supressão da biossíntese de proteínas celulares e degradação de RNAm (VHS ou *virion host shut-off protein* - VP22, *UL41*) (KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015; RIAZ; MURTAZ-UL-HASAN; AKHTAR, 2017).

Externamente ao tegumento, encontra-se o envelope do vírion, que consiste em uma bicamada lipídica, com aproximadamente onze proteínas diferentes. Dessas, nove são glicoproteínas (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gL, gM), e contém pelo menos mais duas proteínas de membrana não glicosiladas, codificadas pelos genes *UL20* e *US9* (KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015). Embora o HSV-1 e o HSV-2 compartilhem 83% do genoma e mais de 85% do perfil proteico, eles têm uma diferença antigênica proeminente na glicoproteína G (ALDISI et al., 2018). A função principal de cada glicoproteína do envelope está descrita na Tabela 2. Esta bicamada lipídica é derivada da membrana celular durante a saída do vírus por exocitose. O tamanho do vírus aumenta para aproximadamente 300 nm após a inclusão do tegumento e envelope (RIAZ; MURTAZ-UL-HASAN; AKHTAR, 2017).

Tabela 2 - Glicoproteínas do envelope do HSV e suas respectivas funções

Glicoproteína	Função
gB	Participa nos processos de adsorção e fusão à célula hospedeira
gC	Interage com HS ou CS durante a adsorção/ Afinidade pelo fator C3 do complemento
gD	Interage com os receptores nectina, HVEM e 3-OS-HS/ Protege a célula da apoptose
gE	Participa do transporte dos vírions/ Receptor para fração Fc de imunoglobulinas
gG1 e gG2	Diferencia a infecção pelo HSV-1 ou HSV-2 em testes sorológicos
gH	O complexo gH-gL permite a fusão entre o envelope e a membrana
gI	O complexo gE-gI constitui um receptor viral para Fc na IgG
gL	Regula a atividade fusogênica de gH
gM	Participa da disseminação célula-célula

HS = sulfato de heparana; CS = sulfato de condroitina; HVEM = receptor mediador de entrada de herpesvírus; 3-OS-HS = sulfato de heparana 3-O-sulfatado

Fonte: Santos, Romanos e Wigg (2015)

3.1.4 Replicação Viral

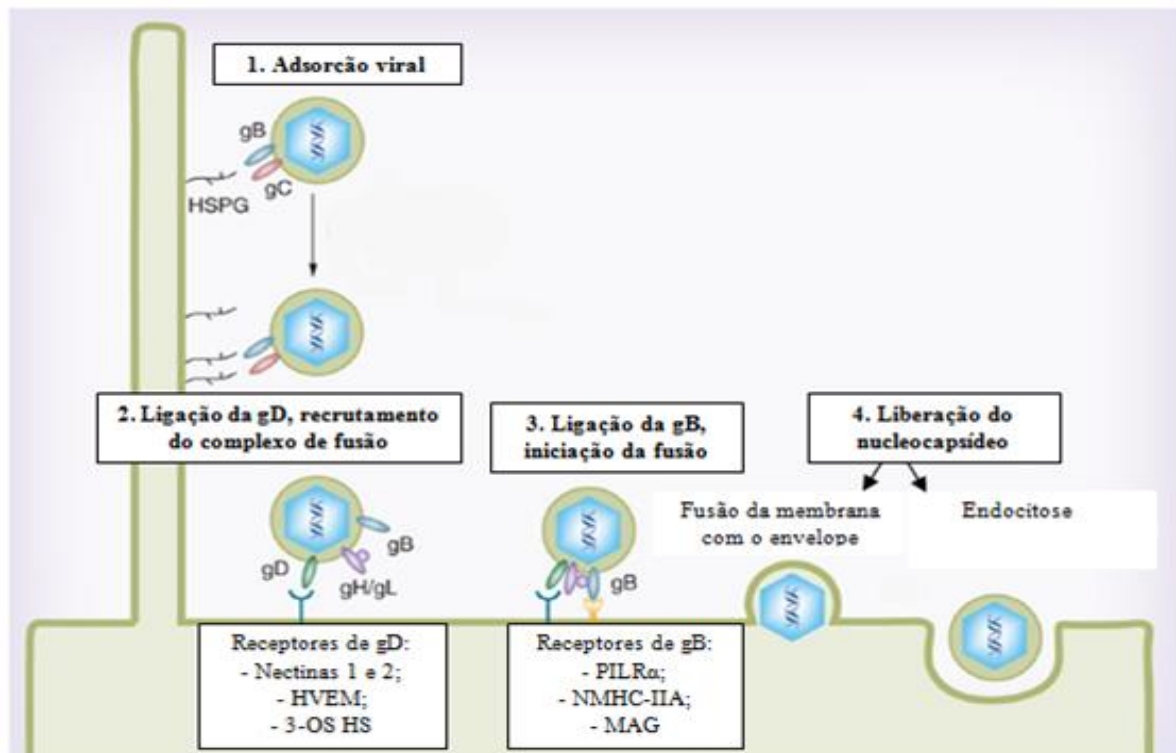
O HSV pode infectar uma variedade de células hospedeiras, como linfócitos, células epiteliais, fibroblastos e neurônios (VADLAPUDI; VADLAPATLA; MITRA, 2013). A infecção inicia-se através da adsorção do vírus às células, processo mediado pelas glicoproteínas virais gC e gB, que interagem com as cadeias de glicosaminoglicanas presentes na superfície celular, como sulfato de heparana (HS) e sulfato de condroitina (SC) (KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014).

A próxima etapa envolve uma ligação de alta afinidade da gD a um de seus receptores presentes na superfície celular, como o receptor mediador de entrada do herpesvírus (HVEM), as nectinas 1 e 2 e o sulfato de heparana 3-O-sulfatado (3-OS-HS) (KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014; AGELIDIS; SHUKLA, 2015). O HVEM é um membro da família dos receptores do fator de necrose tumoral, presente nos linfócitos T e vários tipos de células epiteliais oculares. As nectinas 1 e 2 são membros da superfamília de imunoglobulinas, envolvidas na adesão celular, com a nectina-1 servindo como o principal receptor de gD do HSV-1 em células de origem epitelial ou neuronal. A entrada do HSV-2 pode ser mediada pela nectina-1 ou nectina-2, mas a nectina-2 não

funciona na entrada do HSV-1 do tipo selvagem. Por fim, o 3-OS-HS medeia a entrada do HSV-1 em culturas primárias de fibroblastos da córnea, que não possuem expressão da nectina-1 e demonstram níveis muito baixos de HVEM (AGELIDIS; SHUKLA, 2015).

Assim, a ligação de gD a um de seus receptores desencadeia uma alteração conformacional que promove o recrutamento de um complexo de fusão, constituído pela glicoproteína gB e o heterodímero formado entre gH e gL, levando a fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula alvo, como representado pela Figura 2 (IBÁÑEZ et al., 2018). Estudos prévios também identificaram receptores específicos que ligam a gB independentemente do HS para promover a fusão viral. Um deles foi um receptor encontrado em monócitos, macrófagos e células dendríticas, PILR α , (*paired immunoglobulin-like receptor*) (SATO et al., 2008). O outro foi a glicoproteína associada à mielina (MAG), expressa em células gliais, sugerindo sua importância na regulação das interações mielina-axônio (SUENAGA et al., 2010). Por último, verificou-se que a cadeia pesada de miosina IIA não muscular (NMHC-IIA) também poderia ser um receptor para a gB do HSV-1, sendo ela ubiquamente expressa nos tecidos humanos (ARII et al., 2010).

Figura 2 - Interações moleculares que ocorrem durante a adsorção e a penetração do HSV nas células



Fonte: adaptado de Agelidis e Shukla (2015)

Em relação à entrada do HSV na célula, há duas rotas principais: por fusão direta do envelope viral com a membrana plasmática da célula ou por endocitose, através da fusão do envelope viral com a membrana endocítica (KARASNEH; SHUKLA, 2011). Enquanto a primeira via é independente de pH, a segunda geralmente necessita de uma acidificação do endossomo. Gianni et al. (2013) indicaram que as integrinas $\alpha\beta6$ e $\alpha\beta8$ são receptores para gH/gL, promovendo especificamente a entrada viral pela via endocítica. A escolha entre essas duas rotas de entrada parece ser dependente do tipo celular. Em células Vero e HEp-2, a fusão direta do envelope com a membrana plasmática é provavelmente preferida. Entretanto, a endocitose tem sido relatada em tipos de células como HeLa, células epiteliais pigmentares da retina, queratinócitos epidérmicos e células epiteliais da conjuntiva humana (AGELIDIS; SHUKLA, 2015).

Após a fusão, o nucleocapsídeo viral e as proteínas do tegumento são liberados no citoplasma da célula hospedeira e transportados para o núcleo com o auxílio da dineína e da dinactina. Então, na superfície da membrana nuclear, o capsídeo associa-se com o complexo de poro nuclear. A proteína do tegumento codificada pelo gene *UL36* (VP1-2) e as nucleoporinas Nup 358 e Nup 214 são essenciais nesse processo. Assim que o DNA viral penetra no núcleo, ele é rapidamente circularizado pela DNA ligase IV/XRCC4 do hospedeiro (KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014; SZCZUBIAŁKA; PYRĆ; NOWAKOWSKA, 2016).

A proteína do tegumento VHS permanece no citoplasma e é responsável pela degradação do RNAm do hospedeiro, bloqueando a síntese de proteínas celulares. Já a transcrição dos genes do HSV-1 e subsequente expressão das proteínas virais é um processo bem regulado. Os genes virais são divididos em grupos α (precoces imediatos), β (precoces) e γ (tardios), traduzidos em diferentes momentos da infecção lítica, aumentando a eficiência do processo. Os genes α , primeiros a serem transcritos pela RNA polimerase II da célula hospedeira, ao contrário dos demais genes, contêm várias cópias da sequência consenso: 5'-GyATGnTAATGArATTCyTTGnGGG-3', onde y é uma pirimidina, r é uma purina e n é qualquer base. O fator celular de transcrição Oct-1 (octâmero-1) se liga a essa sequência. Então, a VP16 interage com este fator de transcrição e juntos com a proteína HCF-1 (fator celular do hospedeiro) formam um complexo que ativa a transcrição dos genes α . Esses genes são transcritos em RNAm e transportados para o citoplasma para que ocorra a tradução. As proteínas resultantes desta fase (ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 e *Us1.5*) voltam então para o núcleo, onde entre outras funções (Tabela 3), são responsáveis principalmente pelo estabelecimento da infecção, ativando a transcrição dos genes da fase seguinte

(KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014; MELLO, BLOOM; PAIXÃO, 2016; SZCZUBIALKA; PYRĆ; NOWAKOWSKA, 2016). A taxa de pico de síntese das proteínas α está entre 2 e 4 h após a infecção (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013).

Tabela 3 - Proteínas precoces imediatas codificadas pelo genoma do HSV

Proteína/Gene	Função
ICP0, $\alpha 0$	Promove a infecção e a expressão dos genes virais. Localiza-se próximo à ND10 para iniciar a replicação do ácido nucleico viral
ICP4, $\alpha 4$	Liga-se ao DNA e interage com os fatores de transcrição regulando positivamente a maioria dos genes α e β
ICP22, $\alpha 22$	Participa como mediador da fosforilação da RNA polimerase II. Necessária para o acúmulo de proteínas tardias
ICP27, U_L54	Bloqueia o <i>splicing</i> de RNAm e estimula a exportação de RNAm do núcleo
ICP47, $\alpha 47$	Bloqueia o transporte de peptídeos antigênicos para a apresentação de antígenos pelo MHC de classe I em células infectadas
$U_S1.5$	A maioria das funções conhecidas da proteína $\alpha 22$ pode ser extrapolada para essa proteína.

RNAm = RNA mensageiro; ND10 = domínios oncogênicos da proteína nuclear da leucemia promielocítica; ICP = *infected cell protein*; MHC = *major histocompatibility complex*.

Fonte: Santos, Romanos e Wigg (2015)

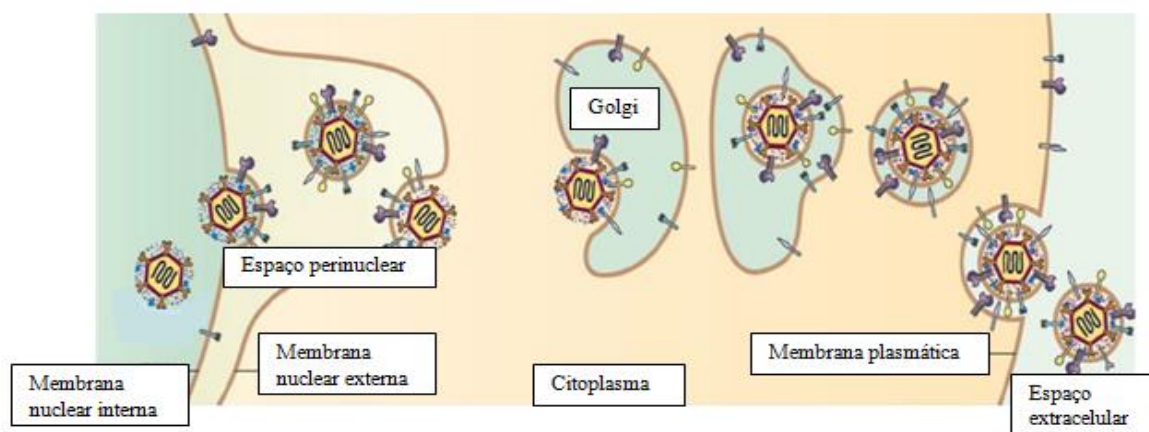
Após a transcrição dos genes α , inicia-se a fase precoce, responsável pela produção das proteínas β , cujo pico de síntese ocorre entre 6 e 12 h após a infecção (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013). Elas estão envolvidas na replicação do genoma viral, tais como, a DNA polimerase, formada pela subunidade catalítica codificada pelo gene U_L30 e o fator de processamento, codificado pelo gene U_L42 ; o complexo helicase – primase (U_L5 , U_L8 e U_L52); a proteína de ligação à origem (OBP, U_L9) e a proteína de ligação ao DNA de fita simples, ICP8 ou SSB (U_L29) e; no metabolismo dos nucleotídeos, como a timidino quinase (TK- U_L23). A síntese de DNA tem início próximo aos domínios nucleares do genoma celular denominados de PODs (domínios oncogênicos da proteína nuclear da leucemia promielocítica), também conhecidos como domínio nuclear 10 (ND10). O primeiro passo na replicação do DNA viral é o desenrolamento da dupla hélice pela OBP que se associa à ICP8 nas regiões ricas em A/T das origens de replicação oriL ou oriS. Então, o complexo helicase-primase é recrutado para origem, promovendo o desenrolamento do DNA e a síntese de um

iniciador (primer). Conseqüentemente, ocorre a formação de uma bolha, permitindo que a DNA polimerase exerça a sua função. Inicialmente, a replicação do DNA viral circularizado é por um mecanismo theta, que posteriormente é alterado para um mecanismo de círculo rolante (KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015).

Após a síntese do DNA viral, os genes tardios ou γ são transcritos e o pico de expressão ocorre entre 10 e 16 h após a infecção. Esses genes podem ser subdivididos em γ_1 ou “fugazes” e γ_2 ou verdadeiramente tardios. Os transcritos γ_1 são expressos em baixos níveis antes da replicação do DNA e alcançam níveis elevados assim que a replicação se inicia. Por outro lado, os transcritos γ_2 são difíceis de serem detectados até que termine a replicação do DNA (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015). A montagem dos capsídeos a partir das proteínas estruturais γ ocorre no núcleo. O capsídeo viral completo é formado por quatro proteínas (VP5, VP19C, VP23 e VP26). A encapsidação do DNA viral requer várias proteínas virais, incluindo a *UL6*, que forma um portal de entrada para o ácido nucleico. Um complexo de três proteínas virais, codificadas pelos genes *UL15*, *UL28* e *UL33*, foi proposto clivar os concatâmeros de DNA em monômeros durante a encapsidação (SZCZUBIAŁKA; PYRĆ; NOWAKOWSKA, 2016).

A Figura 3 representa o modelo mais aceito proposto para o egresso viral, no qual os capsídeos maduros fundem-se inicialmente com a membrana nuclear interna (envelopamento primário) e depois perdem esse envelope ao passar pela membrana nuclear externa. No citoplasma, os capsídeos passam por um envelopamento secundário por brotamento a partir do complexo de Golgi e são finalmente liberados das células infectadas (VADLAPUDI; VADLAPATLA; MITRA, 2013).

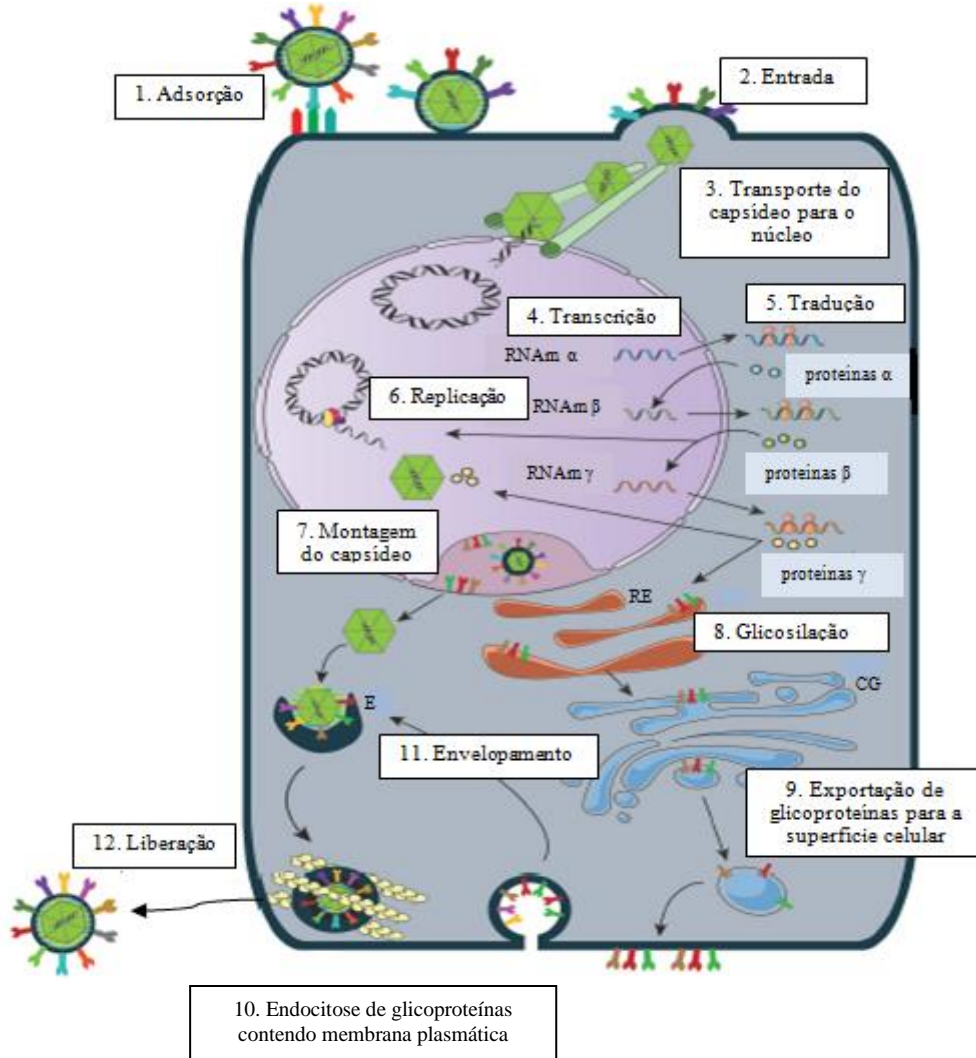
Figura 3 - Envelopamento e saída do HSV da célula hospedeira



Fonte: adaptado de Vadlapudi, Vadlapatla e Mitra (2013)

As principais etapas envolvidas na replicação do HSV estão sintetizadas na Figura 4.

Figura 4 - Etapas do ciclo de replicação do HSV



Fonte: adaptado de Ibáñez et al.(2018)

3.1.5 Patogênese

A patogênese da infecção pelo HSV é explicada pelos conhecimentos dos eventos de replicação, estabelecimento da infecção persistente latente e reativação viral. A transmissão do vírus envolve o contato íntimo e geralmente ocorre durante o beijo para o HSV-1 ou relação sexual para o HSV-2. Ambos os vírus também podem ser transmitidos verticalmente durante o parto normal (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015). O estabelecimento da latência inclui a infecção primária, a qual é caracterizada pela replicação viral no sítio de inoculação. Posteriormente, o vírus acessa os neurônios através de axônios terminais e libera o capsídeo,

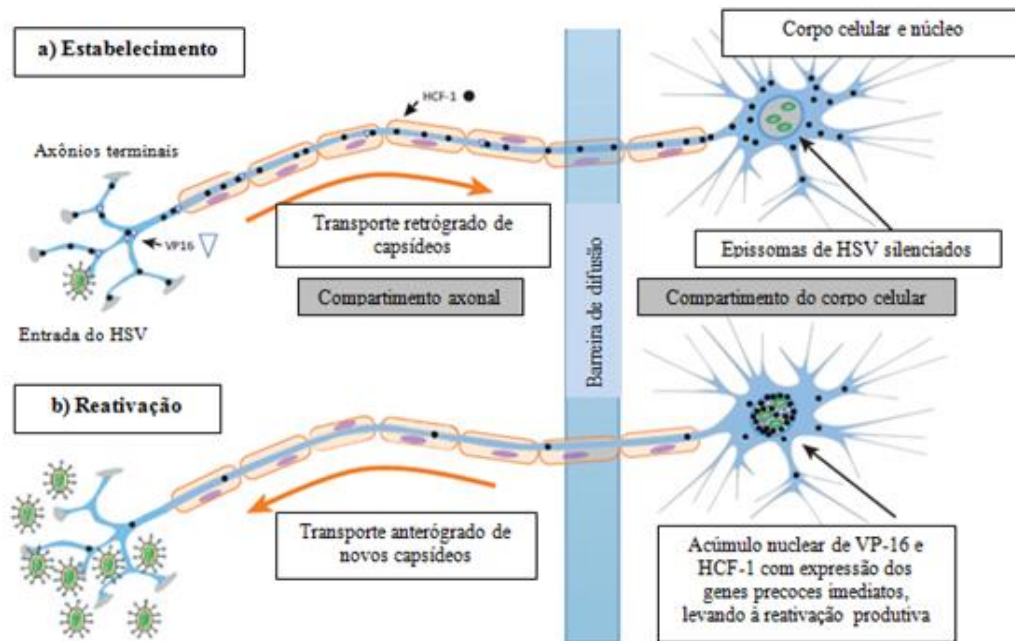
contendo o DNA, no citoplasma. Então, o genoma é levado por transporte axonal retrógrado até o núcleo do corpo celular localizado no gânglio e estabelece a latência (Figura 5), preferencialmente no gânglio trigêmeo para o HSV-1 e nos nervos lombossacrais para o HSV-2 (HAFEZI et al., 2012; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015).

No caso da latência, os genes necessários para a replicação produtiva não são expressos e a transcrição viral é limitada aos transcritos associados à latência (LATs). Eles são RNA produzidos por *splicing* e que formam um conjunto de RNA colineares transcritos de um *locus* que se situa na região repetida que flanqueia a região U_L (HAFEZI et al., 2012; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015). As funções mais importantes dos LATs são: reduzir a expressão dos genes líticos, proteger neurônios infectados da apoptose, estabelecer e manter o período de latência (MELLO, BLOOM; PAIXÃO, 2016). Investigando a composição dos epissomas latentes, demonstrou-se que as histonas associadas com genes reguladores líticos carregam marcas típicas de cromatina reprimida, nomeadamente a di- ou trimetilação da histona H3 lisina-9 (H3K9me_{2/3}) e lisina-27 (H3K27me₃) e níveis reduzidos de histonas acetiladas (WILSON; MOHR, 2012).

Alguns mecanismos podem prevenir a expressão dos genes líticos durante o período de latência, tais como, a ausência de fatores de transcrição, que se ligam aos genes promotores, nos neurônios sensoriais, a presença de repressores transcricionais do hospedeiro, como Oct-2, que impedem a ligação de Oct-1 aos genes promotores e, as proteínas que participam do complexo de pré-iniciação (VP16 e HCF-1) e são importantes para ativar o gene ICP0, permanecerem no citoplasma das células neuronais. Além disso, foi demonstrado que a latência ocorre em neurônios dependentes do fator de crescimento do nervo (NGF) (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015; MELLO, BLOOM; PAIXÃO, 2016).

Os estímulos desencadeadores da reativação podem ocasionar muitas alterações nos neurônios, incluindo o acúmulo nuclear de HCF-1 e VP16, juntamente com outras proteínas reguladoras. A transcrição lítica viral por VP16 leva à amplificação do DNA viral e síntese de proteínas do vírion. Os capsídeos são então transportados de forma anterógrada para os terminais axonais onde estão maduros e são liberados (Figura 5) (WILSON; MOHR, 2012).

Figura 5 - Fases de estabelecimento e reativação da latência do HSV



Fonte:

adaptado de Wilson e Mohr (2012)

Alguns dos estímulos desencadeadores da reativação são: estresse emocional ou físico, febre, exposição à luz ultravioleta e desequilíbrio hormonal. Durante períodos de grande estresse emocional, por exemplo, ocorre ativação do sistema nervoso simpático e liberação de catecolaminas, bem como a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e liberação de glicocorticoides. Posteriormente, a ligação da epinefrina ao receptor β 2-adrenérgico, expresso em neurônios sensoriais e simpáticos, ativa a adenilato ciclase, aumentando os níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc). Na reativação mediada pela febre e pela exposição à radiação ultravioleta, sugere-se o envolvimento da liberação de citocinas pirogênicas, como IL-6 e, prostaglandinas, no primeiro caso, e de cortisol, no segundo (HAN et al., 2017; BLACK et al., 2018; SUZICH; CLIFFE, 2018). De forma geral, o acúmulo de AMPc, posteriormente ativa a proteína quinase A (PKA). A indução de PKA aparentemente ativa a quinase c-jun N-terminal (JNK), que pode fosforilar a histona H3, permitindo a ativação transcricional dos promotores (CLIFFE et al., 2015).

Quando ocorre a replicação viral, algumas mudanças que afetam a integridade celular são observadas como, destruição dos cromossomos, desaparecimento do nucléolo, fragmentação do complexo de Golgi e rearranjo dos microtúbulos. As características histopatológicas de uma infecção primária ou recorrente refletem a morte celular mediada

pelo vírus e pela resposta inflamatória do hospedeiro. Com a lise celular, um fluido claro contendo grandes quantidades de vírus aparece entre a epiderme e a camada dérmica. Este líquido contém restos celulares, células inflamatórias e, frequentemente, células gigantes multinucleadas. A patologia é parecida na infecção primária e nas recorrências, mas a resposta inflamatória tem menor intensidade no último caso. Todas as alterações celulares que ocorrem durante a replicação viral possibilitam o ambiente necessário para a síntese do DNA, aumento da glicosilação e exocitose viral, além de prevenir a resposta do hospedeiro contra a infecção (WHITLEY; KIMBERLIN; PROBER, 2007; ROIZMAN; KNIPE, WHITLEY, 2013).

A resposta inicial do hospedeiro é inflamatória inespecífica e surge paralelamente à infecção viral na célula. Ao mesmo tempo, ocorre indução da resposta específica, com recrutamento de mais células efetoras ao local de infecção inicial (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015). Evolutivamente, o HSV desenvolveu várias estratégias que o auxiliam na evasão do sistema imune do hospedeiro. A participação de glicoproteínas virais tem sido descrita. Para neutralizar o efeito do sistema complemento, por exemplo, a gC do envelope viral liga-se ao C3b do sistema complemento, bloqueando a quimioatração de células imunes e a formação do complexo de ataque à membrana. Além da gC, a gE tem uma alta afinidade pelo domínio Fc da IgG e, assim, bloqueia a ativação do complemento, a citotoxicidade mediada por anticorpos e a fagocitose. Outro mecanismo mediado pelo HSV é a interferência na sinalização celular, pois a proteína ICP0 é capaz de inibir o fator regulatório 3 de interferons (IRF3), bloqueando a transcrição dos genes que codificam interferons tipo I (IFN- α e IFN- β) (KUMAR et al., 2016; RETAMAL-DÍAZ et al., 2016). O HSV também é capaz de bloquear processos que conduzam à apoptose celular, através de gD, ICP10PK e *UL14* e também, a maturação de células dendríticas. Por fim, o vírus também interfere na apresentação dos antígenos ao bloquear a função da proteína TAP hospedeira (transportadora associada ao processamento de antígeno), que transloca os peptídeos do citoplasma para o retículo endoplasmático rugoso e liga-os às moléculas de MHC-I (*major histocompatibility complex*). Esta inibição é mediada por ICP47 e *Us3* (RETAMAL-DÍAZ et al., 2016).

3.1.6 Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas das infecções pelo HSV dependem do local de entrada ou instalação da infecção, do estado imune do hospedeiro e também se a infecção é primária ou recorrente (LAWRENCE et al., 2016). A gengivoestomatite herpética primária se desenvolve quando um indivíduo não imune é exposto ao HSV-1 pela primeira vez. A maioria dos casos afeta crianças de 1 a 5 anos e é subclínica. Os pacientes sintomáticos apresentam linfadenopatia, febre, dor de garganta e lesões vesiculares e ulcerativas, afetando a região oral e perioral. Inflamação gengival generalizada e dor também são sintomas característicos (FATAHZADEH, 2017). A recorrência das lesões orolabiais, forma mais comum da doença, é precedida por um período prodromico de dor, queimação, coceira ou formigamento, seguido pela formação de vesículas em 24 a 48 horas (Figura 6A). As vesículas evoluem para úlceras, que formarão crostas entre 72 e 96 horas (Figura 6B), e a reparação geralmente se completa espontaneamente entre 8 e 10 dias (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007).

Figura 6 - Representação da manifestação clínica da reativação do HSV. A) Vesículas produzidas pelo HSV no período clínico ativo; B) Vesículas secas formando crostas no período reparatório da infecção



Fonte: Consolaro e Consolaro (2009)

Normalmente, as infecções genitais são causadas pelo HSV-2, mas o HSV-1 também tem sido isolado das infecções herpéticas nesse local. As infecções genitais primárias são geralmente assintomáticas. Já as características clínicas clássicas consistem em lesões cutâneas e mucosas com máculas ou pápulas, após o contato sexual, que progridem para vesículas, pústulas e úlceras. Os sintomas também podem incluir dor, queimação, disúria, inchaço inflamatório da vulva e cervicite (em mulheres), proctite (em homens), linfadenopatia e febre. As recidivas quase sempre apresentam inicialmente sintomas nevralgicos, disestesia

ou dor no dermatomo lombossacral um a dois dias antes do surgimento das lesões (SAUERBREI, 2016).

Além disso, o HSV pode afetar qualquer parte do olho, sendo que os sintomas mais generalizados são lacrimejamento, vermelhidão, visão embaçada e desconforto ocular. Pode ocasionar ainda conjuntivite, blefarite, úlceras e vesículas na pálpebra e lesões da córnea, como a ceratite epitelial ou estromal (ZHU; ZHU, 2014).

Cerca de 80% dos casos de encefalite neonatal são causados pelo HSV-2, e a maioria é adquirida de mães que têm infecção ativa por herpes genital, seja infecção primária ou recorrente, no momento do parto. Os neonatos apresentam achados sistêmicos (alterações na temperatura corporal, letargia, desconforto respiratório, anorexia, vômitos e cianose) e sinais neurológicos (irritabilidade, fontanelas protuberantes, convulsões, opistótono e coma). A infecção em neonatos pode ter um dos três padrões: infecção disseminada, encefalite ou uma infecção localizada na pele, boca e olhos (STEINER et al., 2011).

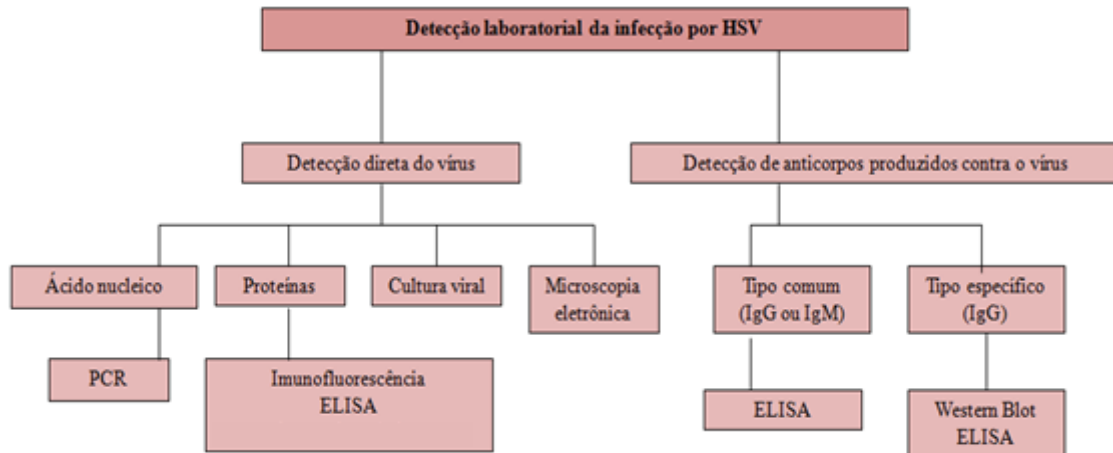
Em crianças com dermatite atópica, a infecção cutânea pelo HSV pode resultar em eczema herpético, caracterizado pelo aparecimento agudo, em uma área extensa, de nódulos vesiculares e ulcerativos, e que pode estar associado a sintomas sistêmicos. Se uma lesão primária do HSV envolver os dedos ou a mão, é referida como panarício herpético, que envolve a formação de vesículas, usualmente na falange distal dos dedos. Já a infecção cutânea associada ao contato que ocorre durante a competição atlética, é denominada de herpes do gladiador. As manifestações habituais são erupções cutâneas na face, nas orelhas e no pescoço, duas semanas após o contato, mas os membros e o tronco também podem ser afetados (FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007; SCHLEISS et al., 2009).

Por fim, as pessoas com sistema imunológico imaturo ou suprimido, como recém-nascidos, transplantados ou pessoas com AIDS, são propensas a complicações graves, sendo que as lesões podem afetar o trato respiratório, o esôfago e até a mucosa intestinal (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007; MUSTAFA et al., 2016).

3.1.7 Diagnóstico Laboratorial

Os testes laboratoriais para auxiliar no diagnóstico definitivo de infecção por HSV incluem: isolamento viral em cultura de células, detecção de antígenos virais como ácido nucleico ou proteínas, microscopia eletrônica e testes sorológicos (Figura 7) (FATAHZADEH; SCHWARTZ; 2007).

Figura 7 – Resumo das técnicas disponíveis de diagnóstico da infecção pelo HSV



Fonte: adaptado de Thomas (2017)

O método para detecção de HSV baseado em cultura celular depende da coleta de uma amostra de alta qualidade, através de *swab* ou aspiração com agulha, e do transporte e manuseio adequados para o vírus manter a sua infecciosidade. Como o HSV é envelopado e extremamente lábil, as amostras coletadas devem ser transferidas para meios adequados de transporte viral, como M4, M6 ou o meio de transporte universal (UTM) e, transportadas para o laboratório a 4°C (ANDERSON; BUCHAN; LEDEBOER, 2014; BIŠKUP; URŠIČ; PETROVEC, 2015). Estes meios são soluções salinas tamponadas contendo albumina para ajudar na estabilização dos vírions e são suplementados com antimicrobianos, incluindo anfotericina B, vancomicina e colistina. Várias linhagens celulares podem ser utilizadas para o isolamento viral e o efeito citopático (CPE) é caracterizado pelo arredondamento celular, granulação citoplasmática, formação de sincícios e, eventualmente, lise. O tempo de incubação necessário para observar o CPE depende da concentração do vírus na amostra clínica. A classificação do vírus é subsequentemente conduzida usando anticorpos monoclonais contra HSV-1 e 2 (ANDERSON; BUCHAN; LEDEBOER, 2014; LEGOFF; PÉRÉ; BÉLEC, 2014). Uma desvantagem deste método é que a recuperação do vírus pode ser altamente variável e depende do estágio da lesão. Uma alta sensibilidade (95%) pode ser obtida usando amostras de lesões vesiculares, diminuindo rapidamente quando as amostras são de lesões ulcerativas (32 a 72%) e crostosas (17 a 30%). Além disso, as lesões de infecções primárias podem apresentar uma carga viral de três a quatro vezes maior que as de lesões recorrentes (ANDERSON; BUCHAN; LEDEBOER, 2014).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) aumenta as taxas de detecção do HSV em 11–71%, ou seja, tem maior sensibilidade que a cultura viral (AZWA; BARTON, 2009). Como o HSV raramente pode ser cultivado a partir do líquido cefalorraquidiano (LCR), a PCR é considerada o padrão ouro para a detecção do vírus em infecções do SNC. É um método rápido e altamente sensível e diferencia os genótipos do HSV-1 e 2 (ANDERSON; BUCHAN; LEDEBOER, 2014; MATHEW et al., 2018). A quantificação da carga viral por PCR *real time* também pode ser útil para avaliar o prognóstico e fornecer informações adicionais sobre o manejo da infecção pelo HSV (BHULLAR et al., 2014).

O antígeno viral também pode ser facilmente detectado por imunofluorescência direta ou indireta, usando anticorpos monoclonais específicos, como por exemplo, anti-ICP4, marcados com fluoresceína ou através do ensaio imunoenzimático (ELISA). O exame direto do líquido das vesículas ou outro material clínico por microscopia eletrônica, apesar de ser um método rápido, tem sido menos utilizado por apresentar sensibilidade e especificidade baixas (VERONESI; FOCACCIA, 2005; LEGOFF; PÉRÉ; BÉLEC, 2014).

Os testes sorológicos são importantes para confirmar a soroconversão após infecção primária. São principalmente utilizados na triagem pré-natal e de doenças sexualmente transmissíveis em indivíduos de alto risco para ajudar na prevenção da transmissão do vírus (ANDERSON; BUCHAN; LEDEBOER, 2014; SAUERBREI, 2016). Ensaio sorológicos precisos específicos para o HSV são baseados na gG1 (HSV-1) e na gG2 (HSV-2). O anticorpo IgG tipo específico é negativo no início da doença, mas torna-se detectável durante as primeiras semanas após a infecção e persiste indefinidamente. Assim, imediatamente após a infecção existe uma janela imunológica que pode ocasionar resultados falso-negativos. O teste de IgM para HSV-1 ou HSV-2 não é tipo específico e pode ser positivo durante a recorrência (LEGOFF; PÉRÉ; BÉLEC, 2014). Uma vez que os imunoenaios são dependentes da presença de anticorpos, a sensibilidade desses testes é afetada pelo tempo decorrido desde a infecção inicial e, também, a especificidade pode depender de características regionais e populacionais (ANDERSON; BUCHAN; LEDEBOER, 2014). No teste de ELISA o potencial de reatividade cruzada entre as glicoproteínas G1 e G2 pode afetar a especificidade do ensaio. Além disso, alguns ensaios sorológicos podem levar a resultados falso-positivos, necessitando de confirmação por *Western blot*. Esta técnica baseia-se na detecção de anticorpos contra uma bateria de proteínas virais para diferenciar o HSV-1 do HSV-2, no entanto, é dispendioso e demorado (FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007).

3.1.8 Vacinas

Apesar de muitas tentativas, ainda não existe uma vacina profilática ou terapêutica eficaz contra o HSV-1 e 2. As vacinas profiláticas são para prevenir a infecção pelo HSV, enquanto as terapêuticas são direcionadas a indivíduos que já possuem a infecção para reduzir os sintomas, a gravidade das lesões, a reativação da infecção e a excreção de vírus que pode ser transmitido a outras pessoas (WHITLEY; BAINES, 2018).

A VCL-HB01, da companhia farmacêutica Vical, é uma vacina terapêutica de DNA plasmidial, que codifica a gD do HSV-2 e os genes *UL46* e *UL47*, responsáveis pela produção das proteínas do tegumento VP11/12 e VP13/14, respectivamente. Esta formulação também é constituída por um adjuvante de base lipídica catiônica, Vaxfectin® (VESELENAK et al., 2012). Embora a vacina tenha sido bem tolerada durante um teste em humanos e demonstrou ser eficaz contra lesões recorrentes em modelos animais, outro teste em indivíduos infectados com HSV-2 demonstrou reativação com relativa frequência (quatro a nove vezes por ano), desvalorizando o seu investimento (GOTTLIEB; JOHNSTON, 2017).

Outra candidata, a vacina GEN-003, da empresa Genocea Biosciences, inclui a gD do HSV-2 com deleção do domínio transmembrana e um fragmento da ICP4 (resíduos 383 a 766), formulados em uma matriz de adjuvante M-2 (SKOBERNE et al., 2013). Em um ensaio de fase I/II, os participantes que foram vacinados com GEN-003 reduziram a excreção viral e a quantidade de dias com lesões genitais. A resposta das células T foi significativamente potencializada pela presença do adjuvante M2, e algumas respostas imunes persistiram por até doze meses após a vacinação. Porém, após os resultados de um estudo de fase III, ela apresentou eficácia clínica limitada (FLECHTNER et al., 2016; WHITLEY; BAINES, 2018).

A vacina HSV529 da Sanofi, com deleção dos genes *UL5* e *UL29*, essenciais para a replicação do DNA, induziu resposta imune específica e reduziu significativamente a mortalidade, excreção viral e duração das lesões em animais desafiados com o vírus (HOSHINO et al., 2008).

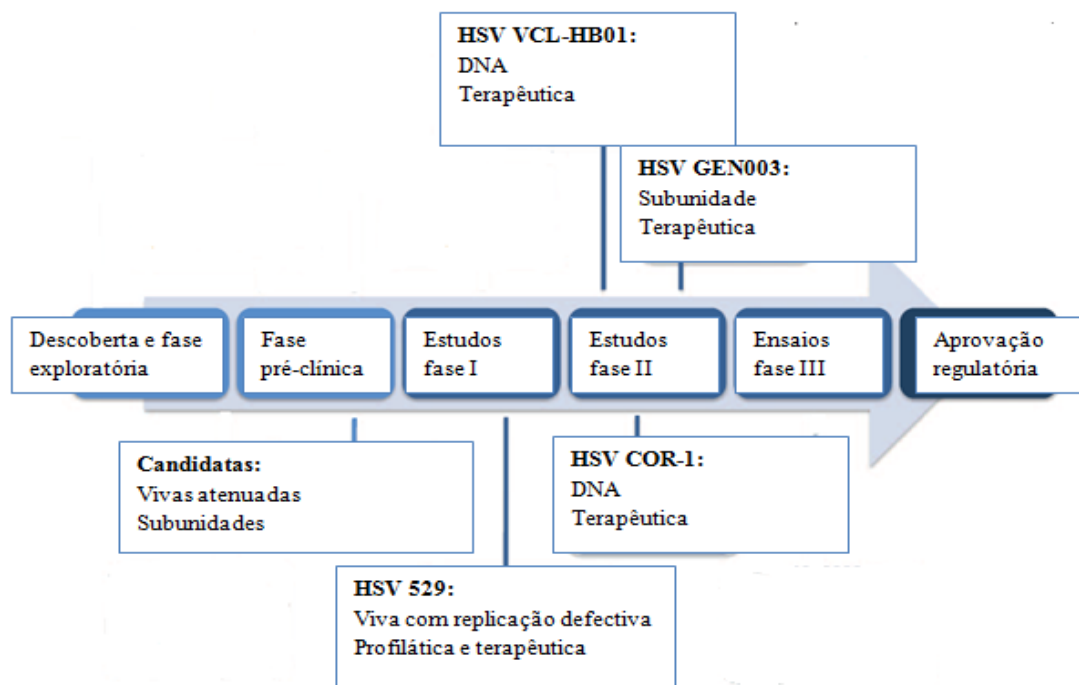
A COR-1 é constituída pela mistura de dois plasmídeos que carregam sequências de genes que codificam a gD de comprimento total do HSV-2 e uma gD incompleta fundida com ubiquitina. A vacina demonstrou-se segura em participantes soronegativos para HSV-1/2 em um estudo de fase I, induzindo a resposta de células T específicas, mas não a humoral (DUTTON et al., 2016).

Além delas, também vem sendo testada a vacina VC2 que contém deleções em sequências de gK e *UL20*, dificultando a entrada do vírus nos axônios. No entanto, permite

sua propagação em células epiteliais. A VC2 induziu proteção em camundongos e anticorpos neutralizantes em macacos *Rhesus* (STANFIELD et al., 2014, 2017).

Por fim, a vacina Herpevac, desenvolvida pela companhia farmacêutica britânica GlaxoSmithKline, é constituída por uma gD truncada. Ela foi testada em mais de 8.000 mulheres soronegativas para HSV-1/2 e mostrou 35% de eficácia contra a infecção por HSV-1, mas nenhuma eficácia contra a infecção por HSV-2 (BELSHE et al., 2012). A Figura 8 representa as principais vacinas pesquisadas contra o HSV-2.

Figura 8 - Pesquisa e desenvolvimento de algumas vacinas para o HSV-2



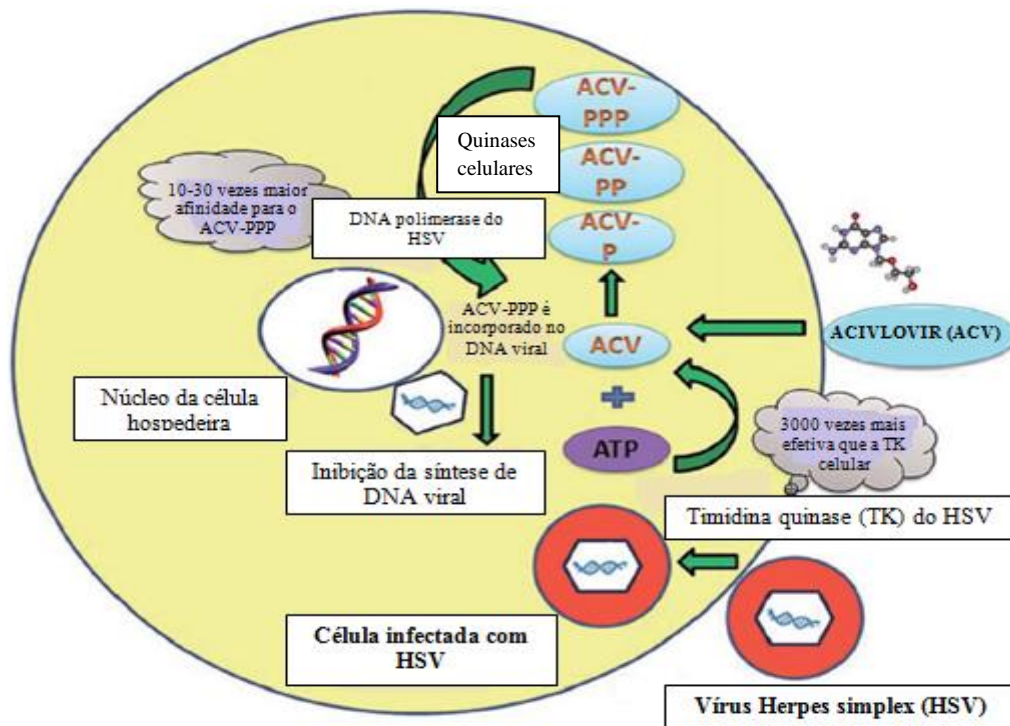
Fonte: adaptado de Gottlieb e Johnston (2017)

3.1.9 Tratamento

O primeiro análogo de nucleosídeo anti-herpético relatado como eficaz na clínica foi a 5-iodo-2'-desoxiuridina (IDU), seguida pela vidarabina, a droga mais antiga utilizada para o tratamento sistêmico da infecção pelo HSV (IBÁÑEZ et al., 2018). O desenvolvimento do ACV, análogo acíclico da guanósina, e de seus pró-fármacos penciclovir, valaciclovir e famciclovir representou uma grande melhoria em relação ao tratamento das infecções por HSV, tornando-o mais eficaz e menos tóxico. Os análogos de nucleosídeos, como o ACV, são seletivamente monofosforilados nas células infectadas pela timidino

quinase (TK) viral. Posteriormente, quinases celulares convertem o derivado monofosfato de ACV às formas di e trifosfato. Então, o ACV-trifosfato, sua forma ativa, atua como um inibidor competitivo da DNA polimerase viral, resultando em terminação da cadeia de DNA, como representado na Figura 9 (JIANG et al., 2016).

Figura 9 - Mecanismo de ação do aciclovir nas células infectadas pelo HSV



Fonte: adaptado de Szczubiałka, Pyrc e Nowakowska (2016)

O ACV apresenta toxicidade relativamente baixa, porém solubilidade e permeabilidade também baixas, o que limita a sua biodisponibilidade (SZCZUBIAŁKA; PYRĆ; NOWAKOWSKA, 2016). Por outro lado, o valaciclovir, que é um pró-fármaco L-valil-éster de ACV, apresenta melhor biodisponibilidade após administração oral do que o ACV. Já o penciclovir exibe potência antiviral semelhante a do ACV, mas é mal absorvido quando administrado por via oral. Isto conduziu ao desenvolvimento do famciclovir, que é um pró-fármaco diacetilado do penciclovir (JAMES; PRICHARD, 2014).

Como mencionado, estes análogos de nucleosídeos requerem fosforilação pela TK viral para tornarem-se ativos. Portanto, mutações no gene *UL23*, que codifica esta enzima, pode conferir resistência a estes fármacos. Três fenótipos diferentes associados à resistência têm sido relatados: mutantes negativos para TK, que não apresentam atividade enzimática;

mutantes de baixa produção de TK, que exprimem níveis muito baixos desta enzima; e isolados alterados de TK, que são mutantes específicos do substrato (WHITLEY; BAINES, 2018). Em isolados clínicos de HSV, a resistência ao ACV é mediada em 95% dos casos por mutações no gene *UL23* e, nos demais casos, por mutações no gene *UL30*, que codifica a DNA polimerase viral. A prevalência de infecções por HSV com suscetibilidade reduzida ao ACV em pacientes imunossuprimidos é maior e varia de 2,5% a 10% (FROBERT et al., 2014).

As terapias antivirais de segunda linha para infecções por HSV resistentes ao ACV consistem no uso de fosfonoformato (foscarnet) e cidofovir. Porém, devido aos seus perfis de toxicidade e à ausência de formulações orais, eles são geralmente reservados para pacientes em que há falha ou que não toleram o ACV e seus pró-fármacos. O foscarnet é um análogo de pirofosfato que não requer fosforilação por quinases virais ou celulares. Inibe diretamente a DNA polimerase viral por ligação ao sítio do pirofosfato, impedindo sua clivagem, o que resulta no término do alongamento da cadeia de DNA. Já o cidofovir é um monofosfato acíclico de desoxicidina que requer apenas duas fosforilações por quinases celulares para se converter na sua forma ativa, atuando também como terminador da cadeia de DNA. Tanto o foscarnet como o cidofovir são inibidores independentes da TK viral, por isso as mutações que ocasionam resistência a esses agentes ocorrem somente em *UL30* (JAMES; PRICHARD, 2014).

3.1.10 Epidemiologia

Em 2012, a prevalência global do HSV-1 foi de 67%, isto é, 3,7 bilhões de pessoas com até 49 anos, sendo maior na África, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental. Estimou-se também que 140 milhões de pessoas tiveram infecção genital por HSV-1, a maioria ocorrendo nas Américas, Europa e Pacífico Ocidental (LOOKER et al., 2015a). Com relação ao HSV-2, 417 milhões de pessoas entre 15 a 49 anos, das quais 267 milhões eram mulheres, foram registradas vivendo com este vírus em todo o mundo, isto é, uma prevalência global de 11,3%. Esta taxa foi mais elevada na África (31,5%), seguida pelas Américas (14,4%) (LOOKER et al., 2015b). Globalmente, cerca de 14.000 casos de herpes neonatal, devido ao HSV-1 e 2, ocorreram anualmente entre 2010 e 2015. Estima-se que a maioria desses casos tenha ocorrido na África, devido à elevada infecção materna por HSV-2 e às altas taxas de natalidade. O HSV-1 contribuiu com mais casos do que o HSV-2 nas Américas, Europa e Pacífico Ocidental (LOOKER et al., 2017b).

Durante 2015-2016, nos Estados Unidos, a prevalência do HSV-1 foi de 47,8% e do HSV-2 foi de 11,9% entre pessoas com 14 a 49 anos. A prevalência de ambos os vírus foi maior entre as mulheres e aumentou linearmente com a idade. Diferenças relacionadas à raça e à origem foram observadas para os dois vírus, sendo que pessoas americanas mexicanas tinham maior prevalência de HSV-1 (71,7%) e negras não hispânicas de HSV-2 (34,6%) (MCQUILLAN et al., 2018).

Os principais fatores que influenciam a infecção por HSV-1 são a idade, condição socioeconômica e localização geográfica. Em países em desenvolvimento e populações de baixo nível socioeconômico, a infecção ocorre em indivíduos mais novos, diferente do que ocorre em sociedades industrializadas e em indivíduos de classe média, pois estes adquirem esse vírus quando mais velhos (PELLET; ROIZMAN, 2013). Muitos fatores de risco foram descritos na aquisição do HSV-2, incluindo relações sexuais precoces, história anterior de doenças sexualmente transmissíveis e múltiplos parceiros sexuais (CALDEIRA et al., 2013).

Embora o HSV-2 seja conhecido como a causa mais comum de herpes genital, um número crescente de casos pelo HSV-1 tem sido observado. O estudo de Kiasari e Tooranposhti (2016) relata algumas mudanças na epidemiologia da infecção pelo HSV-1, incluindo o declínio da incidência de infecção na infância e o aumento da taxa de herpes genital. Além disso, os autores também descreveram alterações na epidemiologia de herpes ocular, ou seja, a redução da taxa de herpes ocular primário em crianças e o aumento da incidência de infecção ocular por HSV em adultos.

Poucos estudos investigaram a prevalência do HSV na população brasileira. Um deles, realizado na cidade de Rio Grande, no sul do país, mostrou que a prevalência do HSV-2 em mulheres foi de 15,6% (CALDEIRA et al., 2013). Pereira et al. (2012) avaliaram a prevalência de HSV-1 e 2 em mulheres sexualmente ativas que participavam do programa de rastreamento do câncer de colo de útero em Natal, demonstrando que a infecção genital por HSV-1 (23%) é quatro vezes mais prevalente que a por HSV-2 (5,4%). Silva et al. (2015) encontraram uma soroprevalência de HSV-1 e 2 de 85,2% entre homens que fazem sexo com homens no Mato Grosso do Sul. Além disso, a prevalência dos anticorpos para o HSV-1, na população geral brasileira, foi de 67,2%, sem diferença quanto ao sexo, mas aumentando com a idade e variando de 47% em Fortaleza a 73,3% em Manaus. Já a taxa de infecção pelo HSV-2 foi de 11,3%, alcançando 30% nos grupos etários em que há início da atividade sexual (CLEMENS; FARHAT, 2010). No estado do Rio de Janeiro, a soroprevalência do HSV-2 foi de 52% em pacientes com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (SANTOS et al., 2006).

Este resultado afirma as evidências descritas no estudo de Looker et al. (2017a) de que a infecção por HSV-2 aumenta o risco de aquisição do HIV.

3.2 PRINCÍPIOS ATIVOS DE ORIGEM NATURAL

A diversidade de espécies de plantas, animais, microrganismos e organismos marinhos resulta em uma infinidade de metabólitos secundários com estruturas químicas diversas, que desempenham e continuarão desempenhando um papel vital no processo de descoberta e desenvolvimento de drogas (GUO, 2017). As plantas têm sido utilizadas para fins de cuidados de saúde e médicos durante anos. O número de espécies de plantas superiores na Terra é de cerca de 250.000. Estima-se que 35.000 a 70.000 espécies tenham sido, em um momento ou outro, usadas em algumas culturas para fins medicinais (GEORGE; JOSEPH; VENUGOPAL, 2017). Além disso, cerca de um terço dos medicamentos aprovados pelo FDA nos últimos 20 anos são baseados em ativos naturais ou seus derivados, o que tem revolucionado a medicina (THOMFORD et al., 2018). Alguns exemplos de medicamentos derivados de ativos naturais são: quinina, teofilina, penicilina G, morfina, paclitaxel, digoxina, vincristina, doxorubicina, ciclosporina e carotenoides (betacaroteno) (CHEUKA et al., 2016).

O surgimento de resistência do HSV aos medicamentos atualmente disponíveis, gerou uma necessidade urgente por novos agentes antivirais. As plantas medicinais oferecem uma alternativa potencial devido à sua ampla utilização na medicina tradicional. Desta forma, os compostos naturais representam potenciais candidatos, pois apresentam algumas vantagens, tais como, a possibilidade de exibir mecanismos de ação alternativos, agindo em várias etapas da replicação viral e dificultando o surgimento de resistência ao tratamento, o fácil acesso, o baixo custo e menos efeitos colaterais comparativamente às drogas sintéticas (BAG et al., 2012; QAVI; HESSEL, 2015). Por outro lado, a pesquisa de novos candidatos a medicamentos, a partir de ativos naturais, muitas vezes é dificultada pela complexidade das misturas moleculares. A atividade terapêutica dos extratos de plantas é geralmente devido à ação sinérgica e simultânea dos metabólitos secundários (THOMFORD et al., 2018). Alcaloides, flavonoides, saponinas, quinonas, terpenos, proantocianidinas, ligninas, taninos, polissacarídeos, esteroides, tiosulfonatos, óleos essenciais e cumarinas são proeminentes fitoquímicos bioativos que têm demonstrado combater infecções virais (KAPOOR; SHARMA; KANWAR, 2017).

Brandão et al. (2017) ressaltam que as xantonas têm importantes vantagens como potenciais agentes antivirais, devido à possibilidade de serem facilmente sintetizadas e

também pela interação demonstrada com alguns importantes alvos de microrganismos. Segundo Chen e Huang (2018), alguns estudos também mostraram que os polissacarídeos naturais e os naturais quimicamente modificados têm efeito inibitório contra HIV, HSV, coxsackievírus B3 (CVB3), CMV, vírus da gripe e vírus da hepatite. A modificação artificial dos polissacarídeos naturais, como por exemplo a sulfatação, pode melhorar a atividade biológica dos mesmos. A atividade, *in vitro*, desta macromolécula parece estar relacionada à presença do grupo sulfato carregado negativamente, o que pode inibir a adsorção do vírus às células hospedeiras. Já a atividade, *in vivo*, pode estar relacionada a uma ação imunostimuladora (GEMIN et al., 2010).

3.2.1 Mangiferina

A mangiferina é um polifenol de estrutura C-glicosilxantona e sua nomenclatura segundo a IUPAC é 1,3,6,7-tetra-hidroxi-2- [3,4,5-tri-hidroxi-6- (hidroximetil) oxan-2-il] xanten-9-ona. (MATKOWSKI et al., 2013). As xantonas são compostos heterocíclicos que contêm oxigênio, possuem uma coloração amarela e o esqueleto base dibenzo- γ -pirona e apresentam muitas propriedades biológicas e farmacológicas interessantes (DIDEROT; SILVERE; ETIENNE, 2006). A mangiferina é obtida de várias plantas tais como *Mangifera indica* (Figura 10), comumente conhecida como mangueira, uma espécie frutífera, dicotiledônea, da família *Anacardiaceae* e originária da Índia, mas que foi difundida em muitas regiões tropicais (CARDOSO et al., 2007). É abundantemente encontrada em folhas jovens e na casca do caule da mangueira (BARRETO et al., 2008).

Figura 10 - Folhas, frutos e flores da mangueira (*Mangifera indica*)



Fonte: Bally (2006)

Algumas partes da planta são utilizadas há milhares de anos com grande variedade de uso medicinal. As raízes e as cascas, por exemplo, são utilizadas para tratar feridas, úlceras e vômitos. As folhas também são utilizadas em casos de feridas e úlceras e para tratar hemorragia, sensação de queimação e diarreia. Além disso, as frutas verdes são consideradas anti-scorbuticas e digestivas, enquanto as maduras são cardiotônicas, hemostáticas e afrodisíacas (PARVEZ, 2016). Em Cuba, extratos aquosos da casca de *M. indica* se tornaram populares para o tratamento de distúrbios gástricos, dermatológicos e asma. Os extratos das cascas de caule, além da mangiferina, contêm polifenóis, terpenoides, esteroides, ácidos graxos e oligoelementos. O medicamento natural Vimang[®], produzido a partir de extratos aquosos de *M. indica*, contém aproximadamente 20% de mangiferina e está disponível em comprimidos, cremes e xaropes (GOLD-SMITH; FERNANDEZ; BISHOP, 2016).

Além disso, múltiplas atividades farmacológicas têm sido cientificamente demonstradas, tais como, antitumoral (GOLD-SMITH; FERNANDEZ; BISHOP, 2016), imunomoduladora (RAJENDRAN et al., 2013), analgésica e antioxidante (DAR et al., 2005), anti-helmíntica e antialérgica (GARCÍA et al., 2003), anti-inflamatória (SAHA; SADHUKHAN; SIL, 2016), antinociceptiva (LOPES et al., 2013) e antimicrobiana (SINGH et al., 2012). Extratos da folha de *M. indica* já foram testados contra cepas de *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumonia* e *Salmonella typhi* e apresentaram boa atividade antibacteriana (SAHRAWAT, PAL, SHAHI, 2013). A atividade antiviral da mangiferina também já foi demonstrada contra HIV-1 (WANG et al., 2011), HSV-1 e HSV-2 (YOOSOOK et al., 2000) e poliovírus (RECHENCHOSKI et al., 2018) e, também, contra os fungos *Thermoascus aurantiacus*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus* (STOILOVA et al., 2005).

3.2.2 *Adenanthera pavonina*

Adenanthera pavonina é uma leguminosa arbórea, pertencente à família *Fabaceae* e subfamília *Mimosoideae*, originária da Índia e da Malásia, mas encontrada em todo o litoral brasileiro. Popularmente, a planta é conhecida como carolina, tento-vermelho, olho-de-dragão e falso pau Brasil (KISSMANN et al., 2008; JAROMIN; KORYCIŃSKA; KOZUBEK, 2011). Ela é utilizada para fins ornamentais, arborização de ruas e praças, artesanato e medicamentos, sendo suas sementes e madeira utilizadas como fitoterápicos, no tratamento de infecções pulmonares e oftalmia crônica. Os frutos são vagens estreitas, achatadas, marrons, espiraladas quando se abrem, expondo as sementes globosas, achatadas, duras, com

tegumento vermelho-brilhante e um endosperma gomoso e espesso, grande fonte de galactomananas (Figura 11) (KISSMANN et al., 2008; RODRIGUES, 2017).

Figura 11 - Aspectos gerais da árvore e semente de *Adenanthera pavonina*



Fonte: Lorenzi et al. (2003) e Sousa (2014)

As sementes são tradicionalmente utilizadas para o tratamento de furúnculos, inflamações, desordens sanguíneas, artrite, reumatismo, vômito, tontura, espasmo e indigestão (HUSSAIN et al., 2010; MUJAHID et al., 2016). Elas são tóxicas cruas, mas podem ser ingeridas quando cozidas e o pó da semente é utilizado como pigmento vermelho (GEORGE; JOSEPH; VENUGOPAL, 2017). Já as folhas e as cascas da planta são usadas para tratar reumatismo, gota, hematúria, hematêmese, úlcera e diarreia (MUJAHID et al., 2016).

Além disso, vários estudos experimentais e científicos comprovaram que a planta possui múltiplas atividades farmacológicas, tais como, anti-inflamatória (JAYAKUMARI et al., 2012), antioxidante (MUJAHID et al., 2015), antidiabética (PANDHARE; SANGAMESWARAN, 2012), anti-hipertensiva (ADEDPO et al., 2009), anticâncer (CHAUHAN et al., 2015) e antimicrobiana (ADEYEMI et al., 2015). A atividade antibacteriana de extratos da planta foi demonstrada contra *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (SOPHY et al., 2015). Em estudos prévios, o polissacarídeo sulfatado isolado das sementes, apresentou atividade contra o poliovírus e o HSV-1, *in vitro* (GODOI et al., 2014, 2015). As propriedades medicinais da planta estão relacionadas principalmente à presença de alguns metabólitos secundários, como flavonoides, triterpenoides, taninos, saponinas e esteróis (ABBAS et al., 2017).

Enfim, considerando as múltiplas atividades farmacológicas da mangiferina e da *Adenanthera pavonina* e diante deste cenário de emergência de cepas de HSV resistentes ao ACV, este estudo baseou-se no desenvolvimento de formulações contendo estas substâncias e na avaliação da atividade anti-herpética das mesmas, *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, T. et al. Potential of red sandalwood (*Adenanthera pavonina* L.) as an antibacterial agent against clinical isolates. **National Journal of Health Sciences**, v. 2, n. 2, p. 61-66, 2017.
- ADEDAPO, A. D. A. et al. Blood pressure lowering effect of *Adenanthera pavonina* seed extract on normotensive rats. **Records of Natural Products**, v. 3, n. 2, p. 82-89, 2009.
- ADEYEMI, O. A. et al. Evaluation of the antimicrobial activity of crude extracts and chromatographic fractions of *Adenanthera pavonina* Linn (*Leguminosae*) seeds. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 12, p. 1067-1073, 2015.
- AGELIDIS, A. M.; SHUKLA, D. Cell entry mechanisms of HSV: what we have learned in recent years. **Future Virology**, v. 10, n. 10, p. 1145-1154, 2015.
- ALDISI, R. S. et al. Performance evaluation of four type-specific commercial assays for detection of herpes simplex virus type 1 antibodies in a Middle East and North Africa population. **Journal of Clinical Virology**, v. 103, p. 1-7, 2018.
- ANDERSON, N. W.; BUCHAN, B. W.; LEDEBOER, N. A. Light microscopy, culture, molecular, and serologic methods for detection of herpes simplex virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 2-8, 2014.
- ANDREWES, C. H.; CARMICHAEL, E. A. A note on the presence of antibodies to herpes virus. **The Lancet**, v. 215, n. 5564, p. 857-858, 1930.
- ARII, J. et al. Non-muscle myosin IIA is a functional entry receptor for herpes simplex virus-1. **Nature**, v. 467, n. 7317, p. 859-862, 2010.
- AZWA, A.; BARTON, S. E. Aspects of herpes simplex virus: a clinical review. **The Journal of Family Planning and Reproductive Health Care**, v. 35, n. 4, p. 237-242, 2009.
- BAG, P. et al. Anti-herpes virus activities of bioactive fraction and isolated pure constituent of *Mallotus peltatus*: an ethnomedicine from Andaman Islands. **Virology Journal**, v. 9, n. 1, p. 98, 2012.
- BALLY, I. S. E. *Mangifera indica* (mango). In: ELEVITCH, C. R. **Species Profiles for Pacific Island Agroforestry**. Hawaii: Permanent Agriculture Resources, 2006. p. 1-25.
- BARRETO, J. C. et al. Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves and peel of mango. (*Mangifera indica* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 14, p. 5599-5610, 2008.
- BELSHE, R. B. et al. Efficacy results of a trial of a herpes simplex vaccine. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 1, p. 34-43, 2012.
- BERNARDINI, S. et al. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. **Natural Product Research**, v. 32, n. 16, p. 1926-1950, 2018.

BHULLAR, S. S. et al. Determination of viral load by quantitative real-time PCR in herpes simplex encephalitis patients. **Intervirology**, v. 57, n. 1, p. 1-7, 2014.

BIŠKUP, U. G.; URŠIČ, T.; PETROVEC, M. Laboratory diagnosis and epidemiology of herpes simplex 1 and 2 genital infections. **Acta Dermatovenerologica**, v. 24, n. 2, p. 31-35, 2015.

BLACK, B. J. et al. Adult mouse sensory neurons on microelectrode arrays exhibit increased spontaneous and stimulus-evoked activity in the presence of interleukin-6. **Journal of Neurophysiology**, v. 120, n. 3, p. 1374-1385, 2018.

BOLZANI, V. S. et al. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 9, p. 1837-1846, 2012.

BRANDÃO, G. C. et al. Antiviral activity of *Fridericia formosa* (Bureau) L.G. Lohmann (*Bignoniaceae*) extracts and constituents. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2017, p. 1-11, 2017.

BRODOEFEL, H. et al. Herpes-Simplex-Virus 1 pneumonia in the immunocompromised host: high-resolution CT patterns in correlation to outcome and follow-up. **European Journal of Radiology**, v. 81, n. 4, p. e415-e420, 2012.

CALDEIRA, T. D. M. et al. Prevalence of herpes simplex virus type 2 and risk factors associated with this infection in women in southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 5, p. 315-321, 2013.

CANUTO, K. M. **Propriedades químicas e farmacológicas de mangiferina: um composto bioativo de manga (*Mangifera indica* L.)**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2009. 27p.

CARDOSO, M. G. S. et al. Florescimento e frutificação de mangueira (*Mangifera indica* L.) Cv. Rosa promovidos por diferentes doses de paclobutrazol. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 2, p. 209-212, 2007.

CARDOZO, F. T. G. S. et al. *In vivo* anti-HSV activity of a sulfated derivative of *Agaricus brasiliensis* mycelial polysaccharide. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 2541-2549, 2013.

CAVINESS, A. C. Neonatal herpes simplex virus infection. **Clinical Pediatric Emergency Medicine**, v. 14, n. 2, p. 135-145, 2013.

CHAUHAN, R. et al. Phytochemical and cytotoxicity analysis of seeds and leaves of *Adenanthera pavonina*. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 8, n. 2, p. 198, 2015.

CHEN, L.; HUANG, G. The antiviral activity of polysaccharides and their derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 77-82, 2018.

- CHENTOUFI, A. A. et al. Towards a rational design of an asymptomatic clinical herpes vaccine: the old, the new, and the unknown. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1-16, 2012.
- CHEUKA, P. M. et al. The role of natural products in drug discovery and development against neglected tropical diseases. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 58, 2016.
- CLEMENS, S. A. C.; FARHAT, C. K. Seroprevalence of herpes simplex 1-2 antibodies in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 4, p. 726-734, 2010.
- CLIFFE, A. R. et al. Neuronal stress pathway mediating a histone methyl/phospho switch is required for herpes simplex virus reactivation. **Cell Host & Microbe**, v. 18, n. 6, p. 649-658, 2015.
- CONSOLARO, A.; CONSOLARO, M. F. M. O. Diagnóstico e tratamento do herpes simples recorrente peribucal e intrabucal na prática ortodôntica. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, v. 14, n. 3, p. 16-24, 2009.
- CRUZ-MUÑOZ, M. E.; FUENTES-PANANÁ, E. M. Beta and gamma human herpesviruses: Agonistic and antagonistic interactions with the host immune system. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2521, 2018.
- DAR, A. et al. Analgesic and antioxidant activity of mangiferin and its derivatives: the structure activity relationship. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 4, p. 596-600, 2005.
- DAVISON, A. J. Herpesvirus systematics. **Veterinary Microbiology**, v. 143, n. 1, p. 52-69, 2010.
- DIDEROT, N. T.; SILVERE, N.; ETIENNE, T. Xanthones as therapeutic agents: chemistry and pharmacology. **Advances in Phytomedicine**, v. 2, p. 273-298, 2006.
- DOCKRELL, D. H. Human herpesvirus 6: molecular biology and clinical features. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 5-18, 2003.
- DUTTON, J. L. et al. An escalating dose study to assess the safety, tolerability and immunogenicity of a herpes simplex virus DNA vaccine, COR-1. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 12, n. 12, p. 3079-3088, 2016.
- FATAHZADEH, M. Oral manifestations of viral infections. **Atlas of the Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, v. 25, n. 2, p. 163-170, 2017.
- 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.
- FLECHTNER, J. B. et al. Immune responses elicited by the GEN-003 candidate HSV-2 therapeutic vaccine in a randomized controlled dose-ranging phase 1/2a trial. **Vaccine**, v. 34, n. 44, p. 5314-5320, 2016.

- FROBERT, E. et al. Resistance of herpes simplex viruses to acyclovir: an update from a ten-year survey in France. **Antiviral Research**, v. 111, p. 36-41, 2014.
- GARCÍA, D. et al. Anthelmintic and antiallergic activities of *Mangifera indica* L. stem bark components Vimang and mangiferin. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 10, p. 1203-1208, 2003.
- GEMIN, E. et al. *In vitro* anti-HSV-1 activity of a chemically sulfated galactomannan from *Leucaena leucocephala* seeds. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 31, n. 2, p. 165-170, 2010.
- GEORGE, M.; JOSEPH, L.; VENUGOPAL, A. V. A Review on antidiarrhoeal, anti-inflammatory and antibacterial activity of *Adenanthera pavonina* leaves. **International Journal of Pharmacological Research**, v. 7, n. 6, p. 120-122, 2017.
- GHOSH, T. et al. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: from structure–activity analysis to clinical evaluation. **Glycobiology**, v. 19, n. 1, p. 2-15, 2008.
- GIANNI, T. et al. $\alpha\beta 6$ - and $\alpha\beta 8$ -integrins serve as interchangeable receptors for HSV gH/gL to promote endocytosis and activation of membrane fusion. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 12, p. e1003806, 2013.
- GODOI, A. M. et al. Antiviral activity of sulfated polysaccharide of *Adenanthera pavonina* against poliovirus in HEP-2 cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1-6, 2014.
- GODOI, A. M. et al. Characterization and antiherpetic activity of native and chemically sulfated polysaccharide from *Adenanthera pavonina*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 16, n. 11, p. 1024-1031, 2015.
- GOLD-SMITH, F.; FERNANDEZ, A.; BISHOP, K. Mangiferin and cancer: mechanisms of action. **Nutrients**, v. 8, n. 7, p. e396, 2016.
- GOTTLIEB, S. L.; JOHNSTON, C. Future prospects for new vaccines against sexually transmitted infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 30, n. 1, p. 77-86, 2017.
- GRUTER, W. Das herpesvirus, seine etiologische und klinische bedeutung. **Munchener Medizinische Wochenschrift**, v. 71, p. 1058, 1924.
- GUO, Z. The modification of natural products for medical use. **Acta Pharmaceutica Sinica**, v. 7, n. 2, p. 119-136, 2017.
- HAFEZI, W. et al. Entry of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) into the distal axons of trigeminal neurons favors the onset of nonproductive, silent infection. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 5, p. e1002679, 2012.
- HAN, M. et al. UV irradiation to mouse skin decreases hippocampal neurogenesis and synaptic protein expression via HPA axis activation. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 15574, 2017.

HASSAN, S. T. S.; MASARČÍKOVÁ, R.; BERCHOVÁ, K. Bioactive natural products with anti-herpes simplex virus properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 10, p. 1325-1336, 2015.

HOSHINO, Y. et al. Comparison of immunogenicity and protective efficacy of genital herpes vaccine candidates herpes simplex virus 2 dl5-29 and dl5-29-41L in mice and guinea pigs. **Vaccine**, v. 26, n. 32, p. 4034-4040, 2008.

HUSSAIN, A. et al. Pharmacognostical standardization of stem bark of *Adenanthera pavonina* L. **Pharmacognosy Journal**, v. 2, n. 8, p. 240-246, 2010.

IBÁÑEZ, F. J. et al. Experimental dissection of the lytic replication cycles of herpes simplex viruses *in vitro*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2406, 2018.

JAMES, S. H.; PRICHARD, M. N. Current and future therapies for herpes simplex virus infections: mechanism of action and drug resistance. **Current Opinion in Virology**, v. 8, p. 54-61, 2014.

JAROMIN, A.; KORYCIŃSKA, M.; KOZUBEK, A. Coralwood (*Adenanthera pavonina* L.) seeds and their protective effect. In: PREEDY, V. R.; WATSON, R. R.; PATEL, V. B. **Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention**. London: Academic Press, 2011. p. 389-394.

JAYAKUMARI, S. et al. Anti-inflammatory activity of *Adenanthera pavonina* Linn. leaves. **Journal of Natural Remedies**, v. 12, n. 1, p. 56-62, 2012.

JIANG, Y. C. et al. New strategies against drug resistance to herpes simplex virus. **International Journal of Oral Science**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2016.

KAPOOR, R.; SHARMA, B.; KANWAR, S. S. Antiviral phytochemicals: an overview. **Biochemistry & Physiology**, v. 6, n. 2, p. 220, 2017.

KARASNEH, G. A.; SHUKLA, D. Herpes simplex virus infects most cell types *in vitro*: clues to its success. **Virology Journal**, v. 8, p. 481, 2011.

KIASARI, B. A.; TOORANPOSHTI, Z. Z. The changing epidemiology of herpes simplex virus type 1 infection: the associated effects on the incidence of ocular herpes. **Archives of Razi Institute**, v. 71, n. 2, p. 125-134, 2016.

KISSMANN, C. et al. Tratamentos para quebra de dormência, temperaturas e substratos na germinação de *Adenanthera pavonina* L. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 2, p. 668-674, 2008.

KUKHANOVA, M. K.; KOROVINA, A. N.; KOCHETKOV, S. N. Human herpes simplex virus: life cycle and development of inhibitors. **Biochemistry**, v. 79, n. 13, p. 1635-1652, 2014.

KUMAR, S. P. et al. Pathogenesis and life cycle of herpes simplex virus infection-stages of primary, latency and recurrence. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology**, v. 28, n. 4, p. 350-353, 2016.

- LAWRENCE, F. et al. **Dermatologia Neonatal e Infantil**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
- LEGOFF, J.; PÉRÉ, H.; BÉLEC, L. Diagnosis of genital herpes simplex virus infection in the clinical laboratory. **Virology Journal**, v. 11, p. 83, 2014.
- LOOKER, K. J. et al. Effect of HSV-2 infection on subsequent HIV acquisition: an updated systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. 1303-1316, 2017a.
- LOOKER, K. J. et al. First estimates of the global and regional incidence of neonatal herpes infection. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 3, p. e300-e309, 2017b.
- LOOKER, K. J. et al. Global and regional estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 1 infections in 2012. **PloS One**, v. 10, n. 10, p. e0140765, 2015a.
- LOOKER, K. J. et al. Global estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 2 infections in 2012. **PloS One**, v. 10, n. 1, p. e114989, 2015b.
- LOPES, S. C. et al. Peripheral antinociceptive action of mangiferin in mouse models of experimental pain: Role of endogenous opioids, KATP-channels and adenosine. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 110, p. 19-26, 2013.
- LORENZI, H. et al. **Árvores exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos de Flora, 2003. 368p.
- MATHEW, R. et al. Herpes simplex virus 1 and 2 in herpes genitalis: a polymerase chain reaction-based study from Kerala. **Indian Journal of Dermatology**, v. 63, n. 6, p. 475-478, 2018.
- MATKOWSKI, A. et al. Mangiferin—a bioactive xanthonoid, not only from mango and not just antioxidant. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 3, p. 439-455, 2013.
- MCQUILLAN, G. et al. Prevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in persons aged 14-49: United States, 2015-2016. **NCHS Data Brief**, n. 304, p. 1-8, 2018.
- MELLO, C. P. P.; BLOOM, D. C.; PAIXÃO, I. C. N. P. Herpes simplex virus type-1: replication, latency, reactivation and its antiviral targets. **Antiviral Therapy**, v. 21, p. 277-286, 2016.
- MUJAHID, M. et al. An insight of pharmacognostic and phytopharmacology study of *Adenanthera pavonina*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 2, p. 586-596, 2016.
- MUJAHID, M. et al. Phytochemical analysis and evaluation of scavenging activity of methanolic extract of *Adenanthera pavonina* Linn leaves. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 5, n. 3, p. 55-61, 2015.
- MUSTAFA, M. et al. Herpes simplex virus infections, pathophysiology and management. **Journal of Dental and Medical Sciences**, v. 15, n. 7, p. 85-91, 2016.

NAHMIA, A. J.; DOWDLE, W. R. Antigenic and biologic differences in herpesvirus hominis. **Progress in Medical Virology**, v. 10, p. 110-159, 1968.

NOCCHI, S. R. **Investigação das propriedades anti-herpes simplex tipo 1 e ensaios pré-clínicos do extrato bruto hidroetanólico obtido das cascas do caule de *Schinus terebinthipholia* Raddi**. 2016. 135 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2016.

PANDHARE, R.; SANGAMESWARAN, B. Extract of *Adenantha pavonina* L. seed reduces development of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 2, n. 4, p. 233-242, 2012.

PARKS, G. Genital herpes. In: NELSON, A. L.; WOODWARD, J.; WYSOCKI, S. **Sexually Transmitted Diseases: Current Clinical Practice**. Totowa: Humana Press, 2006.

PARVEZ, G. M. M. Pharmacological activities of mango (*Mangifera indica*): a review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 5, n. 3, p. 1-7, 2016.

PELLET, P. E.; ROIZMAN, B. *Herpesviridae*. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 2479-2499.

PEREIRA, V. S. S. et al. Herpes simplex virus type 1 is the main cause of genital herpes in women of Natal, Brazil. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 161, n. 2, p. 190-193, 2012.

QAVI H. B.; HESSEL, T. The efficacy of antiviral components from plant products against herpes simplex virus type 1. **Annals of Virology and Research**, v.1, n.1, 1001, 2015.

RAJENDRAN, P. et al. Immunomodulatory effect of mangiferin in experimental animals with benzo (a) pyrene-induced lung carcinogenesis. **International Journal of Biomedical Science**, v. 9, n. 2, p. 68-74, 2013.

RECHENCHOSKI, D. Z. et al. Antiviral potential of mangiferin against poliovirus. **International Journal of Pharmacological Research**, v. 8, n. 4, p. 34-39, 2018.

RETAMAL-DÍAZ, A. R. et al. Immune evasion by herpes simplex viruses. In: ONGRÁDI, J. **Herpesviridae**. Londres: Intech, 2016. p. 105-146.

RIAZ, A.; MURTAZ-UL-HASAN, K.; AKHTAR, N. Recent understanding of the classification and life cycle of herpesviruses: a review. **Science Letters**, v. 5, n. 2, p. 195-207, 2017.

RIDDELL A.; JEFFERY-SMITH A.; TONG C.Y.W. Herpesviruses. **Medicine**, v. 45, n. 12, p. 767-771, 2017.

RODRIGUES, D. G. C. **Galactomanana de *Adenantha pavonina* Linn.: caracterização estrutural e atividade biológica na dislipidemia induzida por dieta hipercalórica em ratos**. 2017. 154 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2017.

- ROIZMAN, B.; KNIPE, D. M.; WHITLEY, R. J. Herpes simplex viruses. In: KNIPE, D. M. et al. **Fields Virology**. 6. ed. Philadelphia. Lippincott-Williams & Wilkins, 2013. p. 1840–1841.
- ROIZMAN, B; KNIPE, D. M.; WHITLEY, R. J. Herpes simplex viruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 2502-2601.
- SAHA, S.; SADHUKHAN, P.; SIL, P. C. Mangiferin: A xanthonoid with multipotent anti-inflammatory potential. **Biofactors**, v. 42, n. 5, p. 459-474, 2016.
- SAHRAWAT, A.; PAL, S.; SHAHI, S. K. Antibacterial activity of *Mangifera indica* (mango) leaves against drug resistant bacterial strains. **International Journal of Advanced Research**, v. 1, n. 6, p. 82-86, 2013.
- SANTOS, F. C. et al. Seroepidemiological study of herpes simplex virus type 2 in patients with the acquired immunodeficiency syndrome in the city of Niterói, Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 315-319, 2006.
- SANTOS, N. O. S.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à Virologia Humana**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.
- SATOH, T. et al. PILR α is a herpes simplex virus-1 entry coreceptor that associates with glycoprotein B. **Cell**, v. 132, n. 6, p. 935-944, 2008.
- SAUERBREI, A. Herpes genitalis: diagnosis, treatment and prevention. **Geburtshilfe und Frauenheilkunde**, v. 76, n. 12, p. 1310-1317, 2016.
- SCHLEISS, M. R. Persistent and recurring viral infections: the human herpesviruses. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, v. 39, n. 1, p. 7-23, 2009.
- SILVA, A. S. et al. Epidemiological evaluation of herpes simplex virus in men who have sex with men in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Sexually Transmitted Infections**, v. 91, n. 3, p. 182, 2015.
- SINGH, S. K. et al. Antimicrobial evaluation of mangiferin and its synthesized analogues. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2, p. S884-S887, 2012.
- SKOBERNE, M. et al. An adjuvanted herpes simplex virus type 2 (HSV-2) subunit vaccine elicits a T cell response in mice and is an effective therapeutic vaccine in guinea pigs. **Journal of Virology**, v. 87, n. 7, p. 3930-3942, 2013.
- SOPHY, A. J. R. et al. Antimicrobial activity of extracts of *Adenanthera pavonina* and *Mussaenda philippica* against isolated bacteria and fungi. **International Journal of Life Science & Pharma Research**, v. 5, n. 4, p. 22-27, 2015.
- SOUSA, F. D. **Propriedades físico-químicas de hemiceluloses vegetais**. 2014. 60 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

STANFIELD, B. A. et al. A single intramuscular vaccination of mice with the HSV-1 VC2 virus with mutations in the glycoprotein K and the membrane protein *UL20* confers full protection against lethal intravaginal challenge with virulent HSV-1 and HSV-2 strains. **PloS One**, v. 9, n. 10, p. e109890, 2014.

STANFIELD, B. A. et al. Vaccination of rhesus macaques with the live-attenuated HSV-1 vaccine VC2 stimulates the proliferation of mucosal T cells and germinal center responses resulting in sustained production of highly neutralizing antibodies. **Vaccine**, v. 35, n. 4, p. 536-543, 2017.

STEINER, I. Herpes simplex virus encephalitis: new infection or reactivation? **Current Opinion in Neurology**, v. 24, n. 3, p. 268-274, 2011.

STOILOVA, I. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of the polyphenol mangiferin. **Herbal Polonica**, v. 51, n. 1-2, p. 37-44, 2005.

SUENAGA, T. et al. Myelin-associated glycoprotein mediates membrane fusion and entry of neurotropic herpesviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 2, p. 866-871, 2010.

SUZICH, J. B.; CLIFFE, A. R. Strength in diversity: understanding the pathways to herpes simplex virus reactivation. **Virology**, v. 522, p. 81-91, 2018.

SZCZUBIAŁKA, K.; PYRĆ, K.; NOWAKOWSKA, M. In search for effective and definitive treatment of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infections. **RSC Advances**, v. 6, n. 2, p. 1058-1075, 2016.

THOMAS, E. Understanding and diagnosing herpes simplex virus. In: STUDAHL, M.; CINQUE, P.; BERGSTROM, T. **Herpes Simplex Viruses**. Florida: CRC Press, 2017.

THOMFORD, N. E. et al. Natural products for drug discovery in the 21st century: Innovations for novel drug discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. e1578, 2018.

VADLAPUDI, A. D.; VADLAPATLA, R. K.; MITRA, A. K. Update on emerging antivirals for the management of herpes simplex virus infections: a patenting perspective. **Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery**, v. 8, n. 1, p. 55-67, 2013.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 3426 p.

VESELENAK, R. L. et al. A Vaxfectin®-adjuvanted HSV-2 plasmid DNA vaccine is effective for prophylactic and therapeutic use in the guinea pig model of genital herpes. **Vaccine**, v. 30, n. 49, p. 7046-7051, 2012.

VIDAL, E. Inoculabilité des pustules d'ecthyma. **Annales de Dermatologie et de Syphiligraphie II**, v. 4, p. 350-358, 1873.

WANG, R. R. et al. Mangiferin, an anti-HIV-1 agent targeting protease and effective against resistant strains. **Molecules**, v. 16, n. 5, p. 4264-4277, 2011.

WHITLEY, R.; KIMBERLIN, D. W.; PROBER, C. G. Pathogenesis and disease. In: ARVIN, A. et al. **Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.

WHITLEY, R.; BAINES, J. Clinical management of herpes simplex virus infections: past, present, and future. **F1000Research**, v. 7, p. 1726, 2018.

WILSON, A. C.; MOHR, I. A cultured affair: HSV latency and reactivation in neurons. **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 12, p. 604-611, 2012.

YOOSOOK, C. et al. Anti-herpes simplex virus activities of crude water extracts of Thai medicinal plants. **Phytomedicine**, v. 6, n. 6, p. 411-419, 2000.

ZHU, L.; ZHU, H. Ocular herpes: the pathophysiology, management and treatment of herpetic eye diseases. **Virologica Sinica**, v. 29, n. 6, p. 327-342, 2014.

4 ARTIGOS

4.1 ARTIGO 1

Topical formulation containing mangiferin: a promising xanthone for the control of acyclovir - resistant herpes simplex virus 1 infection.

Daniele Zandrini Rechenchoski^{1,2}, Karoline Fontana Agostinho¹, Ligia Carla Faccin-Galhardi¹, Audrey Alesandra Stingham Garcia Lonni², João Vinícius Honório da Silva³, Fábio Goulart de Andrade³, Arcelina Pacheco Cunha⁴, Nágila Maria Pontes Silva Ricardo⁴, Carlos Nozawa¹, Rosa Elisa Carvalho Linhares^{1*}

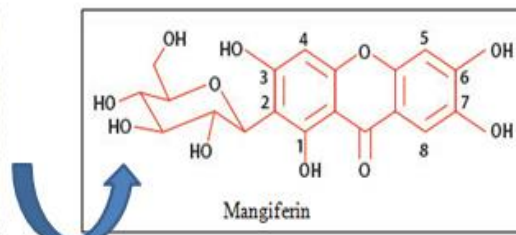
¹Departamentos de Microbiologia, ²Ciências Farmacêuticas and ³Histologia - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

⁴Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

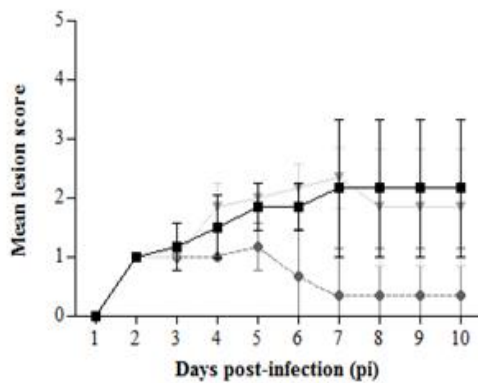
Graphical Abstract



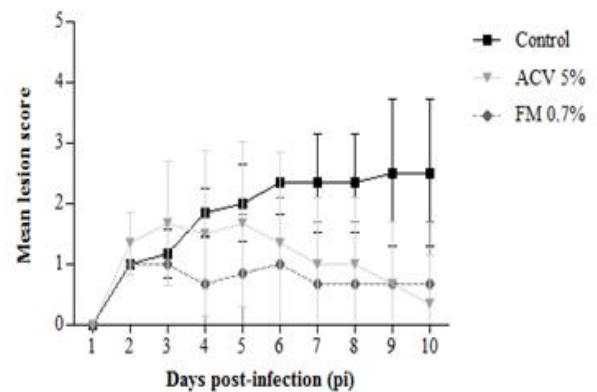
Mangifera indica



Female Balb/c mice infected with a cyclovir-resistant HSV-1



Male Balb/c mice infected with a cyclovir-resistant HSV-1



Highlights

- The *in vitro* and *in vivo* antiviral activity of mangiferin were investigated.
- *In vitro*, mangiferin blocked the early stages of HSV-1 replication.
- *In vivo*, mangiferin demonstrated a significant delay of skin lesions appearance.
- We demonstrated its potentiality on the control of acyclovir-resistant HSV infection.

Abstract

Acyclovir (ACV) is the drug of choice for the treatment of herpes simplex virus (HSV) infections. The high prevalence and the emergence of resistant strains to ACV have stimulated the search for new drugs. In this study, we investigated the *in vitro* and *in vivo* activity of mangiferin against ACV-resistant HSV-1 AR-29 strain, comparatively to the sensitive KOS strain. The 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) and the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) were determined by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and plaque reduction assay (PRA), respectively. The *in vitro* mangiferin activity was performed using different treatment protocols: simultaneous, virucidal and inhibition of adsorption, by PRA and inhibition of viral ICP4 protein synthesis by immunofluorescence. The *in vivo* mangiferin antiviral activity was performed in Balb/c mice infected by skin scarification and treated with topical 0.7% (w/w) mangiferin formulation. The substance showed $CC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$ and IC_{50} of 2.9 $\mu\text{g/mL}$ and 3.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively, for the AR-29 and KOS strains. The mangiferin inhibited mainly the AR-29 strain likely by direct contact with the virus and in mice, attenuated the lesions, postponed their appearance or enhanced healing, in comparison to control group. Therefore, we demonstrated the potentiality of mangiferin to control HSV replication with emphasis to ACV-resistant infection.

Keywords: Herpes simplex, Mangiferin, Antiviral, Acyclovir, Resistance.

1. Introduction

Herpes simplex virus (HSV) is a neuroepitheliotropic agent that establishes latent infection in sensory neurons mainly after an acute onset, with episodes of reactivation (Thellman and Triezenberg, 2017). This virus affects greatly the patients quality of life and presents relevant epidemiological significance. The WHO estimated in 2012 more than 3,7 billion persons under 50 years of age worldwide infected with HSV-1 (Looker et al., 2015).

Acyclovir (ACV) is the drug of choice for the treatment of HSV infection, however, it neither prevents latency nor recurrence. Furthermore, its widespread and haphazard use have also cooperated in selecting resistant strains, either by mutation in the *tk* or *DNA pol* genes or both. These strains also present cross-resistance to homologous antivirals (Frobert et al., 2014; Jiang et al., 2016). It has been shown that in immunocompromised patients, the

prevalence of ACV-resistant HSV strain is high from 3-10%, depending on the type of immunosuppression (Whitley et al., 1982).

The management of ACV or its prodrug-resistant HSV infections include the use of phosphonoformate (foscarnet) and cidofovir, however, their high toxicity causes significant side effects, such as, renal failure (Torres et al., 2012). Although vaccines have been explored in pre-clinical and clinical investigations, no efficacious vaccine is available against HSV infections (Johnston et al., 2016). Therefore, the development of new antiherpetic drug exhibiting alternative mechanism of action, with low toxicity and high selectivity is challenging (Torres et al., 2012).

Mangiferin, a polyphenol of C-glycosylxanthone structure, is found in many plant species, among them the mango tree (*Mangifera indica*), the major source (Matkowski et al., 2013). It has been used to treat burns, cough, itch, fever, mouth and throat infections, scurvy, gastrointestinal disorders and rheumatism, upon ethnopharmacological grounds (Sharma et al., 2017; Wauthoz et al., 2007). Pharmacological properties, such as, antioxidant, antimicrobial, antiallergic, anticancer, anti-inflammatory, antinociceptive, immunomodulatory and adjuvant in dermatology have been suggested (Imran et al., 2017; Ochocka et al., 2017). Herein, the present study aimed to investigate the *in vitro* activity of mangiferin and its topical formulation in mice, against the infection by ACV-resistant and -sensitive HSV-1 strains.

2. Materials and Methods

2.1 Compound: The mangiferin, extracted, purified and characterized from of bark, stem and leaves of *Mangifera indica* L., according to Barreto et al. (2008), was supplied by DQOI/UFC, BR.

2.2 Cell and virus: Vero cells (African green monkey kidney epithelial cells, ATCCCL-81) used throughout were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (*Invitrogen - Gibco, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (*), 2 mM glutamine (**Sigma Chem. Co., USA) and treated with 100 µg/mL streptomycin (Gibco BRL, USA), 100 IU/mL penicillin (Novafarma Ind. Farm., BR) and 2.5 µg/mL of amphotericin B (Meizler Biopharma S/A, BR). The HSV-1 strains AR-29 and KOS, respectively, ACV-resistant and sensitive, were supplied by the LITDFC/DBS/UEM, BR. The virus stock titer was worked out by plaque assay and stored at -20 °C in glycerol.

2.3 Cytotoxicity assay: The mangiferin cytotoxicity was determined by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) kit assay (**). Briefly, cells grown in 96-well microplates (TPP, Switzerland) were treated with varying concentrations of mangiferin (31.25 µg/mL to 500 µg/mL) and incubated at 37 °C with 5% CO₂, for 72 h. The test was carried out according to the manufacturer's instructions. The percentage of cell viability (% CV) was calculated using the formula $\% CV = (At/Ac) \times 100$, where At and Ac refer to the absorbance of test substance and control (untreated cells), respectively. The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) was defined as the concentration of the mangiferin capable to reduce MTT product absorbance by 50% in relation to cell control by linear regression analysis (Godoi et al., 2014).

2.4 The in vitro antiviral activity: The antiviral activity was conducted by the plaque reduction assay (PRA), according to Espada et al. (2015). Briefly, cell cultures grown in 24-well plates (TPP, Switzerland) were treated with varying concentrations of mangiferin (3.12, 6.25, 12.5 and 25 µg/mL), infected with HSV-1 AR-29 or KOS strain (10⁵ PFU/mL - plaque forming unit), under the following protocols: simultaneous treatment with the infection, virucidal and inhibition of adsorption assays. Cultures were overlaid with nutrient agarose (DMEM 2x/1.8% agarose [v/v]) containing 25 mM of MgCl₂ and the plates were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. The plaques developed after 72 h of incubation were fixed with 20% formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.3, for 24 h and stained with 0.5% crystal violet in 20% ethanol. The percent of viral inhibition (%VI) was found as follows: $\%VI = [1 - (PFU \text{ in treated cells}/PFU \text{ in virus control})] \times 100$ (Nishimura et al., 1977). The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was determined as the concentration of the compound capable to reduce virus titer by 50%, by linear regression of the viral inhibition curves. The mangiferin relative safety determined by the selectivity index (SI) was calculated by the ratio of CC₅₀/IC₅₀.

2.4.1 Simultaneous treatment: The cells were treated with mangiferin at the same time of the infection (time 0 h) (Lopes et al., 2013).

2.4.2 Virucidal assay: Virus suspension was incubated with concentrations of mangiferin for 1 h at 37 °C in water bath, followed by inoculation and incubation at 37°C for 1 h and PRA (Godoi et al., 2015).

2.4.3 Inhibition of adsorption assay: The cells were pre-incubated at 4 °C for 30 min, treated with varying concentrations of mangiferin simultaneously with infection. After 1 h adsorption at 4 °C, PRA was carried out, according to Lopes et al. (2017), with modifications.

2.5 Immunofluorescence assay (IFA): Cells grown on coverslips in 24-well plates were infected with AR-29 or KOS strains and treated with mangiferin at 1.56 to 12.5 µg/mL, at time 0 h of infection. After 24 hours, the cells were washed with 0.05% Tween-20 PBS (0.1 M, pH 7.3), fixed with cold acetone (-20 °C) for 20 min and blocked with 2% powdered skim milk in PBS during 30 min. The IFA was performed using mouse anti-HSV-1/ICP4 (Santa Cruz Biotechnol., USA) and goat anti-mouse IgG conjugated with fluorescein isothiocyanate (**). The cells were examined in a Zeiss fluorescence microscope (Zeiss Axio Imager A1) and 100 cells/coverslips were scored. The percentage of fluorescent cells inhibition was calculated in comparison to infected and untreated cells (Yamamoto et al., 2013).

2.6 Formulations: O/W emulsions were prepared by the phase-inversion emulsification method in two steps, using ceteryl alcohol, cetareth-20, glyceryl stearate, mineral oil, caprylic/capric triglycerides, propylene glycol, glycerin, methylparaben, distilled water with 0.7% (w/w) mangiferin (FM) or without (BF). Ceteryl alcohol, cetareth-20, glyceryl stearate, mineral oil and caprylic/capric triglycerides were dispersed in the oil phase. Glycerin and methylparaben were dispersed in the aqueous phase. The oil and aqueous phases were heated separately to 75 ± 2 °C. The oil phase was slowly added to the aqueous phase with stirring at 450 rpm (RW20 Digital Mixer, IKA, Wilmington, NC) until 40 °C. Mangiferin dispersed in propylene glycol was added to the emulsion at 25 °C (Ribeiro, 2010). Commercially available ACV cream (50 mg/g - Medley Pharm. Ltd, BR), was used as positive control.

2.7 Characterization of the formulations: Organoleptic properties of the formulations, as well as, morphology, pH and stability were carried out accordingly to Brasil (2004, 2008), and, spreadability as previously (Borghetti and Knorst, 2006).

2.8 Animals: Experimental procedure was granted by the UEL Animal Ethics Committee (CEUA n° 24414.2015.49). Balb/c mice (5 weeks old and 22-27 g weight) supplied by UEM were acclimated before the experiments, under 12 h light/12 h dark diurnal cycle, at 22 ± 2 °C, with food (Nuvilab CR1-Nuvital[®], BR) and water *ad libitum*. The mice

were randomly separated into six groups with six animals: (I) animals scarified not infected and not treated; (II) animals not scarified, not infected and treated with BF; (III) control group - animals scarified, infected and not treated; (IV) animals scarified, infected and treated with BF; (V) animals scarified, infected and treated with FM; (VI) animals scarified, infected and treated with ACV.

2.9 The in vivo antiviral activity: Experiment performed as previously (Chuanasa et al., 2008; Kurokawa et al., 1995; Lipipun et al., 2003) with minor modifications, consisted of right mid flank depilation, under i.p. anesthetic, and needle scarification 24 h latter, followed by inoculation of 70 μ L of AR-29 or KOS strain (10^5 PFU/mL). Topical treatment initiated at 4 h after inoculation, 5 times a day, at, approximately, 3 h-interval, during 10 successive days, without application at night. The development of skin lesions and mortality were monitored and the severity of the lesions scored, as follows: 0 - no visible lesions; 1 - vesicles locally; 2 - erosion and/or ulceration locally; 3 - mild zosteriform lesions; 4 - moderate zosteriform lesions; 5 - severe zosteriform lesions (Fig. 1) or 6 - death. On the tenth day, the euthanasia was performed and skin harvested for histological analysis.

2.9.1 Histological analysis: The skin was fixed in Bouin solution, dehydrated with ethanol, diaphanized with xylol and embedded in paraffin. For each animal, four 5 μ m - thick histological sections were stained with hematoxylin-eosin (HE) and analyzed at the LAHip/UEL.

2.10 Statistical Analysis: Anova followed by Tukey's test were applied to determine the difference among experiments with mangiferin and controls. The experiments were carried out in triplicate. The difference among animals treated with FM and control group was also determined by Anova followed by Tukey's test. For data normality of the histological analysis was performed the Shapiro-Wilk test. Heterogeneous data were analyzed by the Kruskal-Wallis test complemented by Dunn's post-test. For all data analysis GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software Inc., CA, USA) was used. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant and the results were expressed as the mean \pm standard deviation (SD).

4. Results

4.1 Cytotoxicity assay: The mangiferin was not cytotoxic to Vero cell until the highest concentration tested ($CC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$).

4.2 The in vitro antiviral activity: The *in vitro* mangiferin antiviral activity against AR-29 and KOS strains is shown in Fig. 2, 3 and 4.

In treatment simultaneously with infection (time 0 h), mangiferin exhibited high %VI, 94.4%, 100% and 100% at concentrations of 6.25, 12.5 and 25 $\mu\text{g/mL}$, respectively, for the AR-29 strain. Similar values of %VI were found for KOS strain, 93.9%, 100% and 100%, respectively, at the same concentrations (Fig. 2). The IC_{50} of 2.9 $\mu\text{g/mL}$ ($SI > 172.4$) and 3.5 $\mu\text{g/mL}$ ($SI > 142.8$) for the AR-29 and KOS strains were determined, respectively.

For the virucidal assay, mangiferin showed maximum inhibition for all the tested concentrations for AR-29 strain. While, the inhibition rate was significantly lower for KOS strain, reaching the maximum inhibition (74.8%) at the highest concentration (25 $\mu\text{g/mL}$) (Fig. 3).

In addition, for the inhibition of adsorption assay, mangiferin inhibited the AR-29 strain by 71.3% and 74% at the concentrations of 12.5 and 25 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Maximum inhibition was observed, for the KOS strain at 25 $\mu\text{g/mL}$. However, at 3.12 $\mu\text{g/mL}$ the %VI decreased significantly to 29.2% (Fig. 4).

In relation to immunofluorescence, the inhibition in the synthesis of ICP4 protein by mangiferin was also demonstrated by the decrease of fluorescent cells, showing a %VI of 54.1% and 29.6% for the AR-29 and KOS strains, respectively, at concentration of 12.5 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 5).

4.3 The in vivo antiviral activity: Figures 6 and 7 show the effect of mangiferin against AR-29 strain. Regarding female mice, the same lesion pattern (only vesicles) was demonstrated for all groups until 2 days post-infection (pi) (Fig. 6). On day 5 pi animals of the control group and those treated with ACV developed similar skin ulcers. At the same time, animals treated with FM presented minimization of the lesion evolution, since most of the animals remained with vesicles. Some animals of control group and treated with ACV developed zosteriform lesions on day 7 pi. By this time most of the infected and FM-treated animals were already presenting significant difference ($p < 0.05$) either by retrieved skin or with minor lesions.

Figure 7 shows the same experiment in male mice infected with the AR-29 strain. On day 5 pi animals of the control group and treated with ACV presented ulcerated lesions and, in some cases, zosteriform. However, half of the animals treated with FM demonstrated normal skin and no case of zosteriform lesion was found. From day 7 pi on most of animals treated with FM showed no indication of visible infection, oppositely to the most of control group animals, still showing ulcerations. The results demonstrated that male mice treated with FM presented a significant delay in the development and progression of skin lesions compared with the control ($p < 0.05$).

For the control group of females infected with KOS strain, ulcers appeared in all animals on day 3 pi and on day 7 pi some developed zosteriform lesions. Females treated with FM followed an evolution similar to that of the control group until day 2 pi, but, from day 7 pi on, some animals were already with normal skin. However, no statistically significant difference was observed among these groups ($p > 0.05$). Comparatively, the females treated with ACV had a milder evolution of the lesions, because on day 3 pi some still had only vesicles and on day 5 pi some already presented retrieved skin (Fig. 8).

KOS strain infected males of the control group developed signs of infection (vesicles) on day 2 pi and on day 5 pi all the animals already presented ulcerated skin, including zosteriform lesions. From day 6 pi some animals developed progressive zosteriform lesions, evolving from moderate to severe grade. As in the control group, the group treated with FM, also presented only vesicles on day 2 pi and on day 5 pi there was predominance of ulcers, however, without intense lesions. This difference was not statistically significant ($p > 0.05$). Moreover, the ACV treated group developed ulcers on day 2 pi, but on day 7 pi all animals showed retrieved skin (Fig. 9).

There was no significant change in the weight of the mice and no animal died during the experiment at the end of day 10 pi. Concerning animals of the infected and treated with BF group, in general, mostly evolved with the lesion with only some cases of wound healing. While the animal group neither submitted to scarification nor infected showed no signs of toxicity after BF application.

4.3.1 Histological analysis: The thickness of the dermis and epidermis was evaluated for all animals and briefly, no statistically significant difference was observed between the group treated with BF formulation only without being scarified and infected and the group treated with FM ($p > 0.05$).

5. Discussion

The proposal to study this compound, as a potential inhibitor of virus replication, is based upon desirable features. Being a natural compound it would be less prone to side effects, such as, toxicity. Moreover, the following profile could be shown in the substance under scrutiny: a) A drug with multistep mechanism of action in the key points of viral replication; b) A drug with lesser possibility to select resistant strains comparatively to synthetic ones; c) Presenting an uncomplex chemical structure the synthesis of the compound would be facilitated (Brandão et al., 2017). Therefore, in this study we showed that mangiferin complied with most of those principles.

The mangiferin showed low cytotoxicity with ($CC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$) and IC_{50} for AR-29 strain of $2.9 \mu\text{g/mL}$ resulting in high selectivity ($SI > 172.4$). This relatively high SI indicates that mangiferin exhibits good activity against HSV and can selectively inhibit virus replication without being significantly toxic to host. This is one of the main features required for a potential antiviral agent. Our results are similar to those reported by Wang et al. (2011), who also found low toxicity of mangiferin in C8166, peripheral blood mononuclear cells and H9 cells when evaluating resistant strains of HIV-1. Extract of *Schinus terebinthifolia*, an *Anacardiaceae* family plant, the same as that of *Mangifera indica*, presented similar toxicity in Vero cells as in our experiment with mangiferin ($CC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$) (Nocchi et al., 2017).

Our results showed that mangiferin inhibited more effectively the AR-29 strain than the KOS strain, *in vitro*, and, therefore, it is conceivable to presume a mechanism of action different to that of ACV. Being ACV an analogue of guanosine it interferes blocking the viral DNA synthesis in the HSV replication (Bag et al., 2013; Piret and Boivin, 2011), meaning that ACV does not eliminate virus in latent infection or avoid recurrence. In the present study, we also found that mangiferin inhibited mainly HSV-1 AR-29 by direct contact with the virus, as shown by virucidal assay. According to Zhu et al. (2004), being HSV enveloped, the virucidal effect of mangiferin may be associated with chemical modification or masking essential envelope proteins. In addition, mangiferin also inhibited the viral adsorption to cell receptors. Supporting this finding, studies have demonstrated that some substances may mimic receptors or only accumulate in target cell, hindering virus attachment (Colpitts and Schang, 2014; Johari et al., 2012; Sametband et al., 2014). Ueda et al. (2013) observed that not only xanthenes but also other polyphenols, such as tannins, interacted with viral proteins, inducing aggregation and restricting virus adsorption to the cells. In corroboration with these results, Vázquez-Calvo et al. (2017) analyzed the antiviral properties of the polyphenols and

also observed that the compounds acted during the early stages of the infection. It is thought that polyphenols act by associating with the positively charged region of viral glycoprotein and/or the negatively charged heparan sulfate chains of host cell surfaces, resulting in a prevention or reduction of viral adsorption (Mendes et al., 2010). Moreover, mangiferin inhibited the synthesis of ICP4, an immediate early protein required for efficient transcription of early and late viral genes.

Therefore, the HSV-1 inhibition by mangiferin involves the blockage of early stages of replication, which precede the step of DNA synthesis, avoiding dissemination of virus in the host. Thus, it is suggested that, mutations in *tk* or *DNA pol* genes, in ACV resistant strain will not necessarily show cross-resistance with mangiferin. The mangiferin virucidal effect with high SI might be useful as topical agent to inactivate virus or in combination with other antiviral drugs. This combination may suppress virus replication to undetectable levels and minimizes the selection of resistance (Prichard et al., 2011). It has been shown that ethanol extracts of Brazilian propolis moderately alleviated the symptoms of cutaneous herpetic infection in mice, after their oral administration (Shimizu et al., 2011). *Lobelia chinensis* methanolic extracts significantly blocked HSV-1 replication in HeLa cells, and, orally treated mice had a sustained protection (Kuo et al., 2008). *Bidens pilosa* extract showed activity against HSV-1 *in vitro* and when orally administered in mice was effective against ACV resistant strains (Nakama et al., 2012). In our study, besides of the antiviral efficacy of mangiferin *in vitro*, the compound was extracted, purified and incorporated in a topical formulation. Cardozo et al. (2013) showed that a sulfated derivative of *Agaricus brasiliensis* polysaccharide was not effective as topical treatment model in mice; however, orally administered formula accelerated HSV lesions healing. Sushanth et al. (2016) studied a formulation of *M. indica* fruit powder and honey and showed effective wound healing activity in mice.

In conclusion, our findings demonstrated that mangiferin exhibited *in vitro* and *in vivo* antiviral activity for HSV-1 AR-29 and KOS strains. It is remarkable the effect of the compound in AR-29 strain by its potentiality to the control of ACV-resistant infection. One of the suggested mechanisms for this inhibition is the direct effect that mangiferin exerts on the viral particle. Furthermore, we develop FM formulation that is in conformity with the predetermined criteria of pH, spreadability and stability. Our results showed that the topical application of this formulation attenuated the lesions, postponed their appearance or enhanced healing compared with the control group. Further investigation should be conducted to improve our understanding of the effect of mangiferin to control HSV replication.

Conflict of interests: The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments: This study was partially financed by CAPES (Finance Code 001), CNPq and Fundação Araucária.

References

Bag, P., Ojha, D., Mukherjee, H., Halder, U.C., Mondal, S., Chandra, N.S., Nandi, S., Sharon, A., Sarkar, M.C., Chakrabarti, S., Chattopadhyay, D., 2013. An indole alkaloid from a tribal folklore inhibits immediate early event in HSV-2 infected cells with therapeutic efficacy in vaginally infected mice. *PLoS One*. 8, e77937.

Barreto, J.C., Trevisan, M.T.S., Hull, W.E., Erben, G., Brito, E.S., Pfundstein, B., Wurtele, G., Spiegelhalder, B., Owen, R.W., 2008. Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves, and peel of Mango (*Mangifera indica* L.). *J. Agric. Food Chem.* 56, 5599–5610.

Borghetti, G.S., Knorst, M.T., 2006. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 42, 531-537.

Brandão, G.C., Kroon, E.G., Filho, J.D.S., Oliveira, A.B., 2017. Antiviral activity of *Fridericia formosa* (Bureau) L. G. Lohmann (*Bignoniaceae*) extracts and constituents. *J. Trop. Med.* 2017, 1-11.

Brasil, Ministério da Saúde, 2008. Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos, 2ª ed. Anvisa, Brasília.

Brasil, Ministério da Saúde. 2004. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. 1ª ed. Anvisa, Brasília.

Cardozo, F.T., Larsen, I.V., Carballo, E.V., Jose, G., Stern, R.A., Brummel, R.C., Camellini, C.M., Rossi, M.J., Simões, C.M., Brandt, C.R., 2013. *In vivo* anti-herpes simplex virus activity of a sulfated derivate of *Agaricus brasiliensis* mycelial polysaccharide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 2541-2549.

Chuanasa, T., Phromjai, J., Lipipun, V., Likhitwitayawuid, K., Suzuki, M., Pramyothin, P., Hattori, M., Shiraki, K., 2008. Anti-herpes simplex virus (HSV-1) activity of oxyresveratrol derived from Thai medicinal plant: mechanism of action and therapeutic efficacy on cutaneous HSV-1 infection in mice. *Antivir. Res.* 80, 62-70.

Colpitts, C.C., Schang, L.M., 2014. A small molecule inhibits virion attachment to heparan sulfate- or sialic acid-containing glycans. *J. Virol.* 88, 7806-7817.

Espada, S.F., Faccin-Galhardi, L.C., Rincão, V.P., Bernardi, A.L.S., Lopes, N., Longhini, R., Mello, J.C.P., Linhares, R.E.C., Nozawa, C., 2015. Antiviral activity of *Trichilia catigua* bark extracts for herpesvirus and poliovirus. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 16, 724-732.

Frobert, E., Burrel, S., Ducastelle-Lepretere, S., Billaud, G., Ader, F., Casalegno, J.S., Nave, V., Boutolleau, D., Michallet, M., Lina, B., Morfin, F., 2014. Resistance of herpes simplex viruses to acyclovir: an update from a ten-year survey in France. *Antivir. Res.* 111, 36-41.

Godoi, A.M., Faccin-Galhardi, L.C., Lopes, N., Nozawa, C., Almeida, R.R., Ricardo, N.M.P.S., Linhares, R.E.C., 2015. Characterization and antiherpetic activity of native and chemically sulfated polysaccharide from *Adenanthera pavonina*. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 16, 1024-1031.

Godoi, A.M., Faccin-Galhardi, L.C., Lopes, N., Rechenchoski, D.Z., Almeida, R.R., Ricardo, N.M.P.S., Nozawa, C., Linhares, R.E.C., 2014. Antiviral activity of sulfated polysaccharide of *Adenanthera pavonina* against poliovirus in HEP-2 cells. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2014, 1-6.

Imran, M., Arshad, M.S., Butt, M.S., Kwon, J.H., Arshad, M.U., Sultan, M.T., 2017. Mangiferin: a natural miracle bioactive compound against lifestyle related disorders. *Lipids Health Dis.* 16, 1-17.

Jiang, Y.C, Feng, H., Lin, Y.C, Guo, X.R., 2016. New strategies against drug resistance to herpes simplex virus. *Int. J. Oral Sci.* 8, 1-6.

Johari, J., Kianmehr, A., Mustafa, M.R., Abubakar, S., Zandi, K., 2012. Antiviral activity of baicalein and quercetin against the japanese encephalitis virus. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 16785-16795.

Johnston, C., Gottlieb, S.L., Walda, A., 2016. Status of vaccine research and development of vaccines for herpes simplex virus. *Vaccine.* 34, 2948-2952.

Kuo, Y.C., Lee, Y.C., Leu, Y.L., Tsai, W.J., Change, C.S., 2008. Efficacy of orally administered *Lobelia chinensis* extracts on herpes simplex virus type 1 infection in Balb/c mice. *Antivir. Res.* 80, 206-212.

Kurokawa, M., Nagasaka, K., Hirabayashi, T., Uyama, S., Sato, H., Kageyama, T., Kadota, S., Ohyama, H., Hozumi, T., Namba, T., Shiraki, K., 1995. Efficacy of traditional herbal medicines in combination with acyclovir against herpes simplex virus type 1 infection *in vitro* and *in vivo*. *Antivir. Res.* 27, 19-37.

Lipipun, V., Kurokawa, M., Suttisri, R., Taweechoitipatr, P., Pramyothin, P., Hattori, M., Shiraki, K., 2003. Efficacy of Thai medicinal plant extracts against herpes simplex virus type 1 infection *in vitro* and *in vivo*. *Antivir. Res.* 60, 175-180.

Looker, K.J., Margaret, A.S., May, M.T., Turner, K.M., Vickerman, P., Gottlieb, S.L., Newman, L.M., 2015. Global and regional estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 1 infections in 2012. *PLoS One.* 10, e0140765.

Lopes, N., Faccin-Galhardi, L.C., Espada, S.F., Ricardo, N.M.P.S., Linhares, R.E.C., Nozawa, C., 2013. Sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplex virus and poliovirus. *Int. J. Biol. Macromol.* 60, 93-99.

Lopes, N., Ray, S., Espada, S.F., Bomfim, W.A., Ray, B., Faccin-Galhardi, L.C., Linhares, R.E.C., Nozawa, C., 2017. Green seaweed *Enteromorpha compressa* (*Chlorophyta, Ulvaceae*) derived sulphated polysaccharides inhibit herpes simplex virus. *Int. J. Biol. Macromol.* 102, 605-612.

Matkowski, A., Kus, P., Goralska, E., Wozniak, D., 2013. Mangiferin - a bioactive xanthonoid, not only from mango and not just antioxidant. *Mini Rev. Med. Chem.* 13, 439-455.

Mendes, G.D.S., Soares, A.R., Martins, F.O., Albuquerque, M.C.M., Costa, S.S., Yoneshigue-Valentin, Y., Gestinari, L.M.D.S., Santos, N., Romanos, M.T.V., 2010. Antiviral activity of the green marine alga *Ulva fasciata* on the replication of human metapneumovirus. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 52, 3-10.

Nakama, S., Tamaki, K., Ishikawa, C., Tadano, M., Mori, N., 2012. Efficacy of *Bidens pilosa* extract against herpes simplex virus infection *in vitro* and *in vivo*. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2012, 413453.

Nishimura, T., Toku, H., Fukuyasu, H., 1977. Antiviral compounds. XII Antivira activity of amidinohydrazones of alkoxyphenyl-substituted carbonyl compounds against influenza virus in eggs and in mice. *Kitasato Arch. Exp. Med.* 50, 39-46.

Nocchi, S.R., Companhoni, M.V.P., Mello, J.C.P., Filho, B.P.D., Nakamura, C.V., Carollo, C.A., Silva, D.B.; Nakamura, T.U., 2017. Antiviral activity of crude hydroethanolic extract from *Schinus terebinthifolia* against herpes simplex virus type 1. *Planta Med.* 83, 509-516.

Ochocka, R., Hering, A., Stefanowicz-Hadjduk, J., Cal, K., Baranska, H., 2017. The effect of mangiferin on skin: penetration, permeation and inhibition of ECM enzymes. *PLoS One.* 12, e0181542.

Piret, J., Boivin, G., 2011. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence and management. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 459-472.

Prichard, M.N., Kern, E.R., Hartline, C.B., Lanier, E.R., Quenelle, D.C., 2011. CMX001 potentiates the efficacy of acyclovir in herpes simplex virus infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4728-4734.

Ribeiro, C. 2010. *Cosmetologia aplicada à dermoestética*, 2ª ed. Pharmabooks, São Paulo.

Sametband, M., Kalt, I., Gedanken, A., Sarid, R., 2014. Herpes simplex virus type-1 attachment inhibition by functionalized graphene oxide. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 6, 1228-1235.

Sharma, B.G., Mammen, D., Albert, S., 2017. Assessment of mangiferin in thirty varieties of *Mangifera indica* L. (*Anacardiaceae*). *Int. J. Pharmacogn.* 4, 169-173.

Shimizu, T., Takeshita, Y., Takamori, Y., Kaj, H., Sawamura, R., Yoshida, H., Watanabe, W., Tsutsumi, A., Park, Y. K., Yasukawa, K., Matsuno, K., Shiraki, K., Kurokawa, M., 2011. Efficacy of Brazilian propolis against herpes simplex virus type 1 infection in mice and their modes of antiherpetic efficacies. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2011, 976196.

Sushanth, K.A., Lakshmi, K.C., Reddy, D.S., 2016. Evaluation of wound healing activity with a new formulation of dry *Mangifera indica* and honey using swiss albino mice. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 9, 139-142.

Thellman, N.M., Triezenberg, S.J., 2017. Herpes simplex virus establishment, maintenance, and reactivation: *in vitro* modeling of latency. *Pathogens*. 6, 28.

Torres, N.I., Castilla, V., Bruttomesso, A.C., Eiras, J., Galagovsky, L.R., Wachsmann, M.B., 2012. *In vitro* antiviral activity of dehydroepiandrosterone, 17 synthetic analogs and ERK modulators against herpes simplex virus type 1. *Antivir. Res.* 95, 37-48.

Ueda, K., Kawabata, R., Irie, T., Nakai, Y., Tohya, Y., Takemasa, S., 2013. Inactivation of pathogenic viruses by plant-derived tannins: strong effects of extracts from persimmon (*Diospyros kaki*) on a broad range of viruses. *PLoS One*. 8, e55343.

Vázquez-Calvo, A., Oya, N.J., Martín-Acebes, M.A., Garcia-Moruno, E., Saiz, J.C., 2017. Antiviral properties of the natural polyphenols delphinidin and epigallocatechin gallate against the flaviviruses west nile virus, zika virus, and dengue virus. *Front. Microbiol.* 8, 1314.

Wang, R.R., Gao, Y.D., Ma, C.H., Zhang, X.J., Huang, C.G., Huang, J.F., Zheng, Y.T., 2011. Mangiferin, an anti-HIV-1 agent targeting protease and effective against resistant strains. *Molecules*. 16, 4264-4277.

Wauthoz, N., Balde, A., Balde, E.S., Damme, M.V., Duez, P., 2007. Ethnopharmacology of *Mangifera indica* L. bark and pharmacological studies of its main C-glucosylxanthone, mangiferin. *Int. J. Biomed. Pharmaceut. Sci.* 1, 112-119.

Whitley, R., Barton, N., Collins, E., Whelchel, J., Diethelm, A.G., 1982. Mucocutaneous herpes simplex virus infections in immunocompromised patients. A model for evaluation of topical antiviral agents. *Am. J. Med.* 73, 236-40.

Yamamoto, K.A., Galhardi, L.C.F., Rincão, V.P., Soares, S.A., Vieira, I.G.P., Ricardo, N.M.P.S., Nozawa, C, Linhares, R.E.C., 2013. Antiherpetic activity of an *Agaricus brasiliensis* polysaccharide, its sulphated derivate and fractions. *Int. J. Biol. Macromol.* 52, 9-13.

Zhu, W., Chiu, L.C., Ooi, V.E., Chan, P.K., Ang, P.O.J., 2004. Antiviral property and mode of action of a sulphated polysaccharide from *Sargassum patens* against herpes simplex virus type 2. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 24, 279-283.

Fig. 1. Score of the severity of skin lesions in Balb/c mice. The animals were infected by skin scarification and inoculation of HSV-1 AR-29 or KOS strains.

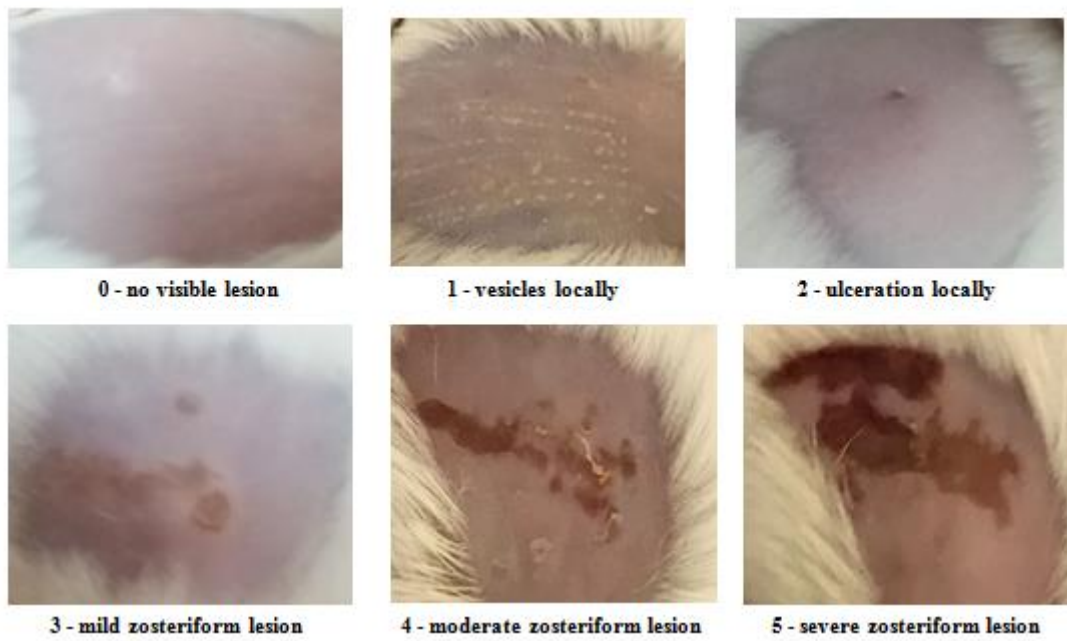


Fig. 2. The effect of the mangiferin in the replication of HSV-1 AR-29 and KOS strains when added concomitantly to viral infection (time 0 h), in Vero cells by plaque reduction assay. The percentage of viral inhibition is expressed as the mean \pm SD of triplicate independent experiments.

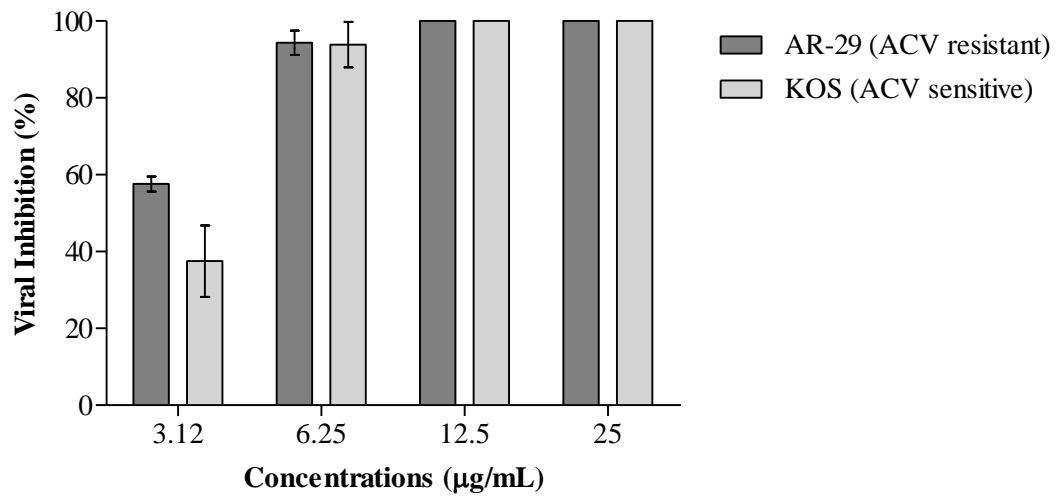


Fig. 3. The virucidal effect of the mangiferin on HSV-1 AR-29 and KOS strains in Vero cells by plaque reduction assay. The percentage of viral inhibition is expressed as the mean \pm SD of triplicate independent experiments.

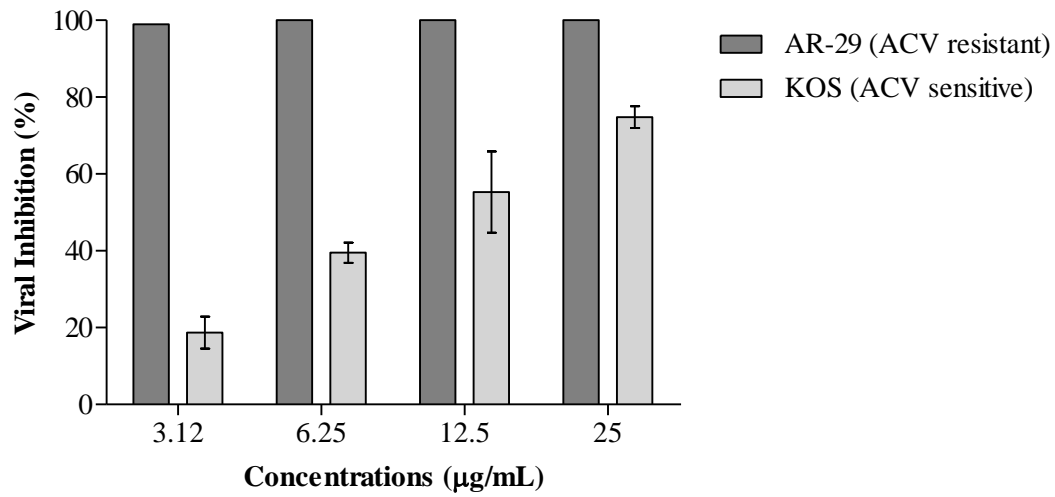


Fig. 4. The effect of the mangiferin in the inhibition of the adsorption of HSV-1 AR-29 and KOS strains in Vero cells by plaque reduction assay. The percentage of viral inhibition is expressed as the mean \pm SD of triplicate independent experiments.

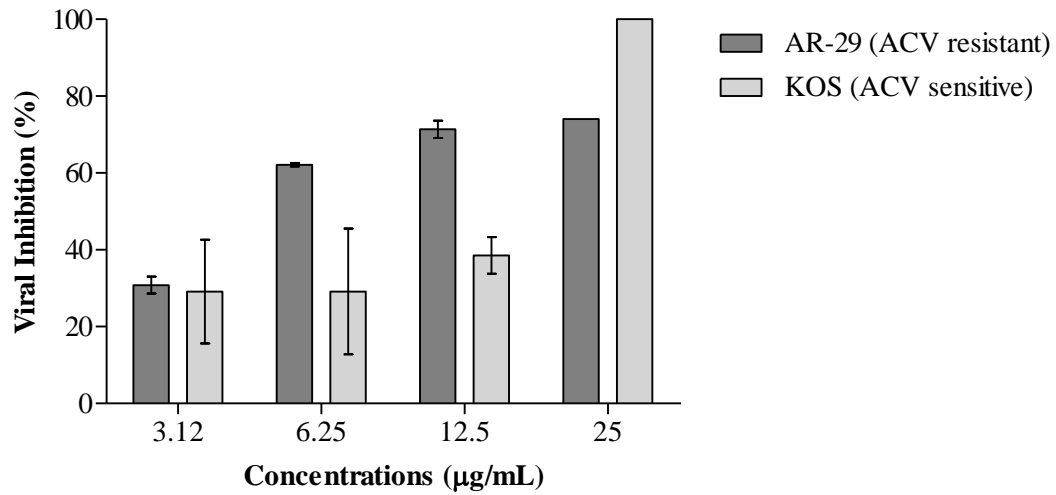


Fig. 5. The effect of the mangiferin in the synthesis of HSV-1 AR-29 and KOS strains ICP4 protein by immunofluorescence assay. The compound was added at the time 0 h of the infection, at the indicated concentrations (1.56 - 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The percentage of viral inhibition is expressed as the mean \pm SD of duplicate independent experiments.

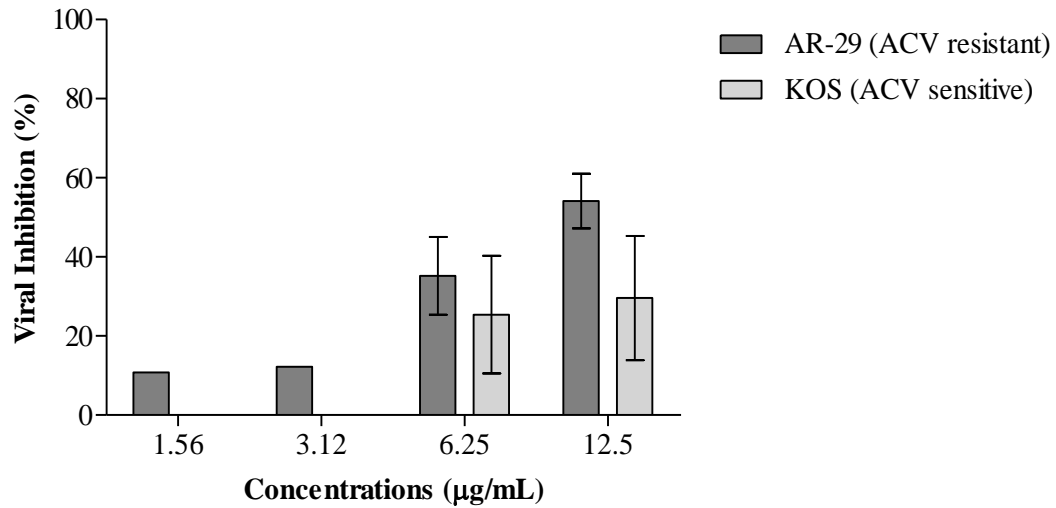


Fig. 6. The effect of the FM (0.7%; w/w) mangiferin formulation in the development of skin lesions caused by HSV-1 AR-29 strain, in female Balb/c mice. The animals were infected by skin scarification and topically treated either with FM or ACV (50 mg/g) 4 h after infection, 5 times a day, for 10 days. Each point represents the mean value of 6 animals per group (\pm SD).

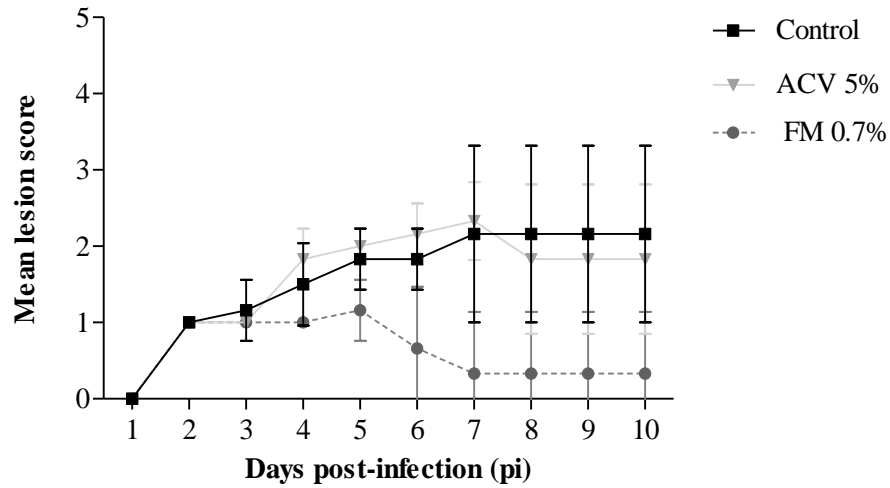


Fig. 7. The effect of the FM (0.7%; w/w) mangiferin formulation on skin lesions caused by HSV-1 AR-29 strain in male Balb/c mice. The animals were infected by skin scarification and topically treated either with FM or ACV (50 mg/g) 4 h after infection, 5 times a day, for 10 days. Each point represents the mean value of 6 animals per group (\pm SD).

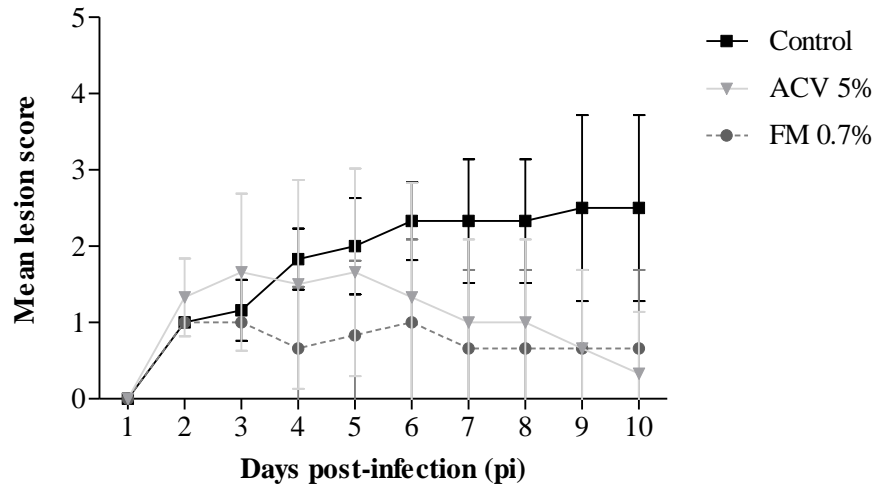


Fig. 8. The effect of the FM (0.7%; w/w) mangiferin formulation on skin lesions caused by HSV-1 KOS strain in female Balb/c mice. The animals were infected by skin scarification and topically treated either with FM or ACV (50 mg/g) 4 h after infection, 5 times a day, for 10 days. Each point represents the mean value of 6 animals per group (\pm SD).

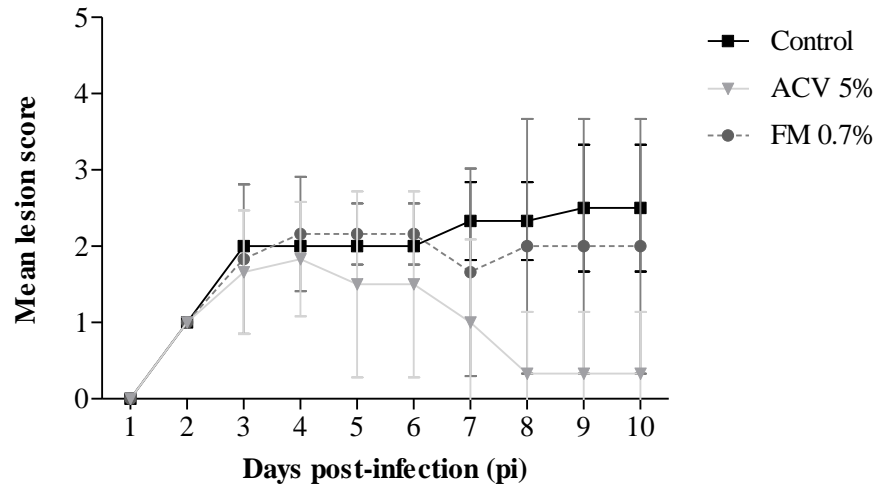
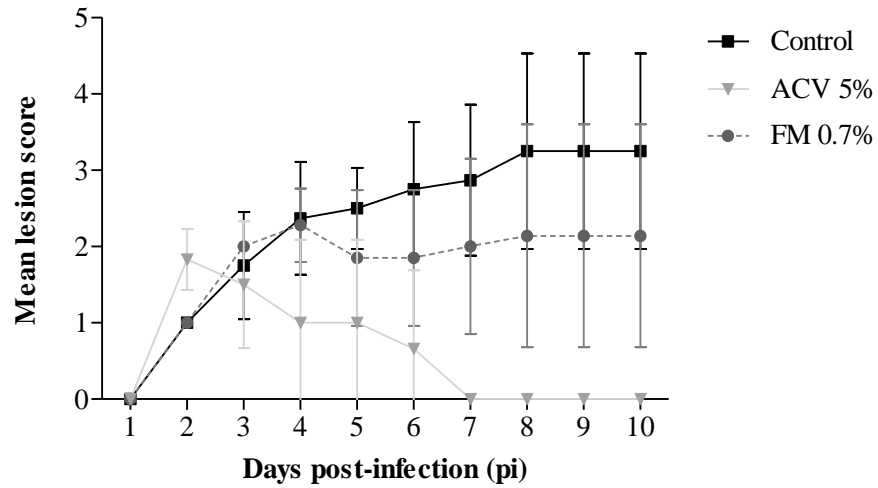


Fig. 9. The effect of the FM (0.7%; w/w) mangiferin formulation on skin lesions caused by HSV-1 KOS strain in male Balb/c mice. The animals were infected by skin scarification and topically treated either with FM or ACV (50 mg/g) 4 h after infection, 5 times a day, for 10 days. Each point represents the mean value of 6 animals per group (\pm SD).



4.1.1 PATENTE

RECHENCHOSKI, D. Z.; AGOSTINHO, K. F.; FACCIN-GLHARDI, L. C.; LONNI, A. A. S. G.; SILVA, J. V. H.; ANDRADE, F. G.; CUNHA, A. P.; RICARDO, N. M. P. S.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C.

Patente PI BR 10.2018.072702.8. Formulação tópica contendo mangiferina com atividade contra o vírus herpes simplex tipo 1, cepas sensível e resistente ao aciclovir e seu processo de produção, 2018.

Categoria: Produto. Instituição onde foi depositada: INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR102018072708. Número do depósito PCT: 2940916180508530. Data de depósito: 05/11/2018. Depositante/Titular: DANIELE ZENDRINI RECHENCHOSKI. Depositante/Titular: Universidade Estadual de Londrina. Resumo: **A presente invenção refere-se a uma formulação de um antiviral tópico para o auxílio no controle de infecções pelo vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1), cepas sensível e resistente ao aciclovir.** A formulação contém mangiferina, xantona glicosilada, que possui como fonte primária a mangueira (*Mangifera indica*). **Trata-se de uma formulação semissólida tópica que deverá ser aplicada cinco vezes por dia durante dez dias e utilizada por pacientes que necessitam de uma melhora dos sintomas da infecção pelo HSV-1.** A formulação contendo mangiferina apresentou maior ação contra a cepa resistente do HSV-1 ao aciclovir, sendo de grande interesse médico e farmacêutico. Finalmente, a invenção é importante para o controle de infecção por HSV-1, inclusive nos casos em que a cepa do vírus é resistente a outros medicamentos disponíveis no mercado. Portanto, pode interessar, preferencialmente, às indústrias farmacêuticas, visando a uma melhoria da área da saúde humana.

4.2 ARTIGO 2

Antitherpetic effect of topical formulations containing sulfated polysaccharide from *Adenantha pavonina*

Daniele Zendrini Rechenchoski^{a,b}, Karoline Fontana Agostinho^a, Ligia Carla Faccin-Galhardi^a, Audrey Alesandra Stinghen Garcia Lonni^b, Arcelina Pacheco Cunha^c, Nágila Maria Pontes Silva Ricardo^c, Carlos Nozawa^a, Rosa Elisa Carvalho Linhares^{a*}

^aDepartamentos de Microbiologia, ^bCiências Farmacêuticas - Universidade Estadual de Londrina, 86057-970, Londrina, Paraná, Brazil and ^cQuímica Orgânica e Inorgânica - Universidade Federal do Ceará, 60020-181, Fortaleza, Ceará, Brazil.

*Corresponding author

E-mail: relin@uel.br

Address: Departamento de Microbiologia/CCB/UEL

CEP: 86057-970, Londrina, PR, Brazil.

Highlights

- Sulfated polysaccharides have been reported as potent inhibitors of virus.
- We investigated the anti-HSV effect of SPAP.
- *In vitro*, high percentages of HSV inhibition were observed.
- *In vivo*, the groups treated with SPAP showed a milder evolution of the lesions.
- SPAP is a valuable candidate in antitherpetic therapy.

Abstract

Adenanthera pavonina is a native tree of Africa and Asia, introduced in Brazil for reforestation and wood industry. Several pharmacological activities have described scientifically, including antiviral activity. This study evaluated the antiviral effect of sulfated polysaccharide of *Adenanthera pavonina* (SPAp) against ACV-resistant (AR-29) and sensitive (KOS) herpes simplex virus strains. The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) and the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) were determined by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method and plaque reduction assay, respectively. The *in vivo* SPAp antiviral activity was performed in Balb/c mice infected by skin scarification and treated with topical 0.5% (w/w) SPAp formulations, 4 h after infection, 4 times a day, for 8 days. SPAp showed a CC₅₀ of 47.81 µg/mL and the IC₅₀ were 0.49 µg/mL (Selectivity index = 97.5) and 0.54 µg/mL (SI = 88.5) for the strains KOS and AR-29, respectively. Our results demonstrated that mice treated with SPAp presented a delay in the development and progression of skin lesions compared with the control group. Therefore, SPAp is a valuable candidate in antiherpetic therapy.

Keywords: *Adenanthera pavonina*, Antiviral, Herpes simplex, Polysaccharide.

1. Introduction

Herpes simplex virus (HSV) is a common human pathogen, causal agent of remarkable diseases in the public health. Acyclovir (ACV) is the drug of choice for the treatment, nevertheless, for several reasons, drug-resistant HSV strains has emerged. Therefore, a succedaneum drug has been pursued, preferentially with broad spectrum of action and, consequently, less prone to select resistant strains [1]. Polysaccharides from several origin present conspicuous biological activities which can be enhanced by chemical modifications, such as sulfation [2, 3]. *Adenanthera pavonina* (Ap) L (family *Fabaceae*, subfamily *Mimosoideae*), popularly known as red-bead tree, carolina, pigeon's eye and dragon's eye, is a native tree of Africa and Asia, introduced in Brazil for reforestation and wood industry [4]. In traditional medicine Ap has been used for diarrhea, fever, gout, rheumatism, ulcers and asthma [5-7]. Triterpenoids, flavonoids, steroids and saponins are the major secondary metabolites [8, 9]. Pharmacological properties have been reported, such as, anti-inflammatory, antioxidant, antidiabetic, antihypertensive, anticancer and antimicrobial

[10-15]. Herein, we aimed to investigate the *in vitro* and *in vivo* activity of sulfated polysaccharide of *Ap* against the HSV-1 infection.

2. Materials and Methods

2.1. Compound

Ap seeds were harvested at the Pici Campus, UFC, Fortaleza, Brazil, in November and December 2010, and polysaccharide (*PAP*) extracted from the endosperms with hot water (85 °C) [16]. The polysaccharide solution was filtered in 5- µm polyester membrane and lyophilized. The sulfation of *Ap* polysaccharide (*SPAP*) was accomplished as previously [17].

2.2. Cells and virus

Vero cells (AGMK epithelial cells, ATCC CCL-81) grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (*Invitrogen - Gibco, USA) were used throughout. The cultures were supplemented with 10% fetal bovine serum (*), 2 mM glutamine (**Sigma Chem. Co., USA) and treated with 100 µg/mL streptomycin (Gibco BRL, USA), 100 IU/mL penicillin (Novafarma Ind. Farm., BR) and 2.5 µg/mL of amphotericin B (Meizler Biopharma S/A, BR). The ACV-sensitive (KOS) and -resistant (AR-29) HSV-1 strains were kindly supplied by the LITDFC/DBS/UEM, BR. The virus stock titer was worked out by plaque assay and stored at -20 °C in glycerol.

2.3. Cytotoxicity assay

The *SPAP* cytotoxicity was determined by MTT assay, according to manufacturer's recommendations (**). Briefly, cultured Vero cells, in 96-well microplates (Nunc A/S, Denmark), were exposed to various concentrations of the compound (0.95 µg/mL to 2000 µg/mL) in triplicate. After 72 h, each dilution was added of 10 µL of MTT, incubated for 3 h, solubilized with 90 µL solubilizing solution and OD read at 570 and 690 nm. The percentage of cell viability (% CV) was calculated by the formula $\% CV = (At/Ac) \times 100$, where At and Ac refer to the OD of *SPAP* and control, respectively. The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) is the concentration of the *SPAP* capable to reduce MTT product OD by 50% by linear regression analysis [18].

2.4. *The in vitro antiviral activity*

The *in vitro* antiviral activity was performed as in Espada et al. [19] and briefly, cells were treated with varying concentrations of SPAp (0.18 - 3 µg/mL). Infection with KOS or AR-29 strain (10^5 PFU/mL) was performed simultaneously to treatment (time 0 h). After 72 h incubation cells were fixed with 20% formaldehyde in PBS and stained with 0.5% crystal violet in 20% ethanol. The viral inhibition was calculated by: % VI = $[1 - (\text{PFU in treated cells} / \text{PFU in virus control})] \times 100$ [20]. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) is the concentration of the compound capable to reduce PFU in 50%, by linear regression. The selectivity index (SI) is the ratio of CC₅₀/IC₅₀.

2.5. *Formulations*

O/W emulsion was prepared by the phase-inversion method as in Ribeiro [21], using cetearyl alcohol, cetareth-20, glyceryl stearate, mineral oil and caprylic/capric triglycerides, dispersed in the oil phase and glycerin and methylparaben, dispersed in distilled water until complete 100 mL. The oil and aqueous phases were heated separately to 75 ± 2 °C. The oil phase was slowly added to the aqueous phase with stirring until 40 °C, forming the base cream and 0.5% (w/w) SPAp dispersed in propylene glycol was added to the emulsion at 25 °C.

The gel was prepared using glycerin and methylparaben in distilled water until 100 mL and heating at 75 °C. Under stirring, hydroxyethylcellulose was sprayed until the formation of gel. When the temperature reached 40 °C, cyclomethicone was added, forming the base gel. Finally, 0.5% (w/w) SPAp dispersed in propylene glycol was added to the formulation.

Commercially available ACV cream (50 mg/g - Medley Pharm. Ltd, BR) was used as positive control.

2.6. *The in vivo antiviral activity*

Male Balb/c mice (5 weeks old; weight 22–27 g; n = 6 per group) were supplied by UEM and the experiment was approved by the UEL Animal Ethics Committee (CEUA n° 24414.2015.49). The animals were randomly separated into nine groups I to IX. The right mid flank was depilated, under anesthesia, and one day later, the skin was scarified with sterile needle and 50 µL of HSV-1 (KOS or AR-29 strain - at 10^5 PFU/mL) were applied. The mice were submitted to procedures according to the group, as follows: (I) animals scarified, not infected and not treated; (II) animals not scarified, not infected and treated with base gel; (III)

animals not scarified, not infected and treated with base cream; (IV) control group – mice scarified, infected and not treated; (V) animals scarified, infected and treated with base gel; (VI) animals scarified, infected and treated with base cream; (VII) animals scarified, infected and treated with 0.5% (w/w) SPAp gel; (VIII) animals scarified, infected and treated with 0.5% (w/w) SPAp cream; (IX) animals scarified, infected and treated with ACV. Formulations containing SPAp or ACV were administered topically 4 h after infection, 4 times a day for 8 successive days, except at night. The skin lesions were daily scored, as follows: 0 - no lesion; 1 - vesicles in local region; 2 - erosion and/or ulceration locally; 3 - mild zosteriform lesion; 4 - moderate zosteriform lesion; 5 - severe zosteriform lesion and 6 – death [22-24].

2.7. Statistical analysis

Anova followed by Tukey's test were applied to determine the difference among experiments with the SPAp and control group. Values of $p < 0.05$ were considered significant. GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software Inc., CA, USA) was used throughout.

3. Results

SPAp showed a CC_{50} of 47.81 $\mu\text{g/mL}$ and the *in vitro* SPAp antiviral activity for KOS and AR-29 strains is shown in Fig. 1. In the treatment simultaneously with infection (time 0 h), with SPAp at concentrations of 3, 1.5 and 0.75 $\mu\text{g/mL}$, it is shown the percentages of viral inhibition (%VI) of 100%, 88.7% and 70% respectively, for the KOS strain. Similar values were found for AR-29 strain, at the same concentrations, with %VI of 97.8%, 85.7% and 50.7%, respectively. The IC_{50} were 0.49 $\mu\text{g/mL}$ (SI = 97.5) and 0.54 $\mu\text{g/mL}$ (SI = 88.5) for the strains KOS and AR-29, respectively.

Regarding the *in vivo* SPAp activity, mice infected with the KOS strain treated with 0.5% (w/w) SPAp gel or cream followed an evolution similar to that of the control group until day 3 post-infection (pi). However, on day 4 pi, in the control group all animals showed ulcerated skin and some developed a mild zosteriform lesion. While most of the animals treated with the cream had only vesicles and for those treated with gel half had only vesicles and half had skin ulcerated, but without zosteriform lesions. On day 8 pi, there was a predominance of moderate to severe zosteriform lesions in the control group. The groups treated with 0.5% (w/w) SPAp gel or cream showed a milder evolution of the lesions. Comparatively, mice treated with ACV had a milder evolution of the lesions, because on day 7 pi all animals showed retrieved skin (Fig. 2).

Concerning mice infected with the strain AR-29, controls and groups treated with 0.5% (w/w) SPAP gel or cream presented only vesicles on day 2 pi. On day 3 pi, all mice treated with the gel had ulcers, as well as, those of the control group, however, some animals treated with the cream still had vesicles. On day 8 pi, most of the mice in the control group had moderate to severe zosteriform lesions, with one death. While for the group treated with the gel, most of the lesions were mild zosteriform and most of the mice treated with the cream still had only focal ulceration (Fig. 3).

4. Discussion

Sulfated polysaccharides have been reported as potent inhibitors of virus. They present a high density of negative charge, mimicking the cell receptor heparan sulfate (HS). Therefore, able to interact with the positively charged viral glycoproteins, blocking attachment of virus to cell [2].

Fucoidans derived from marine brown alga *Padina tetrastromatica* exhibited potent antiherpetic activity, inhibiting the virus adsorption to the cell [25]. In the study of Wang et al. [26] a fucoidan, isolated from brown algae *Kjellmaniella crassifolia*, showed *in vitro* activity against influenza A virus. Moreover, the intranasal therapy with fucoidan in infected mice improved their survival and significantly decreased the pulmonary virus titers. Tsubara et al. [27] observed that recurrent oral herpes labialis in two patients was successfully treated with power fucoidan cream, improving the time to healing and time to loss of discomfort.

However, the biological properties of sulfated polysaccharides are also associated to structural characteristics, such as sulfation degree, molecular weight and specific positioning of the sulfate groups [2]. Sulfated xylogalactofucan and alginic acid, extracted from a marine alga *Laminaria angustata*, potently inhibited the infectivity of HSV and the content of sulfate groups enhances the inhibition [28]. Cooper et al. [29] reported that the ingestion of a preparation of *Undaria pinnatifida*, enriched in sulfated polyanions, such as galactofucan, has inhibitory effects on reactivation of HSV and increased healing rates in patients with active infections. Lopes et al. [30] evaluated the antiherpetic activity of seven polysaccharides from green algae *Enteromorpha compressa*. They demonstrated that the antiviral activity of ulvan significantly increased after chemical derivatization. Corroborating with these results, Tang et al. [31] also demonstrated that sulfated depolymerized carageenans were more effective

against influenza A virus than native carrageenan, proposing that the antiviral activity of carrageenan could be potentiated by its sulfate content and molecular weight.

Yamamoto et al. [32] evaluated a polysaccharide obtained from *Agaricus brasiliensis* and its derivatives sulfated and carboxymethylated, among which only the sulfated form demonstrated stronger inhibition for both HSV-1 and BoHV-1 replication, when the cells were treated simultaneously to infection. Moreover, in this study, they also observed that of three polysaccharide fractions, the one that had more β -glucan, demonstrated greater antiviral effect. Similar findings were described by Cardozo et al. [33], since they reported that the glucomannan polysaccharide, isolated from the mycelium of same basidiomycete and sulfated chemically, presented a promising inhibitory activity against HSV-1, with selectivity indexes higher than 439 and 208, for KOS and AR-29 strains, respectively. Posteriorly, the *in vivo* potential of glucomannan was demonstrated for the oral treatment of cutaneous herpes. However, its topical application on skin lesions was also not effective [34].

Sulfated galactomannans from plants of Caatinga biome, including *Adenantha pavonina*, may act early step of dengue virus 2, according to Marques et al. [35]. Previous studies also investigated the antiviral activity of same *A. pavonina* polysaccharide and its sulfated derivative against poliovirus and HSV-1 [18, 36]. The SPAP, in the study of Godoi et al. [36] showed antiviral effect almost 50 times higher than that native. They also found a CC_{50} for SPAP of 500 $\mu\text{g/mL}$, differing of the value found in our study (47.81 $\mu\text{g/mL}$), justifiable difference, since the cell lines used were different, HEp-2 cells in the first and Vero in the second. Regarding the IC_{50} , they found a value of 15 $\mu\text{g/mL}$, but the virus used was isolated from a clinical sample, already in our work we used standard strains sensitive or resistant to ACV. The previous study by Godoi et al. [36] was important to detect the promising *in vitro* antiviral activity of this polysaccharide, that demonstrated maximum HSV-1 inhibition between the times 8 and 16 h, period approximately coincident with the expression of early and late genes genes.

Based on the study of Melo et al. [37] that a galactomannan extracted from *A. pavonina* presented favorable properties for its use in pharmaceutical formulations, and knowing the *in vitro* mechanism of action of SPAP, we decided to incorporate it into formulations and test it *in vivo* assays.

In summary, our results demonstrated that male mice treated with SPAP presented a delay in the development and progression of skin lesions compared with the control group, demonstrating that it is a valuable candidate in antiherpetic therapy.

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors thank to CAPES (finance code 001), CNPq, Fundação Araucaria and UEL for financial support.

References

- [1] S.T. Hassan, R. Masarčíková, K. Berchová, Bioactive natural products with anti-herpes simplex virus properties, *J. Pharm. Pharmacol.* 67 (2015) 1325-1336. <https://doi.org/10.1111/jphp.12436>.
- [2] T. Ghosh, K. Chattopadhyay, M. Marschall, P. Karmakar, P. Mandal, B. Ray, Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: from structure–activity analysis to clinical evaluation, *Glycobiology*. 19 (2008) 2-15. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn092>.
- [3] L. Chen, G. Huang, The antiviral activity of polysaccharides and their derivatives, *Int. J. Biol. Macromol.* 115 (2018) 77-82. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.056>.
- [4] A.P.D.C. Rodrigues, A.K.M. Oliveira, V.A. Laura, C.R. Yamamoto, K.S. Chermouth, M.H. Freitas, Tratamentos para superação da dormência de sementes de *Adenanthera pavonina* L, *Rev. Árvore*, 33 (2009) 617-623. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622009000400004>.
- [5] K. R. Kirtikar, B. D. Basu, Indian medicinal plants, first ed., Bishen Singh Mahendra Pal Singh, Dehradun, 1918.
- [6] J.M. Watt, M.G. Breyer-Brandwijk, The medicinal and poisonous plants of Southern and Eastern Africa being an account of their medicinal and other uses, chemical composition, pharmacological effects and toxicology in man and animal, second ed., E. & S. Livingstone Ltd, Edinburgh, 1962.

- [7] H.M. Burkill, The useful plants of west tropical Africa, second ed., Royal Botanic Gardens, Kew, 1994.
- [8] E.N. Su, S.S. Yu, Y.H. Pei, Studies on chemical constituents from stems and leaves of *Adenanthera pavonina*, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 32 (2007) 2135-2138.
- [9] K.V. Kothale, S.P. Rothe, Phytochemical screening of *Adenanthera pavonina* Linn, *World J. Sci. Tech.* 2 (2012) 19-22.
- [10] A.D.A. Adedapo, Y.O. Osude, A.A. Adedapo, J.O. Moody, A.S. Adeagbo, O.A. Olajide, J.M. Makinde, Blood pressure lowering effect of *Adenanthera pavonina* seed extract on normotensive rats, *Rec. Nat. Prod.* 3 (2009) 82-89.
- [11] S. Jayakumari, V. Ravichandiran, M. Velraj, A.K. Singh, A.V. Lakshmi, Anti-inflammatory activity of *Adenanthera pavonina* Linn. Leaves, *J. Nat. Remedies*, 12 (2012) 56-62. <https://doi.org/10.18311/jnr/2012/37>.
- [12] R. Pandhare, B. Sangameswaran, Extract of *Adenanthera pavonina* L. seed reduces development of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats, *Avicenna J. Phytomed.* 2 (2012) 233-242.
- [13] M. Mujahid, Phytochemical analysis and evaluation of scavenging activity of methanolic extract of *Adenanthera pavonina* Linn leaves, *J. Drug Deliv. Ther.* 5 (2015) 55-61. <https://doi.org/10.22270/jddt.v5i3.1147>.
- [14] R. Chauhan, H.L. D'Souza, R.S. Shabnam, J. Abraham, Phytochemical and cytotoxicity analysis of seeds and leaves of *Adenanthera pavonina*, *Research J. Pharm. and Tech.* 8 (2015) 198-203. <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2015.00036.0>.
- [15] O.A. Adeyemi, A.D. Adedapo, A.A. Adedapo, J.O. Moody, Evaluation of the antimicrobial activity of crude extracts and chromatographic fractions of *Adenanthera pavonina* Linn (*Leguminosae*) seeds, *Afr. J. Biotechnol.* 14 (2015) 1067-1073. <https://doi.org/10.5897/AJB2015.14437>.

- [16] I.G.P. Vieira, F.N.D. Mendes, M.I. Gallao, E.S. Brito, NMR study of galactomannans from the seeds of mesquite tree (*Prosopis juliflora* (Sw) DC), Food Chem. 101 (2007) 70-73. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.052>.
- [17] A.N. O'Neill, Sulphated derivatives of laminarin, Can. J. Chem. 33 (1995) 1097-1101. <https://doi.org/10.1139/v55-127>.
- [18] A.M. Godoi, L.C. Faccin-Galhardi, N. Lopes, D.Z. Rechenchoski, R.R. Almeida, N.M. P.S. Ricardo, C. Nozawa, R.E.C. Linhares, Antiviral activity of sulfated polysaccharide of *Adenantha pavonina* against poliovirus in HEp-2 cells, Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2014 (2014) 1-6. <https://doi.org/10.1155/2014/712634>.
- [19] S.F. Espada, L.C. Faccin-Galhardi, V.P. Rincão, A.L.S. Bernardi, N. Lopes, R. Longhini, J.C.P. Mello, R.E.C. Linhares, C. Nozawa, Antiviral activity of *Trichilia catigua* bark extracts for herpesvirus and poliovirus, Curr. Pharm. Biotechnol. 16 (2015) 724-732. <https://doi.org/10.2174/1389201016666150505125235>.
- [20] T. Nishimura, H. Toku, H. Fukuyasu. Antiviral compounds. XII Antiviral activity of amidinohydrazone of alkoxyphenyl-substituted carbonyl compounds against influenza virus in eggs and in mice, Kitasato Arch. Exp. Med. 50 (1977) 39-46.
- [21] C. Ribeiro, Cosmetologia aplicada à dermoestética, 2 ed., Pharmabooks, São Paulo, 2010.
- [22] M. Kurokawa, K. Nagasaka, T. Hirabayashi, S. Uyama, H. Sato, T. Kageyama, S. Kadota, H. Ohyama, T. Hozumi, T. Namba, K. Shiraki, Efficacy of traditional herbal medicines in combination with acyclovir against herpes simplex virus type 1 infection *in vitro* and *in vivo*, Antivir. Res. 27 (1995) 19-37. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(94\)00076-K](https://doi.org/10.1016/0166-3542(94)00076-K).
- [23] V. Lipipun, M. Kurokawa, R. Suttisri, P. Taweechoatipatr, P. Pramyothin, M. Hattori, K. Shiraki, Efficacy of Thai medicinal plant extracts against herpes simplex virus type 1 infection *in vitro* and *in vivo*, Antivir. Res. 60 (2003) 175-180. [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(03\)00152-9](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(03)00152-9).

- [24] T. Chuanasa, J. Phromjai, V. Lipipun, K. Likhitwitayawuid, M. Suzuki, P. Pramyothin, M. Hattori, K. Shiraki, Anti-herpes simplex virus (HSV-1) activity of oxyresveratrol derived from Thai medicinal plant: mechanism of action and therapeutic efficacy on cutaneous HSV-1 infection in mice, *Antivir. Res.* 80 (2008) 62-70.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.05.002>.
- [25] P. Karmakar, C.A. Pujol, E.B. Damonte, T. Ghosh, B. Ray, Polysaccharides from *Padina tetrastromatica*: Structural features, chemical modification and antiviral activity, *Carbohydr. Polym.* 80 (2010) 513-520. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.12.014>.
- [26] W. Wang, J. Wu, X. Zhang, C. Hao, X. Zhao, G. Jiao, X. Shan, W. Tai, G. Yu, Inhibition of influenza a virus infection by fucoidan targeting viral neuraminidase and cellular EGFR pathway, *Sci. Rep.* 7 (2017) 40760. <https://doi.org/10.1038/srep40760>.
- [27] S. Tsubura, A. Suzuki, Case report using 4% fucoidan cream for recurrent oral herpes labialis: Patient symptoms markedly improved in terms of time to healing and time to loss of discomfort, *Dent. Open J.* 4 (2017) 19-23. <https://doi.org/10.17140/DOJ-5-135>.
- [28] S. Saha, M.H. Navid, S.S. Bandyopadhyay, P. Schnitzler, B. Ray, Sulfated polysaccharides from *Laminaria angustata*: structural features and *in vitro* antiviral activities, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 123-130.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.026>.
- [29] R. Cooper, C. Dragar, K. Elliot, J.H. Fitton, J. Godwin, K. Thompson, GFS, a preparation of Tasmanian *Undaria pinnatifida* is associated with healing and inhibition of reactivation of herpes, *BMC Complement. Altern. Med.* 2 (2002) 11.
<https://doi.org/10.1186/1472-6882-2-11>.
- [30] N. Lopes, S. Ray, S.F. Espada, W.A. Bomfim, B. Ray, L.C. Faccin-Galhardi, R.E.C. Linhares, C. Nozawa, Green seaweed *Enteromorpha compressa* (*Chlorophyta, Ulvaceae*) derived sulphated polysaccharides inhibit herpes simplex virus, *Int. J. Biol. Macromol.* 102 (2017) 605-612. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.043>.

- [31] F. Tang, F. Chen, F. Li, Preparation and potential *in vivo* anti-influenza virus activity of low molecular-weight κ -carrageenans and their derivatives, *J. Appl. Polym. Sci.* 127 (2013) 2110-2115. <https://doi.org/10.1002/app.37502>.
- [32] K.A. Yamamoto, L.C.F. Galhardi, V.P. Rincão, S.A. Soares, Í.G.P. Vieira, N.M.P.S. Ricardo, C. Nozawa, R.E.C. Linhares, Antiherpetic activity of an *Agaricus brasiliensis* polysaccharide, its sulfated derivative and fractions, *Int. J. Biol. Macromol.* 52 (2013) 9-13. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.09.029>.
- [33] F.T.G.S. Cardozo, C. M. Camelini, A. Mascarello, M.J. Rossi, R.J. Nunes, C.R.M. Barardi, M.M. Mendonça, C.M.O. Simões, Antiherpetic activity of a sulfated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* mycelia, *Antiviral Res.* 92 (2011) 108-114. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.07.009>.
- [34] F.T.G.S. Cardozo, I.V. Larsen, E.V. Carballo, G. Jose, R.A. Stern, R.C. Brummel, C. M. Camelini, M.J. Rossi, C.M. Simões, C.R. Brandt, *In vivo* anti-HSV activity of a sulfated derivative of *Agaricus brasiliensis* mycelial polysaccharide, *Antimicrob. Agents Chemother.* 57 (2013) 2541-2549. <https://doi.org/10.1128/AAC.02250-12>.
- [35] M.M.M. Marques, S.M.D. Morais, A.R.A. Silva, N.D. Barroso, T.R.P. Filho, F.M.C. Araújo, Í.G.P. Vieira, D.M. Lima, M.I.F. Guedes, Antiviral and antioxidant activities of sulfated galactomannans from plants of Caatinga biome, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2015 (2015) 1-8. <https://doi.org/10.1155/2015/591214>.
- [36] A.M. Godoi, L.C. Faccin-Galhardi, N. Lopes, C. Nozawa, R.R. Almeida, N.M.P.S. Ricardo, R.E.C. Linhares, Characterization and antiherpetic activity of native and chemically sulfated polysaccharide from *Adenanthera pavonina*, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 16 (2015) 1024-101. <https://doi.org/10.2174/1389201016666150731111013>.
- [37] R.C. Melo, M.S. Geronço, R.W.R. Sousa, L.P.S. Ramos, F.P. Araújo, A.B. Ribeiro, P. M.P. Ferreira, J.A. Osajima, M.P. Costa, Biopolymer from *Adenanthera pavonina* L. seeds: characterization, photostability, antioxidant activity, and biotoxicity evaluation, *Int. J. Polym. Sci.* 2018 (2018) 1-7. <https://doi.org/10.1155/2018/1385830>.

Fig. 1 The effect of the SPAp in the replication of HSV-1 strains KOS and AR-29 when added concomitantly to viral infection (time 0 h), in Vero cells by plaque reduction assay. The percentage of viral inhibition is expressed as the mean \pm SD of triplicate independent experiments.

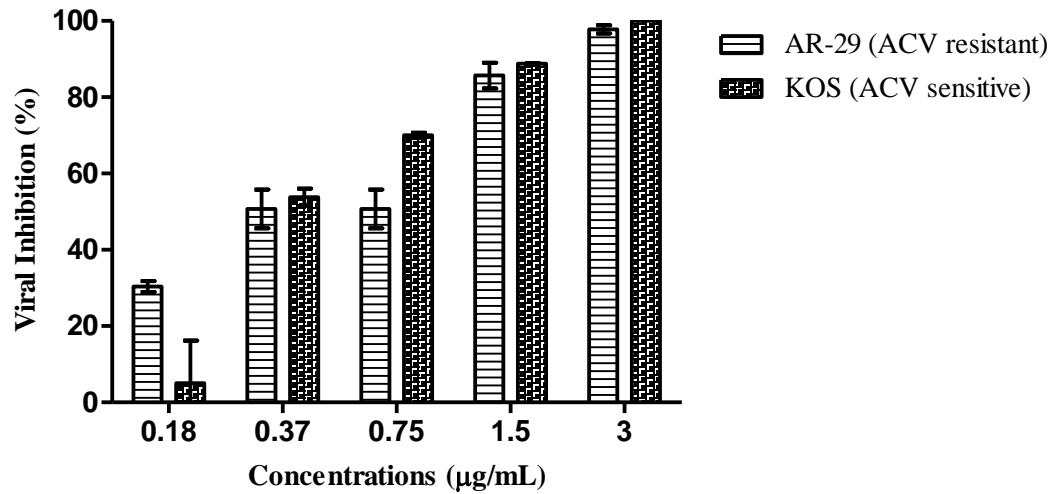


Fig. 2. The effect of 0.5% (w/w) SPAp gel and cream on skin lesions caused by HSV-1 KOS strain in Balb/c mice. The animals were infected by skin scarification and topically treated, 4 h after infection, 4 times a day, for 8 days. Each point represents the mean score values of 6 animals per group (\pm SD).

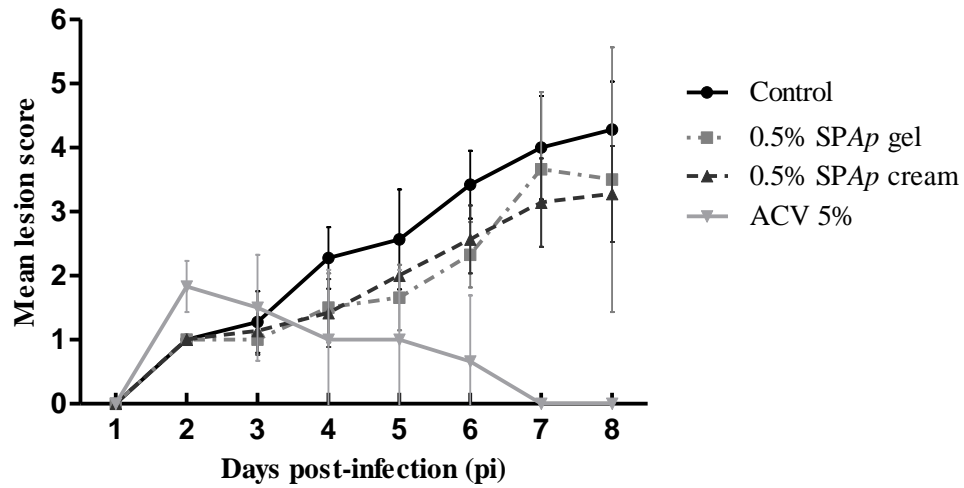
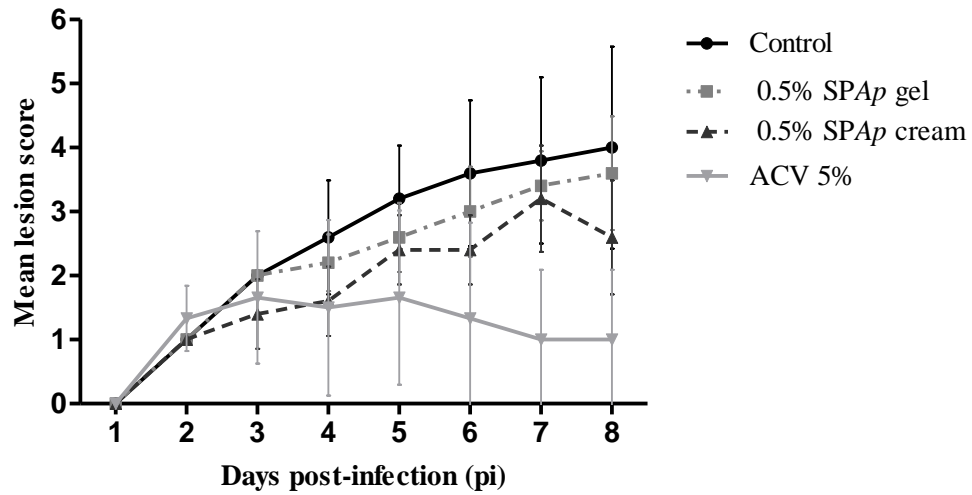


Fig. 3. The effect of 0.5% (w/w) of SPAp gel and cream on skin lesions caused by HSV-1 AR-29 strain in Balb/c mice. The animals were infected by skin scarification and topically treated, 4 h after infection, 4 times a day, for 8 days. Each point represents the mean value of 6 animals per group (\pm SD).



5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, investigamos a atividade anti-herpética de dois compostos originados de plantas, a mangiferina, proveniente de resíduos das cascas, caule e folhas da mangueira (*Mangifera indica*) e o polissacarídeo do endosperma da semente de *Adenantha pavonina*, quimicamente sulfatado. O cenário atual, caracterizado pela emergência de cepas de HSV resistentes ao ACV é o que nos impulsiona a buscar novas opções de tratamento.

Estas substâncias não apresentaram toxicidade elevada em células Vero e demonstraram atividade antiviral em baixas concentrações, gerando ótimos índices de seletividade, o que possibilitaria um tratamento seguro e efetivo.

Diante desta atividade antiviral, *in vitro*, promissora, foram desenvolvidas formulações tópicas contendo esses dois ativos para serem testadas, *in vivo*. Ambas as formulações quando aplicadas nos animais atrasaram o desenvolvimento e a progressão das lesões de pele em comparação ao grupo controle. Ênfase deve ser dada a formulação contendo mangiferina, que inibiu de forma significativa a cepa resistente ao aciclovir, demonstrando a sua potencialidade no controle destas infecções (número do registro da patente: BR102018072708). Estudos mais aprofundados poderiam ser executados com o intuito de utilizar essas substâncias como opções terapêuticas ou de controle das infecções por HSV.