



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

AMANDA BORTOLUCI DA SILVA OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTIVIRAL E MODO DE AÇÃO DE UM  
PEPTÍDEO 6 KDA ISOLADO DE *HELIANTHUS ANNUS* L E  
SINERGISMO COM ACICLOVIR**

---

Londrina  
2009

AMANDA BORTOLUCI DA SILVA OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTIVIRAL E MODO DE AÇÃO DE UM  
PEPTÍDEO 6 KDA ISOLADO DE *HELIANTHUS ANNUS L* E  
SINERGISMO COM ACICLOVIR**

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

Orientador:  
Prof. Dr. Benedito Prado Dias Filho

Londrina  
2009

AMANDA BORTOLUCI DA SILVA OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTIVIRAL E MODO DE AÇÃO DE UM PEPTÍDEO 6  
KDA ISOLADO DE *HELIANTHUS ANNUS L* E SINERGISMO COM  
ACICLOVIR**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Benedito Prado Dias Filho**  
Universidade Estadual de Londrina

---

**Prof. Dra. Tânia Ueda-Nakamura**  
Universidade Estadual de Maringá

---

**Prof. Dra. Sueli Fumie Yamada-Ogatta**  
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 28 de maio de 2009.

Dedico este trabalho aos meus pais, Ademir e Cristina, que sempre souberam ensinar o verdadeiro valor do conhecimento, que sempre me incentivaram a nunca desistir diante das dificuldades e a buscar meus sonhos, por mais impossível que eles parecessem, pois se estou concluindo mais esta etapa de minha vida são graças aos seus incentivos, conselhos, doações e dedicações.

Dedico também à minha irmã Paula; e a meus eternos amores André e Leonardo pelo apoio e amor incondicionais.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado o dom da coragem e da força nos momentos em que nada dava certo, para que eu nunca desistisse; sabedoria e inteligência para que eu pudesse compreender os resultados malucos que as vezes surgiram.

Ao meu marido André e ao meu filho Leonardo pelo carinho e por terem se privado da minha presença sem nada cobrar.

Aos meus pais Ademir e Cristina, e a minha irmã Paula pelo amor e incentivo.

Ao Prof. Dr. Benedito Prado Dias Filho, pela orientação, pelo aprendizado e incentivo na busca da excelência. Obrigado por ter apostado em mim quando eu ainda estava cursando o primeiro ano de faculdade. Quanto tempo !

Ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura pela contribuição a este trabalho.

À Prof. Dra. Tânia Ueda-Nakamura, pela contribuição e orientação nos projetos realizados, sempre corrigindo meus resumos, painéis, etc; e pelo convívio diário.

À Prof. Maria de Lourdes pelo empréstimo da coluna C-18.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, pelos ensinamentos e coleguismos.

As técnicas do laboratório de microbiologia básica Adriana Barravieira, Maria Manzoti, Marinete Martinez, Rosana Monteiro, Zelita Rodrigues e não poderia me esquecer da Dona Prisciliana, a primeira pessoa que me ensinou autoclavar materiais no laboratório! Obrigada pela paciência de vocês em me atender todos os dias nesses últimos 7,5 anos em que convivemos juntas!

Aos colegas e amigos do laboratório; não irei mencionar nomes, pois correrei o grande risco de esquecer de alguém, pois muitas pessoas importantes passaram pela sala 123. Obrigada pelo companheirismo, amizade, ajuda nos experimentos e pelos momentos de descontração que passamos juntos.

Aos colegas do mestrado, pela convivência, pelas conversas, pela companhia nos almoços no RU e nos pastéis no final da tarde.

À CAPES pela concessão da bolsa e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho

Muito Obrigada !

OLIVEIRA, Amanda Bortoluci da Silva. **Atividade antiviral e modo de ação de um peptídeo 6 kDa isolado de *Helianthus annuus* L e sinergismo com aciclovir**. 2009. 50f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2009.

## RESUMO

HSV-1 está geralmente associado a infecções faciais, oftálmicas e genitais. Sua grande característica está em causar uma lesão primária, auto-limitante em pacientes imunocompetentes, que é capaz de reativar por toda a vida do paciente. Eventualmente, pode estar associado a lesões graves no sistema nervoso central, como encefalites necrosantes agudas e meningites, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Muitos tratamentos são baseados no uso de aciclovir e em outros análogos de nucleosídeos, mas eles são tóxicos e alguns pacientes com lesões recorrentes podem albergar cepas resistentes. No presente estudo foi isolado um peptídeo anti-HSV-1 das sementes de girassol (*Helianthus annuus*) utilizando técnicas cromatográficas. A caracterização parcial do peptídeo revelou que ele apresenta aproximadamente 6 kDa e que possivelmente seja aniônico. A atividade antiviral contra HSV-1 foi investigada através de vários experimentos, entre eles estão a determinação do modo de ação, pela adição do peptídeo em várias etapas do ciclo replicativo do HSV-1; pelo ensaio de penetração e pelo sinergismo utilizando aciclovir. O peptídeo mostrou-se altamente eficiente ao impedir as etapas iniciais do ciclo replicativo, a adsorção e penetração, o que pode ser comprovado pelos valores de  $IC_{50}$ , 5,3  $\mu\text{g/ml}$  quando o peptídeo foi adicionado antes da infecção por HSV-1 e 4,5  $\mu\text{g/ml}$  quando adicionado durante a infecção por HSV-1. Atividade virucida moderada foi observada quando o peptídeo foi incubado com o HSV-1 por 1 h a 37 °C antes da infecção ( $IC_{50}$  igual a 78,6  $\mu\text{g/ml}$ ), enquanto que o peptídeo se mostrou inativo depois que a infecção viral estivesse estabelecida. 5  $\mu\text{g/ml}$  do peptídeo impediu 86 % da penetração viral durante os primeiros 20 minutos de incubação. Através do isoblograma, pode-se verificar que o peptídeo apresentou sinergismo quando associado ao aciclovir, com índice de concentração fracional inibitória (FICI) de 0,375.

**Palavras-chave:** HSV-1. *Helianthus annuus*. Técnicas cromatográficas. Peptídeo antiviral.

OLIVEIRA, Amanda Bortoluci da Silva. **Atividade antiviral e modo de ação de um peptídeo 6 kda isolado de *helianthus annus* 1 e sinergismo com aciclovir**. 2009. 50f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2009.

### ABSTRACT

HSV-1 is generally associated with primary and recurrent mucocutaneous facial, ophthalmic or genital lesions, but under certain conditions, can produce serious infections of the central nervous system, causing acute necrotizing encephalitis and meningitis in patients with immunodeficiencies. Most of the treatments for HSV-1 are based on acyclovir (ACV) and ACV-like nucleosides analogues, but they are toxic and some immunocompromised patients with recurrent HSV lesions develop resistance to ACV. In this study was isolated an anti-HSV-1 peptide of sunflower seeds (*Helianthus annuus*) by chromatographic techniques. The partial characterization revealed that it presents 6 kDa approximately and possibly is anionic. The activity antiviral against HSV-1 was investigated through several experiments, among them they are the determination in the action way, for the addition of peptide in several stages of the HSV-1 replication cycle; by penetration assay and synergism using acyclovir. The peptide was shown highly efficient in blocking the initial stages of the replication cycle, the adsorption and penetration, this can be proven for the values of  $IC_{50}$ , 5.3  $\mu\text{g/ml}$  when the peptide was added before the infection by HSV-1 and 4.5  $\mu\text{g/ml}$  when added during the infection by HSV-1. Activity moderate virucidal was observed when the peptide was incubated with HSV-1 by 1 h to 37 °C before the infection ( $IC_{50}$  equal to 78.6  $\mu\text{g/ml}$ ), while the peptide was shown inactive after the infection viral was established. 5  $\mu\text{g/ml}$  of the peptide was impeded 86 % of the penetration viral from first 20 minutes of incubation. Through the isobologram, it can be verified that the peptide was presented synergism when associate to acyclovir.

Keywords: HSV-1. *Helianthus annuus*. Chromatographic techniques. Antiviral peptide.

## SUMÁRIO

<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	08
Família <i>Herpesviridae</i> .....	08
Herpes simplex tipo 1.....	08
Infecções herpéticas .....	09
Antivirais sintéticos.....	13
Combinações de antivirais.....	16
Plantas como agentes antimicrobianos.....	17
Proteínas e peptídeos antivirais.....	19
<i>Helianthus annuus</i> .....	21
<b>OBJETIVOS</b> .....	22
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	23
<b>ANEXO</b> - Anti-HSV-1 activity and mode of action of a 6 kD peptide isolated from <i>Helianthus annuus</i> and its synergism with acyclovir.....	30

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### Família *Herpesviridae*

Os membros da família *Herpesviridae* apresentam um cerne contendo uma fita dupla linear de DNA, um capsídeo icosaédrico de aproximadamente 100 a 110 nm de diâmetro formado por 162 capsômeros, sendo 150 hexaméricos e 12 pentaméricos. O capsômero é envolvido por um material amorfo constituído de proteína, designado de tegumento, e um envelope lipídico contendo espículas de glicoproteínas na superfície (FIELDS, 2001; SCHLEISS, 2009).

Os vírus herpéticos são altamente disseminados na natureza. Aproximadamente 100 vírus da família *Herpesviridae* foram caracterizados, sendo que existem nove vírus herpéticos humanos. Além disso, o vírus herpético B de macacos também pode infectar o homem causando encefalite mortal (DA SILVA, 2000; ROIZMAN et al., 2001).

Os herpesvírus humano (HVH) são divididos em três subfamílias:  $\alpha$ -*herpesvirinae* que compreende Herpes simplex tipo 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) e Varicella-Zoster (VZV);  $\beta$ -*herpesvirinae* que compreende citomegalovírus (CMV) e Herpes simplex tipo 6 e 7 (HHV-6A, HHV-6B e HHV-7); e  $\gamma$ -*herpesvirinae* que compreende o vírus Epstein-Barr e Herpes simplex tipo 8 (HHV-8) (FIELDS, 2001; GILBERTI et al., 2002; SANTOS et al., 2009).

### Herpes simplex tipo 1

Os vírus Herpes simplex foram os primeiros dos vírus humanos da família *Herpesviridae* a serem descobertos e são os mais estudados. Seus atrativos estão nas suas propriedades biológicas, particularmente na habilidade em causar uma variedade de infecções e permanecerem latente por toda vida do hospedeiro com possíveis reativações perto ou longe do local da infecção inicial (FIELDS, 2001; SAUERBREI; WUTZLER, 2007).

O Herpes simplex tipo 1 (HSV-1) apresenta algumas propriedades biológicas como crescimento rápido, lise das células infectadas e estabelecimento de infecções latentes em gânglios nervosos sensoriais. Durante a latência é capaz de codificar as principais enzimas necessárias à replicação do DNA viral, mantendo um grau de virulência

suficiente para não ser subjugado pelos mecanismos de defesa do hospedeiro (WHITE; FENNER 1994; ROIZMAN et al, 2001).

Estruturalmente, O HSV é composto de quatro componentes distintos: o cerne contendo DNA linear de fita dupla, com aproximadamente 152 kb. O genoma é dividido em dois segmentos ligados covalentemente, denominados longo (L) e curto (S), ambos contendo seqüências únicas, que são flanqueadas por regiões de seqüências repetitivas invertidas. Seu genoma é um dos maiores genomas virais dos vírus herpéticos humanos, codificando aproximadamente 84 proteínas (WHITE; FENNER 1994; BOEHMER; LEHMAN, 1997; SUBAK-SHARPE; DARGAN, 1998; WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

O capsídeo icosaédrico; o tegumento; e o envelope lipoprotéico de 120 a 200 nm de diâmetro revestido por até 11 tipos de glicoproteínas virais e diversas proteínas não glicosiladas, lipídios e poliaminas (WHITE; FENNER, 1994; WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

Os dois tipos sorológicos (tipo 1 e 2) apresentam antígenos comuns e antígenos tipos-específicos, podendo ser distinguidos pelas manifestações clínicas e bioquímicas (CRAIGHEAD, 2004).

### **Infecções Herpéticas**

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, necessitam da atividade metabólica e das organelas da célula hospedeira para produção de energia e síntese de macromoléculas para a sua multiplicação (VOYLES, 1993; FIELDS, 2001; JASSIM; NAJI, 2003).

Os vírus são capazes de reconhecer e de penetrar em células-alvo, principalmente pela especificidade dos receptores existentes na superfície dessas células hospedeiras e dos próprios vírus. O conjunto de eventos que vão desde a adsorção viral até a liberação dos vírions é chamado de ciclo de multiplicação viral. A forma pela qual o vírus realiza as etapas do seu ciclo replicativo é determinada pela estrutura do seu genoma e pela estrutura do próprio vírion. As principais etapas de multiplicação de um vírus podem ser resumidas em uma fase inicial, com adsorção do vírus à célula hospedeira, penetração e desnudamento (decapsidação) da partícula, e uma fase tardia, que vai desde a síntese das moléculas até a automontagem e liberação dos vírions (WHITE; FENNER, 1994; JENSSEN et al., 2004).

Para iniciar sua infecção, o HSV-1 precisa se ligar a receptores celulares, fundir seu envelope com a membrana plasmática, e permitir que o capsídeo seja transportado

até os poros da membrana do núcleo da célula, onde o genoma viral será liberado. No núcleo, ocorrerá a transcrição, síntese de DNA e proteínas, montagem do capsídeo, empacotamento do DNA e envelopamento, culminando com a liberação de um novo vírion potencialmente infeccioso (WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

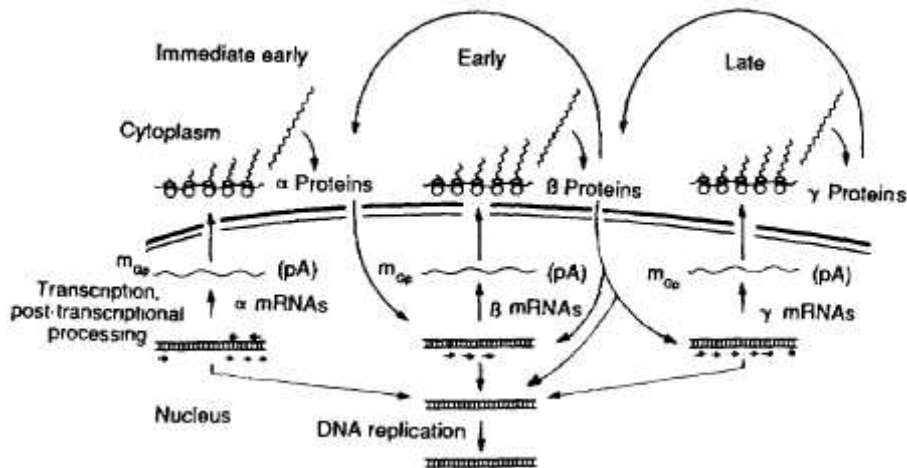
O contato inicial do HSV com a célula se dá pelo processo de adsorção, através da ligação do vírion com cadeias de glicosaminoglicanas (GAG) de proteoglicanas da superfície celular. O sulfato de heparana, um dos diversos tipos de GAG, é considerado o principal receptor de ligação do HSV-1. Duas glicoproteínas (das onze descritas até o momento) presentes no envelope viral, denominadas gB e gC, são capazes de se ligar ao sulfato de heparana e mediar a adsorção viral, além de induzir a resposta imune (SHUKLA; SPEAR, 2001; SPEAR, 2004; FUSCO et al., 2005; SU et al., 2008).

A principal via de penetração do HSV é por fusão na membrana da superfície celular, mas também pode ocorrer por endocitose. Para que ocorra a penetração por fusão, após a adsorção da partícula viral à superfície celular, é necessário que a glicoproteína gD interaja com um dos receptores celulares (WHITLEY; ROIAMAN, 2001; FUSCO et al., 2005; ATANASIU, 2007). A ligação da gD com um dos receptores resulta na fusão do envelope do envelope viral com a membrana da célula, possibilitando a entrada do nucleocapsídeo e do tegumento no citoplasma celular. Neste processo estão envolvidas, além da gD e seus receptores, a gB e o heterodímero gH-gL (SHUKLA; SPEAR, 2001; SPEAR, 2004; FUSCO et al., 2005; ATANASIU, 2007; SU et al., 2008).

Após a penetração, o nucleocapsídeo é transportado até a membrana nuclear, atravessa os poros, e atinge o núcleo, acompanhado pelas proteínas do tegumento  $\alpha$ -TIF ou VP16 e *vhs* que desempenham importantes papéis no processo de replicação viral. A síntese dos produtos gênicos virais é realizada em três fases sequenciais: imediata, precoce e tardia, sendo a última subdividida em tardia falsa e tardia verdadeira, fenômeno que pode ser ilustrado pela figura 1 (MCKNIGHT et al., 1987; WHITE e FENNER, 1994; BOEHMER e LEHMAN, 1997; ROIZMAN et al., 2001; WHITLEY; ROIZMAN, 2001; GU; BELLURY, 2005).

A multiplicação viral alcança sua última fase com o aparecimento de transcritos da fase tardia. Com o início da replicação, e conseqüente acúmulo de DNA viral, ocorre a sinalização para que os genes tardios sejam transcritos, gerando mais de 30 produtos, que codificam proteínas estruturais do capsídeo e tegumento, e outras proteínas que formarão o vírion, como as glicoproteínas presentes no envelope viral (BOEHMER, 1997; ROIZMAN et al., 2005).

**Figura 1-** Diagrama representando a transcrição, tradução e replicação do DNA dos vírus herpéticos.



Fonte: White e Fenner (1994).

As proteínas estruturais do capsídeo são transportadas para o núcleo, onde são reunidas em pró-capsídeos vazios, que posteriormente são preenchidos com DNA viral. Os nucleocapsídeos ligam-se em porções modificadas da membrana nuclear interna, que contém glicoproteínas virais; são temporariamente envelopados e liberados no espaço nuclear intermembranário. Posteriormente, os vírions passam para o citoplasma sem o envelope. No citoplasma são adicionadas as proteínas do tegumento e ocorre a maturação final, em que o capsídeo e o tegumento fundem-se com vesículas exocíticas, cujas membranas contêm todas as glicoproteínas virais, formando o envelope. Os vírions infectivos estão prontos, podendo permanecer na célula associados a estas vesículas ou serem liberados da célula. Todo o processo de multiplicação viral leva em torno de 18 h (WHITE; FENNER, 1994; WHITLEY; ROIZMAN, 2001; METTENLEITER, 2002).

As doenças virais acompanham o homem desde a formação das primeiras comunidades, o primeiro caso de infecção viral, provavelmente, ocorreu por volta de 2000 a.C., na China e no leste da Ásia onde foram relatados sintomas do que hoje se conhece por varíola. Em 2003, estimava-se que 25 a 35% da população sexualmente ativa do ocidente estava infectada com herpes genital (Herpes simplex tipo 2) (WHO, 2003).

Nos Estados Unidos, aproximadamente 80% e 35% da população adulta está infectada ou é soro-positiva para HSV-1 e HSV-2, respectivamente (ZHANG et al., 2007). Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2008), mais de 7,6% da população mundial estão infectadas pelo vírus HSV-2 transmitido comumente pelo ato sexual, e mais de

20 milhões de pessoas se contagiam a cada ano. Dados mais recentes mostram que a prevalência de anticorpos para HSV-1 e HSV-2 na população é de 60% e 55 % respectivamente (SAKDARAT et al., 2009).

O Herpes simplex vírus causa uma grande variedade de infecções, que são geralmente auto-limitadas em pacientes imunocompetentes (AMMENDOLIA et al., 2007; CHUANASA et al., 2008), mas em pacientes imunocomprometidos e neonatos, HSV pode causar sérias doenças sistêmicas, como infecções no sistema nervoso central, necrotização aguda, encefalites e meningites (ZHU et al., 2006; CHUANASA et al., 2008; SCHNITZLER et al., 2008).

Além disso, HSV tem sido apontado como um importante fator na disseminação do HIV, pelo recrutamento de células do sistema imunológico para as mucosas afetadas, acarretando maior disponibilidade das células-alvo do vírus HIV (SCHACKER, 2001; CELLUM, 2004; ZHU et al., 2004).

O sorotipo HSV-1 está normalmente associado a infecções oro-faciais, oculares, genitais e encefalites, enquanto que o sorotipo HSV-2 está geralmente relacionado a infecções genitais, herpes neonatal e a oncogenia (JENSSEN et al., 2004). Contudo, ambos os vírus podem causar infecções clinicamente indistinguíveis em vários locais e podem permanecer latentes em gânglios sensoriais, provocando reativações caracterizadas por infecções recorrentes sintomáticas e assintomáticas (BRADY; BERNSTEIN, 2004; REICHLING et al., 2008).

Após a infecção primária nas células epiteliais, HSV-1 rapidamente atinge os gânglios dorsais via axônios, onde estabelecem latência. O mecanismo de latência ainda não está totalmente compreendido, mas este estado é caracterizado pela cessação virtual da transcrição de todos os genes, exceto aqueles genes relacionados com a latência viral.

A reativação pode ocorrer em situações do tipo: radiação ultravioleta, estresse e imunossupressão; nesta situação, os genes que permitem ao HSV-1 causar infecções voltam a ser transcritos e eles saem dos gânglios através dos axônios e iniciam uma nova infecção (SCHLEISS, 2009).

Os sintomas primários da infecção herpética incluem síndrome prodrômica, semelhante ao resfriado comum, caracterizada por febre, dor de garganta, mal estar e mialgias difusas seguidos por sintomas locais da infecção. As manifestações clínicas exibem severidade diferente entre pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos (CHENG et al., 2004; KHAN et al., 2005).

A incidência e a severidade das infecções causadas por HSV têm aumentado nas últimas décadas. Isto ocorre devido ao aumento do número de pacientes imunocomprometidos pelo tratamento quimioterápico agressivo, ou devido à síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), ou indivíduos transplantados (XU et al., 1999; ZHANG et al., 2007; SCHNITZLER et al., 2008).

Outra característica importante das infecções herpéticas é que correntemente elas estão associadas a uma infecção bacteriana secundária, de modo que seria interessante uma substância antimicrobiana que tivesse atividade antiviral e antibacteriana (CAMARGO FILHO, 2008).

### **Antivirais Sintéticos**

A busca por novos fármacos passou por avanços significativos nos últimos anos, principalmente depois da introdução de modelos biológicos realizados *in vitro* e em grande escala (NIELSEN, 2002; NEWMAN et al., 2004).

Em contraste com a enorme quantidade de fármacos antibacte disponíveis, o atual arsenal terapêutico antiviral compreende aproximadamente 40 fármacos utilizados em várias infecções virais, sendo que a maioria deles é utilizada no tratamento de infecções causadas pelo vírus da imunodeficiência humana (DE CLERCQ, 2005).

Uma das principais razões para a falta de sucesso no desenvolvimento de fármacos antivirais é a natureza do vírus. Como mencionado anteriormente, os vírus apresentam uma estrutura simples e um sistema enzimático bastante restrito, sendo dependentes dos processos metabólicos celulares para sua multiplicação (DE CLERCQ, 2004; ORHAN et al., 2009). Conseqüentemente, vários passos da sua replicação envolvem processos metabólicos da célula hospedeira, e isto tem dificultado o ataque direto ao vírion ou a sua replicação, sem causar efeitos adversos nas células infectadas (JASSIM; NAJI, 2003).

Apesar disso, cada vez mais fármacos antivirais são encontrados nos diversos estágios de desenvolvimento, para serem licenciados e utilizados por humanos e animais. Assim o número de agentes antivirais tem aumentado (FALCO et al., 2007), pois com a melhor compreensão dos processos de replicação viral, vários eventos específicos do vírus se mostraram susceptíveis à quimioterapia seletiva (DE CLERCQ, 2001). Muitos vírus possuem características únicas em sua estrutura ou em seu ciclo de replicação e estes constituem alvos potenciais de fármacos antivirais (JASSIM; NAJI, 2003).

Enzimas virais são as peças chaves para a patogênese viral. Se essas enzimas forem neutralizadas, a replicação viral e o processo proteolítico essencial para a maturação dos vírus podem ser interrompidos (JASSIM; NAJI, 2003).

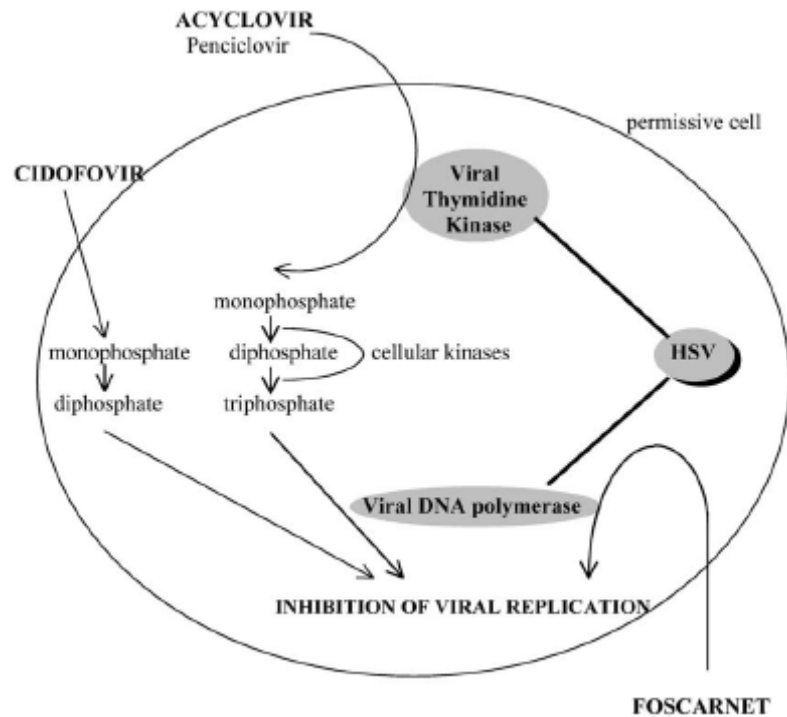
O sucesso da quimioterapia antiviral contra o herpes simplex se deve ao desenvolvimento de acicloguanosina, conhecido como aciclovir, que interage com proteínas chaves da replicação viral (JASSIM; NAJI, 2003; JENSSEN et al., 2004).

O aciclovir, desenvolvido na década de 70, é atualmente o fármaco de escolha para as infecções herpéticas, mostrando-se ativo contra Herpes simplex tipo 1 e tipo 2 e vírus da Varicela Zoster (SUZUKI et al., 2006). Seu mecanismo de ação está relacionado ao fato de ser um análogo do nucleosídeo guanosina funcionando como terminadores da duplicação do DNA (GOLANKIEWICZ; OSTROWSKI, 2006; SUZUKI et al., 2006; SCHNITZLER et al., 2008; SU et al., 2008).

No interior da célula infectada pelo herpes simples tipo 1 ou tipo 2, o aciclovir é fosforilado por uma enzima viral chamada timidina quinase, o que o torna uma substância com toxicidade seletiva. A segunda e a terceira fosforilação são feitas por timidinas quinases celulares (MORFIN; THOUVENOT, 2003). Uma vez fosforilado, o aciclovir interferirá na polimerização do DNA viral por competir com o nucleotídeo trifosfatado endógeno, 2-deoxiguanosina trifosfatada (SCHLEISS, 2009). Com a incorporação do aciclovir na cadeia de DNA recém sintetizada a síntese fica interrompida e a cadeia não pode ser terminada (GOLANKIEWICZ; OSTROWSKI 2006; SUZUKI et al., 2006; SU et al., 2008).

O aciclovir ainda hoje é o fármaco de escolha para infecções herpéticas e é tão grande a sua importância, que além do uso clínico, muitos cientistas usam esse composto como referência em pesquisas. Em 2003, mais de 9000 artigos foram publicados relacionando o aciclovir e seu uso (JEROME, 2005). Além do aciclovir, outros fármacos estão licenciados para o tratamento de infecções herpéticas. A figura 2, ilustra os diferentes tipos de mecanismos de ação dos fármacos antivirais.

**Figura 2** - Mecanismo de ação dos fármacos anti-HSV



Fonte: Morfin e Thouvenot (2003).

Há três décadas, o aciclovir tem sido extensivamente usado no tratamento das infecções por herpes simplex e como consequência a resistência a esse antiviral tem emergido, principalmente em pacientes imunocomprometidos, pela seleção de cepas resistentes (XU et al., 1999; THI et al., 2005; ZHANG et al., 2007; CHUANASA et al., 2008; SU et al., 2008). Em pacientes imunocompetentes, o isolamento de HSV-1 resistente a aciclovir e a outros análogos de nucleosídeos é raro, mas em 2008, Cheng e colaboradores relataram que de 0,28 % a 0,33 % dos isolados clínicos apresentam algum grau de resistência.

Em adição a esse uso extensivo, casos de disfunção renal têm sido associados aos análogos de nucleosídeos como ganciclovir, valaciclovir, fanciclovir e penciclovir (ERNEST; FRANEY, 1998; ZHU et al., 2006). Outro problema encontrado com o uso desses análogos está no alto custo de um tratamento a longo prazo, que se faz necessário em pacientes com reativações (KHAN et al., 2005).

Embora o aciclovir seja considerado um fármaco padrão-ouro, sua eficácia é diminuída em episódios recorrentes de infecção por HSV (COEN, 1996), como aqueles observados nos pacientes imunocomprometidos (JENSSEN et al., 2004). A resistência ao aciclovir e a outros análogos pode ocorrer pela mutação da timidina quinase ou de DNA polimerase virais (MORFIN; THOUVENOT, 2003; KHAN et al., 2005). Há relato de

amostras clínicas de herpes simplex resistentes a aciclovir por não possuírem timidina quinase ativa (KHAN et al., 2005).

Além da DNA polimerase, outras proteínas que agem durante os estágios da replicação de herpesvírus podem ser alvos úteis para novos antivirais. Entre eles destacam-se as proteínas necessárias à fixação e a penetração do vírus, porque os fármacos não necessitariam entrar na célula para exercer seus efeitos. Dessa forma, impediria a infecção e conseqüentemente inibiria a síntese de proteínas virais (COEN; SCHARFFER, 2003).

### **Combinações de antivirais**

A utilização da combinação de fármacos no tratamento de várias infecções virais tem aumentado (MARCELLETTI, 2002). O efeito da administração de aciclovir com outras substâncias antivirais no tratamento de infecções herpéticas tem sido estudado *in vitro*, *in vivo* e durante o tratamento (MUCSI et al., 2001).

O uso de aciclovir associado a outras substâncias biologicamente ativas pode apresentar um efeito sinérgico, fato que proporciona menor resistência de HSV frente aos análogos de nucleosídeos, uma vez que a pressão de seleção se torna menor, pelo uso de menores doses (MUCSI et al., 2001; CHUANASA et al., 2008). Simultaneamente a isso, há diminuição dos efeitos citotóxicos (MUCSI et al., 2001).

A palavra “sinergismo” significa que no uso combinado de duas ou mais substâncias que interagem entre si há a potencialização de um efeito (WILLIAMSON, 2001). O efeito sinérgico pode ser observado quando a segunda substância apresenta um mecanismo de ação diferente ao do aciclovir (MUCSI et al., 2001).

Mas, desvantagens também podem ocorrer, já que casos de efeitos adversos exagerados e falências terapêuticas são observados, fenômeno chamado de antagonismo (JASSIM; NAJI, 2003; JOHNSON et al., 2004).

Em estudos clínicos utilizando 52 pacientes e substâncias obtidas de várias plantas foi observado que extratos de *Actium lappa*, *Calendula officinalis* e *Geranium robertianum* melhoram o quadro de queratite herpética quando associados ao aciclovir (CORINA et al., 1999). Chuanasa et al. (2008) mostraram que oxiresveratrol combinado com aciclovir apresenta efeito sinérgico na redução da formação de placas.

## **Plantas como agentes antimicrobianos**

Através dos anos, o homem tem retirado da natureza matérias-primas para a produção de fragrâncias, flavorizantes, alimentos, roupas, calçados e medicamentos (GURIB-FAKIM, 2006). A utilização de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antiga quanto à própria civilização humana. Por um longo período, produtos de origem animal, mineral e vegetal foram as principais fontes de substâncias biologicamente ativas (RATES, 2001; MUKHTAR et al., 2008).

O reino vegetal é uma das fontes mais importantes de produtos naturais biologicamente ativos e seu estudo tem sido estimulado pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1999), uma vez que as espécies vegetais têm constituído a base da medicina tradicional (GURIB-FAKIM, 2006). No planeta, existe uma grande variedade de plantas, cerca de 250 – 500 mil espécies, contudo a maioria ainda é desconhecida cientificamente e pouco mais de 5% estudada fitoquimicamente, e uma porcentagem menor avaliada sob os aspectos biológicos (GURIB-FAKIM, 2006). Os produtos naturais e seus derivados representam mais de 50% de todas as substâncias com atividades biológicas em uso clínico no mundo sendo que as plantas contribuem com 25% desse total (GURIB-FAKIM, 2006). Estima-se que aproximadamente 20.000 espécies de várias famílias sejam utilizadas com esse propósito (GURIB-FAKIM, 2006).

As plantas têm uma quase ilimitada habilidade de sintetizar substâncias aromáticas, a maioria das quais, são fenóis ou seus derivados oxigênio-substituídos. A grande parte é metabólito secundário, que contribui para o mecanismo de defesa contra predação por microrganismos, insetos e herbívoros (COWAN, 1999). Esta diversidade química e de atividades biológicas têm impulsionado descobertas de agentes terapêuticos para muitas doenças (O'KEEFE, 2001).

O uso de plantas medicinais no mundo, e especialmente na América do Sul, contribui significativamente para os primeiros cuidados com a saúde (GURIB-FAKIM, 2006).

Desde muito tempo, plantas medicinais têm sido usadas para o tratamento de muitas doenças infecciosas, na forma de extratos e/ou infusões, em muitos casos sem a evidência científica de sua eficiência (HOLETZ, 2002; GURIB-FAKIM, 2006). E atualmente, grande parte da população mundial prefere o uso de produtos naturais no tratamento e prevenção de doenças, além disso, cerca de 80 % dessa população depende parcial ou totalmente de medicamentos derivados de plantas (KUETE et al., 2008). Este panorama tem influenciado muitas indústrias farmacêuticas a produzirem novas formulações

antimicrobianas à base de plantas (JASSIM; NAJI, 2003), nesse sentido, tem-se aumentado o estudo científico das propriedades das plantas utilizadas popularmente, o que conseqüentemente levará ao uso racional de certas preparações (KHAN et al., 2005).

Através de um número significativo de estudos, tem sido possível purificar substâncias biologicamente ativas utilizando extratos de partes de plantas. Estas substâncias têm provido as indústrias farmacêuticas, e mais de 40% dos fármacos modernos são derivados das substâncias purificadas dessas plantas ou de sua versão sintética (JASSIM; NAJI, 2003).

Nos Estados Unidos, entre 1959 e 1980, estima-se que de todas as prescrições dispensadas nas farmácias comunitárias, 25% continham extratos de plantas ou princípios ativos derivados de extratos. Pelo menos 119 substâncias químicas, derivadas de 90 espécies de plantas, podem ser consideradas como importantes substâncias utilizadas correntemente (GURIB-FAKIM, 2006). Durante os últimos 40 anos, pelo menos 12 substâncias biologicamente ativas derivadas de plantas foram descobertas, entre elas está a reserpina e a pilocarpina (GURIB-FAKIM, 2006).

Muitas plantas da medicina tradicional têm sido relatadas como potentes antivirais, pois interferem em vários processos virais que ocorre desde a adsorção até a liberação viral, que podem resultar em ação complementar aos medicamentos utilizados atualmente (VLIETINCK; BERGHE, 1991; CHENG et al., 2004; SCHNITZLER, et al., 2008).

Pesquisas por agentes antivirais em plantas iniciaram depois da Segunda Guerra Mundial na Europa. Em 1952, a companhia Boots de Nottingham, Inglaterra, examinou a atividade de 288 plantas contra o vírus influenza A, das quais 12 inibiram a replicação viral em ovos embrionados (JASSIM; NAJI, 2003).

Nas últimas décadas, diferentes substâncias bioativas de plantas têm sido investigadas, sendo que aproximadamente 10 % têm apresentado atividade antiviral promissora. A avaliação da atividade dessas plantas identificou algumas substâncias como antraquinonas, flavonóides, polissacarídeos, triterpenos, catequinas, proteínas e peptídeos que exibem atividade inibitória na replicação do vírus herpes simples (HSV) (ZHU et al., 2006). Em 2006, Tolo e colaboradores relataram alta atividade anti-HSV-1 *in vitro* e *in vivo* de extratos de *Carissa edulis*. Dois polissacarídeos, 1346TOGDG e geraniin, isolados de *Phyllanthus urinaria* inibiram a replicação de HSV-1 e HSV-2, respectivamente (YANG et al., 2007).

## **Proteínas e peptídeos antivirais**

Proteínas com atividade antimicrobiana têm sido isoladas de uma grande variedade de organismos vivos. Podem ser isolados de microrganismos [bactérias e fungos (WHANG et al., 2001; ZELEZETSKY et al., 2005; GONG et al., 2009)], animais vertebrados [peixes, anfíbios, serpentes, répteis, aves e mamíferos (WANG et al., 2001)], invertebrados [crustáceos, insetos e esponjas (WANG et al., 2001)] e plantas, mostrando grande espectro de atividade antimicrobiana contra diferentes bactérias, fungos e vírus (CARVALHO et al., 2001; WHANG et al., 2001; DEEPAK et al., 2003; MATANIC; CASTILHA, 2003; ZELEZETSKY et al., 2005; GONG et al., 2009).

Nos animais, proteínas antimicrobianas constituem parte do sistema imune inato (BOMAN, 1995; WHANG et al., 2001; ZELEZETSKY et al., 2005). A resposta inata é a primeira linha de defesa contra agentes infecciosos. Em um primeiro momento, a resposta imune é caracterizada pela produção de diferentes citocinas, bem como outros mediadores imunes e fatores antivirais, como os peptídeos antimicrobianos, que controlam a replicação viral e permitem a elaboração de uma resposta imune específica (FALCO et al., 2007).

A atividade antiviral de defensinas humanas, um grupo de peptídeos folha  $\beta$ , contra vírus envelopados como o herpes simples tipo 1 (HSV-1) e tipo 2 (HSV-2), vírus da imunodeficiência tipo 1 (HIV-1), vírus da estomatite vesicular (VSV), vírus influenza e citomegalovírus tem sido descrita. Esse efeito ocorre pela inativação direta das partículas virais (MATANIC; CASTILLA, 2003) e provavelmente as defensinas são a primeira linha de defesa contra vírus envelopados e não envelopados (FALCO et al., 2007).

Nas plantas, provavelmente, as proteínas com atividade antimicrobianas foram desenvolvidas para complementar o sistema de defesa por indução, que têm um importante papel nos estágios iniciais do seu desenvolvimento (WHANG et al., 2001). Recentemente, foi descrito que as defensinas de plantas fazem parte do armamento do seu sistema imune inato (GAMES et al., 2008).

Peptídeos catiônicos são produzidos por todos os organismos, e têm uma vasta atividade biológica, incluindo antibacteriana, antifúngica, antiparasitária, antitumoral e antiviral (MATANIC; CASTILLA, 2003; JENSSEN et al., 2004). Têm uma enorme variedade de seqüências de aminoácidos e estruturas, mas alguns aspectos são comuns. Como por exemplo, apresentam geralmente de 12 a 50 aminoácidos, carga positiva em função do excesso dos resíduos de lisina e arginina, e contêm cerca de 50% de aminoácidos hidrofóbicos (HANCOCK, 2001).

Nas plantas, os peptídeos antimicrobianos são também chamados de defensinas, são pequenos e apresentam de 45 a 54 resíduos de aminoácidos, tridimensionalmente são formados por três folhas  $\beta$  e uma  $\alpha$ -hélice que é estabilizada por quatro pontes dissulfeto. As quatro pontes dissulfeto formam a estrutura estabilizada conhecida por cisteína- $\alpha$ -hélice-folha- $\beta$  comum desses peptídeos (GAMES et al., 2008).

Em decorrência da seqüência de aminoácidos e de estudos tridimensionais realizados com o auxílio de ressonância magnética nuclear, esses peptídeos antimicrobianos são classificados em cinco grupos: (a) peptídeos que formam estruturas  $\alpha$ -hélices; (b) ricos nos resíduos de cisteína; (c) folha  $\beta$ , estabilizadas por duas ou três pontes dissulfeto; (d) ricos nos aminoácidos como histidina, arginina e prolina; e (e) compostos por aminoácidos raros e modificados (MATANIC; CASTILLA, 2003; REDDY et al., 2004). As estruturas  $\alpha$ -hélice e  $\beta$  são as mais comuns na natureza (HANCOCK, 2001).

Estudos mais recentes classificam os peptídeos de acordo com a homologia entre suas cadeias de aminoácidos. Nesta abordagem, eles são classificados em seis grupos diferentes: (a) peptídeos isolados de sementes de *Mirabilis jalapa*; (b) de *Amaranthus caudatus*; (c) de *Zea mays*; (d) membros da família tionina; (e) membros da família de proteínas transportadoras de lipídeos; e (f) defensinas de plantas (DIZ et al., 2006).

O mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos ainda apresenta algumas controvérsias, tendo um consenso que estes peptídeos seletivamente rompem a membrana celular. O arranjo anfipático estrutural desses peptídeos representa um importante papel neste mecanismo (REDDY et al., 2004).

Um dos mecanismos propostos seria a formação de canais ou poros transmembrana pelo emparelhamento de peptídeos  $\alpha$ -hélices anfipáticos com a bicamada lipídica e posterior internalização. Um progressivo recrutamento de monômeros adicionais aumenta o tamanho do poro liberando o conteúdo celular e conseqüentemente morte celular (REDDY et al., 2004; ZELEZETSKY et al., 2005). Em um outro mecanismo, em alta concentração, os peptídeos se orientam para uma posição perpendicular em relação a membrana citoplasmática para a formação de canais com estrutura regular ou causam a ruptura drástica da integridade celular (HANCOCK, 2001).

Os peptídeos anti-HSV obtidos de plantas são freqüentemente  $\alpha$ -hélice e folha  $\beta$ , ambos anfipáticos. Muitos peptídeos folha  $\beta$  inativam HSV-1 e/ou HSV-2. Além disso, foi mostrado que peptídeos  $\alpha$ -hélice semelhantes à cecropina, clavalina e LL-37 apresentam baixa atividade anti-HSV, enquanto indolicidina, melitina e magainina apresentam alta atividade contra HSV-1 e HSV-2 (JENSSEN et al., 2004).

Da raiz de *Panax ginseng*, uma proteína de 26 kDa designada panaxagina mostrou atividade antifúngica de amplo espectro, além de mostrar atividade anti-HIV por inibir a transcriptase reversa (WANG et al., 2001). Eugenin, isolada de extrato aquoso de *Geum japonicum* e *Syzygium aromaticum* tem mostrado efeito profilático e antiherpético, inibindo a síntese de DNA viral e das proteínas do capsídeo (KUROKAWA et al., 1998). Uma proteína inibidora de ribossomo isolada de raiz de *Cucurbita foetidissima*, foetidissimina, com peso molecular de 63 kDa apresenta atividade antiviral em cultura de células infectadas por HSV (ZHANG et al., 2003). Um peptídeo de 2 kDa isolado de *Sorghum bicolor* inibiu a replicação de HSV-1 depois da incubação com 20-100 µg/ml do peptídeo, com EC<sub>50</sub> 12,5 µg/ml (CAMARGO FILHO et al., 2008).

### ***Helianthus annus***

*Helianthus annus*, popularmente conhecida como girassol, apresenta ampla capacidade de adaptação às diversas condições de latitude, longitude e fotoperíodo. Nos últimos anos, vem se apresentando como opção de rotação e sucessão de culturas nas regiões produtoras de grãos (NEWTON et al., 2002; GONORAZKY et al., 2004).

O girassol vem sendo utilizado, principalmente, para extração de óleo e é considerado, como um dos de melhor qualidade nutricional e organoléptica (aroma e sabor). Além disso, a massa resultante da extração do óleo rende uma torta altamente protéica, usada na produção de ração. O girassol ainda é utilizado na silagem para alimentação animal e seu cultivo também pode estar associado à apicultura (LAGAPODI; THANASSOPOULOS, 1998; GONORAZKY et al., 2004).

Na medicina popular infusões e/ou tinturas das suas folhas são utilizadas como dietética por estimular a digestão e diurese; e para tosse, resfriado e coqueluche (GRIEVE, 1994; WREN, 1998), enquanto que suas sementes promovem uma leve sedação (LEPORATTI; IVANCHEVA, 2003). O extrato alcoólico das pétalas mostrou moderada atividade contra *Mycobacterium aurum* e *M. smegmatis* uma vez que a concentração inibitória mínima foi maior que 500 µg/mL (NEWTON et al., 2002).

Regente e La Canal (2003) descreveram a presença de Ha-AP10, um polipeptídeo de 10 kDa, uma defensina de planta, presente nas sementes de girassol. Cerca de 200 µg/mL desse polipeptídeo inibiu a germinação de esporos do fungo fitopatogênico *Alternaria alternata*.

## OBJETIVOS

- Realizar o isolamento biomonitorado, a purificação e parcial caracterização de peptídeos presentes na semente de *Helianthus annuus*;
- Avaliar a citotoxicidade do extrato bruto, frações e do peptídeo 6 kDa em células VERO;
- Avaliar a atividade anti-HSV-1 do extrato bruto, frações e do peptídeo 6 kDa;
- Determinar o possível mecanismo de ação do peptídeo 6 kDa contra HSV-1;
- Avaliar a atividade sinérgica entre o peptídeo 6 kDa com aciclovir contra HSV-1.

## REFERÊNCIAS

- AMMENDOLIA, M. G.; MARCHETTI, M.; SUPERTI, F. Bovine lactoferrin prevents the entry and intercellular spread of herpes simplex virus type 1 in Green Monkey Kidney cells. **Antiviral Research**, v. 76, p. 252-262, 2007.
- ATANASIU, D.; WHITBECK, J. C.; CAIRNS, T. M.; REILLY B.; COHEN, G. H.; EISENBERG, R. Biomolecular complementation reveals that glycoproteins gB and gH/gL of herpes simplex virus interact with each other during cell fusion. **Microbiology**, v.104, nº 47, p. 18718-18723, 2007.
- BOEHMER, P.E.; LEHMAN I.R. Herpes simplex virus DNA replication. **Annual Reviews in Biochemistry**, v.66, p.347-384, 1997.
- BOMAN, H. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. **Annual Review Immunology**, v. 13, p. 61-92, 1995.
- BRADY, R. C.; BERNSTEIN, D. J. Treatment of herpes simplex virus infections. **Antiviral Research**, v.61, p. 73-81. 510, 2004.
- CAMARGO FILHO, I.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Antiviral activity and mode of action of a peptide isolated from *Sorghum bicolor*. **Phytomedicine**, v.15, p. 202-208, 2008.
- CARVALHO, A. O.; MACHADO, O. L. T.; CUNHA, M; SANTOS, I.S.; GOMES, V. M. Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. **Plant Physiology Biochemistry**, v.39, p. 137-146, 2001.
- CELUM, C.L. The interaction between herpes simplex virus and human immunodeficiency virus. **Herpes**, v.11 Suppl 1, p.36A-45A, 2004.
- CHENG, H.Y.; LIN, T.C.; YANG, C.M.; WANG, K.C.; LIN, C.C. Mechanism of action of the suppression of herpes simplex virus type 2 replication by pterocarnin A. **Microbes Infection**, v.6, p.738-744, 2004.
- CHENG, H.Y.; HUANG, H.H.; YANG, C.M.; LIN, T.C.; LIN, C.C. The in vitro anti-herpes simplex virus type-1 and type-8 activity of long dan xie gan tan, a prescription of tradicional chinese medicine. **Chemotherapy**, v. 54, p. 77-83, 2008.
- CHUANASA, T.; PHROMJAI, J.; LIPIUN, V.; LIKHITWITAYAWUID, K.; SUZUKI, M.; PRAMYOTHIN, P.; HATTORI, M.; SHIRAKI, K. Anti-herpes simplex virus (HSV-1) activity of oxyresveratrol derived from Thai medicinal plant: Mechanism of action and therapeutic efficacy on cutaneous HSV-1 infection in mice. **Antiviral Research**, v.80, p. 62-70, 2008.
- COEN, D. M. Antiviral drug resistance in herpes simplex. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 394, p. 49-57, 1996.
- COEN, D. M.; SCHARFFER, P. A. Antitherpesvirus drugs: A promising spectrum of new drugs and drugs targets. **Nature reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 278-288, 2003.

- CORINA, P., DIMITRIS, S.; EMANUIL, T.; NORA, R. Treatment with acyclovir combined with a new Romanian products from plants. **Oftalmologia**, v.46, p. 55-57, 1999.
- COWAN, M. M. Plants products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n° 4, p. 564-582, 1999.
- CRAIGHEAD, J. E. Pathology and pathogenesis of human viral disease, San Diego: Academic Press, 2004.
- DA SILVA, A.G. Propriedades gerais dos herpesvirus. In: LUPI, O.; DA SILVA, A.G.; PEREIRA JR, A.C. (Org.). Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento. Rio de Janeiro: **Medsi**, p. 1-14, 2000.
- DE CLERCQ, E. Molecular targets for antiviral agents. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 297, p. 1-10, 2001.
- DE CLERCQ, E. Antiviral drugs in current clinical use. **Journal of Clinical Virology**, v.30, p.115-133, 2004.
- DE CLERCQ, E. Antiviral drug discovery and development: where chemistry meets with biomedicine. **Antiviral Research**, v.67, p.56-75, 2005.
- DEEPAK, A.V.; THIPPESWAMY, G.; SHIVAKAMESHWARI, M.N.; SALIMATH B. P. Isolation and characterization of a 29-kDa glycoprotein with antifungal from bulbs of *Urginea indica*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 311, p. 735-742, 2003.
- DIZ, M. S. S.; CARVALHO, A. O.; RODRIGUES, R.; NEVES-FERREIRA, A. G.; CUNHA, M.; ALVES, E. W.; OKOROKOVA-FAÇANHA, A. L.; OLIVEIRA, M. A.; PERALES, J.; MACHADO, O. L. T.; GOMES, V. M. Antimicrobial peptides from chilli pepper seeds causes yeast plasma membrane permeabilization and inhibits the acidification of the medium by yeast cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1760, p. 1323-1332, 2006.
- ERNST, M. E.; FRANEY, R. J. Acyclovir- and ganciclovir- induced neurotoxicity. **The annals of pharmacotherapy**, v. 32, p. 111-113, 1998.
- FALCO, A.; MAS, V.; TAFALLA, C.; PEREZ, L.; COLL, J. M.; ESTEPA, A. Dual antiviral of human alpha-defensin-1 against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV): Inactivation of virus particles and induction of type I interferon-related response. **Antiviral Research**, 2007.
- FIELDS, H. J. Herpes simplex virus antiviral drug resistance-current trends and future prospects. **Journal of Clinical Virology**, v.21, p. 261-269, 2001.
- FUSCO, D.; FORGHIERI, C.; CAMPADELLI-FIUME G. The pro-fusion domain of herpes simplex virus glycoprotein D (gD) interacts with the gD N terminus and is displaced by soluble forms of viral receptore. **Microbiology**, v. 102, n° 26, p. 9323-9328, 2005.
- GAMES, P. D.; SANTOS, I. S.; MELLO, E. O.; DIZ, M. S. S.; CARVALHO, A. O.; SOUZA-FILHO, G. A.; CUNHA, M.; VASCONCELOS, I. M.; FERREIRA B. S.; GOMES,

V. M. Isolation, characterization and cloning of cDNA encoding a new antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* L. seeds. **Peptides**, v. 29, p. 2090-2100, 2008.

GILBERT, C.; BESTMAN-SMITH, J.; BOIVIN, G. resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms. **Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy**, v. 5, p. 88-114, 2002.

GOLANKIEWICZ, B.; OSTROWSKI, T. Tricyclic nucleoside analogues as antiherpes agents. **Antiviral Research**, v. 71, p. 134-140, 2006.

GONG, M.; PIRAINO, F.; YAN, N.; ZHANG, J.; XIA, M.; MA, J.; CHENG, J.; LIU, X. Purification, partial characterization and molecular cloning of the novel antiviral protein RC28. **Peptides**, v. 30, p. 654-659, 2009.

GONORAZKY, A. G.; REGENTE, M. C.; LA CANAL, L. Stress induction and antimicrobial properties of lipid transfer protein in germinating sunflower seeds. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 618-624, 2004.

GRIEVE, M. In: Lye, C.F. (Ed.). A Modern herbal. **Tiger Books International**, London.

GU, V. H.; BELLURY, M.A. Selective induction of apoptosis in murine skin carcinoma cells (CH72) by an ethanol extract of *Lentinula edodes*. **Cancer Letters**, v. 220, p. 21-28, 2005.

GURIB-FAKIM, AMEENAH. Medical plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

HANCOCK, R. E W. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, p. 156-164, 2001.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R. ; CORTEZ, D. A. G. ; NAKAMURA, C. V. ; DIAS FILHO, B. D. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027-1031, 2002.

JASSIM, S. A. A.; NAJI, M. A. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 412-427, 2003.

JENSSEN, H.; ANDERSEN, J. H.; MANTZILAS, D.; GUTTEBERG, T. J. A wide range of medium-size, highly cationic,  $\alpha$ -helical peptides show antiviral activity against herpes simplex virus. **Antiviral Research**, v. 64, p. 119-126, 2004.

JEROME, K. R. The road to new antiviral therapies. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 5, p. 65-76, 2005.

JHONSON, M. D.; MACDOUGALL, C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PERFECT, J. R.; REX, J. H. Combination antifungal therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n° 3, p. 693-715, 2004.

- KHAN, M. T. H.; ATHER A.; THOMPSON, K. D.; GAMBARI, R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. **Antiviral Research**, v. 67, p. 107-119, 2005.
- KUETE, V.; NGAMENI, B.; SIMO C. C. F.; TANKEU, R. K.; NGADJUI, B. T.; MEYER J. J. M.; LALL, N.; KUIATE, J. R. Antimicrobial activity of the crude extracts and compounds from *Ficus chlamydocarpa* and *Ficus cordata* (Moraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 17-24, 2008.
- KUROKAWA, M.; HOZUMI, T.; BASNET, P.; NAKANO, M.; KADOTA, S.; NAMBA, T.; KAWANA, T.; SHIRAKI, K. Purification and characterization of eugenin as an anti-herpesvirus compound from *Geum japonicum* and *Syzygium aromaticum*. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 284, p. 728-735, 1998.
- LEPORATTI, M. L.; IVANCHEVA, S. Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 123-142, 2003.
- MARCELETTI, J. Synergistic inhibition of herpesvirus replication by docosanol and antiviral nucleoside analogs. **Antiviral Research**, v. 56, p. 153-166, 2002.
- MATANIC, V. V. A.; CASTILLA, V. Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against Junin virus and herpes simplex virus. **Antimicrobial Agents**, v. 23, p. 382-389, 2003.
- METTENLEITER, T.C. Herpesvirus assembly and egress. **Journal of Virology**, v.76,p.1537-1547, 2002.
- MCKNIGHT, J.L.C.; KRISTIE, T.M.; ROIZMAN, B. Binding of the virion protein mediating gene induction in herpes simplex virus 1-infected cells to its cis site required cellular proteins. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 84, p.7061-7065, 1987.
- MORFIN, F.; THOUVENOT, D. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. **Journal of Clinical Virology**, v. 26, p. 29-37, 2003.
- MUCSI, I.; MOLNÁR, J.; MOTOHASHI, N. Combination of benz[a]phenothiazines with aciclovir against herpes simplex virus. **Antimicrobial Agents**, v. 18, p. 67-72, 2001.
- MUKHTAR, M.; ARSHAD, M.; AHMAD, M.; POMERANTZ, R. J.; WIGDAHL, B.; PARVEEN, Z. Antiviral potentials of medicinal plants. **Virus Research**, v. 131, p. 111-120, 2008.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SANDER M.K. Advanced preclinical and clinical trials of natural products and related compounds from marine sources. **Current Medical Chemical**, v. 11, p. 1693-713, 2004.
- NEWTON, S. M.; LAU, C.; GURCHA, S. S.; BESRA, G. S.; WRIGHT, C. W. The evaluation of forty-three plant species for in vitro antimycobacterial activities; isolation of active constituents from *Psoralea corylifolia* and *Sanguinaria canadensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 57-67, 2002.

NIELSEN, J. Combinatorial synthesis of natural products. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, p. 297-305, 2002.

O'KEEFE, B. R. Review: Biologically active proteins from natural products extracts. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1373-1381, 2001.

ORHAN, I.; DELIORMAN-ORHAN, D.; ÖZÇELİK, B. Antiviral activity and cytotoxicity of the lipophilic extracts of various edible plants and their fatty acids. **Food Chemistry**, v. 115, p. 701-705, 2009.

RATES, S. M. K. Review: Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

REDDY, K. V. R.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: promises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, p. 536-547, 2004.

REGENTE, M.; DE LA CANAL, L. Purification, characterization and antifungal properties of a lipid transfer protein from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. **Physiology Plant**, v. 110, p. 158-163, 2003.

REICHLING, J.; NOLKEMPER, S.; STINTZING, F. C.; SCHNITZLER, P. Impact of ethanolic extracts on herpesvirus infectivity in cell culture. **Forschende Komplementärmedizin**, v. 15, p. 313-320, 2008.

ROIZMAN, B., GU, H.; MANDEL, G. 2005. The first 30 minutes in the life of a virus: unREST in the nucleus. **Cell Cycle**, v.4, p. 1019-1021, 2001.

SAKDARAT, S.; SHUYPROM, A.; PIENTONG, C.; EKALAKASANANAN, T.; THONGCHAI, S. Bioactive constituents from the leaves of *Cliancanthus nutans* Lindau. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 1857-1860, 2009.

SANTOS, C. R.; CAPELA, R.; PEREIRA, C. S. G. P.; VALENTE, E.; GOUVEIA, L.; PANNECOUQUE, C.; DE CLERCQ, E.; MOREIRA, R.; GOMES, P. Structure-activity relationships for dipeptide prodrugs of acyclovir: Implications for prodrug design. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 2339-2346, 2009.

SAUERBREI, A.; WUTZLER, P. Novel recombinant ELISA assays for determination of type-specific IgG antibodies against HSV-1 and HSV-8. **Antiviral Research**, v. 144, p. 138-142, 2007.

SCHACKER, T. The role of HSV in the transmission and progression of HIV. **Herpes**, v.8, p.46-49, 2001.

SCHLEISS, M. R.; Persistent and recurring viral infections: The human herpesviruses. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, p. 7-21, 2009.

SCHNITZLER, P.; SCHUHMACHER, A.; ASTANI, A.; REICHLING, J. Melissa officinalis oil affects infectivity of enveloped herpesviruses. **Phytomedicine**, v. 15, p. 734-740, 2008.

SHUKLA, D.; SPEAR P.G. Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. **Journal of Clinical Investigation**, v.108, p.503-510, 2001.

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

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

SUBAK-SHARPE, J.H.; DARGAN D.J. HSV molecular biology: general aspects of herpes simplex virus molecular biology. **Virus Genes**, v.16, p.239-251, 1998.

SUZUKI, M.; OKUDA, T.; SHIRAKI, K.; Synergistic antiviral activity of acyclovir and vidarabine against herpes simplex virus types 1 and 2 varicella-zoster virus. **Antiviral Research**, v. 72, p. 157-161, 2006.

THI, T. N.; DEBACK, C.; MALET, I.; BONNAFOUS, P.; AIT- ARKOUB, Z.; AGUT, H. Rapid determination of antiviral drug susceptibility of herpes simplex virus types 1 and 2 by real-time PCR. **Antiviral Research**, v. 69, p. 152-157, 2005.

TOLO, F. M.; RUKUNGA, G. M.; MULI, F. W.; NJAGI, E. N.; NJUE, W.; KUMON, K.; MUNGAI, G. M.; MUTHAURA, C. N.; MULI, J. M.; KETER, J. K.; OISHI, E.; KOFI-TSEKPO, M. W. Anti-viral activity of the extracts of a Kenyan medicinal plant *Carissa edulis* against herpes simplex virus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 92-99, 2006.

VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. A. V. Can ethnopharmacology contribute to the development of antiviral drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 32, p. 141-153, 1991.

VOYLES, B.A. **The biology of viruses**, St Louis: Mosby-Year Book, p. 386, 1993,

WHANG, X.; BUNKERS, G. J.; WALTERS, M. R.; THOMA, R. S. Purification and characterization of three antifungal proteins from cheeseweed (*Malva parviflora*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, p. 1224-1228, 2001.

WHITE, D. O.; FENNER, F. J. 1994. **Medical Virology**, 4th ed. Academic Press, San Diego, CA. 634, 1994.

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

WILLIAMSOM, E. M. Synergy and other interactions in phytomedicines. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 8, n° 5, p. 401-409, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Estrategia de las OMS sobre medicina tradicional, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide reviews, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Centro de noticias de ONU. Más de 500 millones de personas portan virus de herpes genital, 2008.

WREN, R.C. Potters new cyclopedia of botanical London and preparations. Revised by Willianson E. M.; Evans, U. K.

XU, H.; LEE, S. H. S.; LEE, S. F.; WHITE, R.L.; BLAY, J. Isolation and characterization of an anti-HSV polysaccharide from *Prunella vulgaris*. **Antiviral Research**, v. 44, p. 43-54, 1999.

YANG, C. M.; CHENG, H. Y.; LIN, T. C.; CHIANG, L. C.; LIN, C. C. The in vitro activity of geraniin and 1,3,4,6-tetra-*O*-galloyl-beta-D-glucose isolated from *Phyllanthus urinaria* against herpes simplex virus type 1 and type 2 infection. **Journal Ethnopharmacology**, v. 110, n° 3, p. 555-558, 2007.

ZELEZETSKY, I.; PAG, U.; ANTCHEVA, N.; SAHL, H. G.; TOSSI, A. Identification and optimization of an antimicrobial peptide from the ant venom toxin pilosulin. **Archives of Biochemistry and Biophysycs**, v. 434, p. 358-364, 2005.

ZHANG, D.; HALAWEISH, F. T. Isolation and identification of foetidissimin: a novel ribosome-inactivating protein from *Curcubita foetidissima*. **Plant Science**, v. 164, p. 387-393, 2003.

ZHANG, Y.; BUT, P. P.; OOI, V. E.; XU, H.; DELANEY, G. D.; LEE, S. H.S.; SONG, F. L. Chemical properties, mode of action, and in vivo anti-herpes activities of a lignin-carbohydrate complex from *Prunella vulgaris*. **Antiviral Research**, 2007.

ZHU, W.; CHIU, L. C. M.; OOI, V. E. C.; CHAN, P. K. S.; ANG, P. O. Antiviral property and mode of action of a sulphated polysaccharide from *Sargassum patens* against *Herpes simplex* virus type 2. **Antimicrobial Agentes**, v. 24, p. 81-85, 2004.

ZHU, W.; CHIU, L. C. M.; OOI, V. E. C.; CHAN, P. K. S.; ANG, P. O. Antiviral property and mechanisms of a sulphated polysaccharide from the brown alga *Sargassum patens* against *Herpes simplex* virus type 1. **Phytomedicine**, v. 13, p. 695-701, 2006.

**ANEXO**

## ANTI-HSV-1 ACTIVITY AND MODE OF ACTION OF A 6 KD PEPTIDE ISOLATED FROM *HELIANTHUS ANNUS* AND ITS SYNERGISM WITH ACYCLOVIR

Amanda Bortoluci da Silva Oliveira<sup>a</sup>, Tânia Ueda-Nakamura<sup>b</sup>, Celso Vataru Nakamura<sup>b</sup>,  
Benedito Prado Dias Filho<sup>a,\*</sup>

### Abstract

An antiviral peptide of about 6 kD was isolated from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds by a procedure that include gel filtration, ion exchange, and high-performance liquid chromatography (HPLC) in a reversed-phase column. The peptide designated 6 kD peptide strongly inhibited the replication of Herpes simplex type 1 (HSV-1). The highest viral inhibition was detected when 6 kD peptide was added before or during viral attachment with IC<sub>50</sub> values of 5.3 µg/mL and 4.5 µg/mL, respectively. The presence of the 6 kD peptide after HSV-1 infection showed inactive inhibition by plaque reduction as compared to before or during infections. In addition, we demonstrated that 5 µg/mL of 6 kD peptide exerted its anti-HSV-1 effect by inhibiting 86 % of the viral penetration into Vero cells after 20 minutes of incubation. Therefore, it appears that 6 kD peptide can block these two early steps in the HSV infection cycle. In the isobologram analysis, the combined effect of the 6 kD peptide with ACV in Vero cells enhanced the anti-HSV-1 activity of ACV synergistically.

**Keywords:** Herpes simplex virus tipo 1. Sunflower seeds. Chromatographic techniques. Antiviral peptide. Synergism; Cytotoxicity.

### 1. Introduction

Several members of the human herpes virus (HHV) family are causative agents for human diseases. The majority of HHV infections are associated with the Herpes simplex virus (HSV) [1]. Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is a member of the *α-herpesviridae* subfamily [2]. HSV-1 is a common human pathogen, and the prevalence of its antibodies in the general population is as high as 60 % [3].

To establish an infection, HSV-1 must enter the host cell. The entry process is initiated after attachment of the viral glycoproteins to cellular glycosaminoglycan (GAG) chains [4].

---

a Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil

b Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900 Maringá, PR, Brazil

Heparan sulfate (HS) is the main GAG chain for HSV-1 attachment [4]. It causes a wide spectrum of mild to severe symptoms [5,6].

The most common disease is herpetic gingivostomatitis, characterized typically by peri- and intraoral lesions involving the pharyngeal mucosa. In certain cases, it may even lead to life-threatening conditions, especially in patients who are immunocompromised patients [7] because of underlying diseases such as leukemia or recently acquired immunodeficiency syndrome, or patients who undergo cancer chemotherapy or organ transplantation [8-10]. Following the primary infection, HSV-1 will persist in the host for the latter's entire lifetime, and HSV infection is thus considered a lifelong infection [11].

Nucleoside analogs have been extensively investigated and have been commonly used as anti-herpes virus agents [12]. The treatment of choice is acyclovir (ACV), an analog of guanosine which must be phosphorylated to the active form. ACV acts by competitive inhibition of viral DNA polymerase and is a DNA chain terminator [5].

Nucleoside-based therapeutics are effective for treatment of primary and recurrent mucocutaneous infections. Delays in initiating treatment reduce their efficacy. In addition, long-term use of nucleoside-based drugs in immunocompromised individuals may lead to the selection of naturally occurring resistant mutants [5].

Thus there is an urgent need for novel anti-HSV-1 agents, especially those with a different mode of action than acyclovir. Antimicrobial peptides are pervasive and evolutionarily ancient tools of a host's innate defense against pathogens. They are widespread in nature and are found in bacteria, protozoa, plants, and animals [15]. These proteins are termed antimicrobial because they have an unusually broad spectrum of activity. This may include an ability to kill or neutralize bacteria, fungi, parasites, and even enveloped viruses such as HSV [16]. Although the antibacterial activity of cationic peptides of plants has been extensively studied, little is known about their ability to act as antiviral agents. Furthermore, the mechanism of action of those peptides that exhibit antiviral activity is still poorly understood [17].

Our investigative approach is to discover novel plant-derived natural products as new leads, which could be developed for the treatment of infectious diseases. In the course of screening plants for antiviral proteins, we examined the inhibitory effects of a protein extract of sunflower seeds against HSV-1. Using antiviral-guided fractionation, we isolated and partially characterized an antiviral peptide from seeds of *Helianthus annuus* L.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Antiviral-guided isolation

The 6 kD peptide was isolated from the seeds of *H. annuus* as described previously [15], with some modifications. Seeds were obtained from a local market in Maringá, Brazil. The seeds (200 g) were ground in a coffee mill, and the resulting meal was homogenized in 1 L buffer (10 mM sodium dibasic phosphate, 15 mM sodium monobasic phosphate, 100 mM KCl, and 1.5 % EDTA) for 2 h at 4 °C. The homogenate was squeezed through cheesecloth and clarified by centrifugation (5 min at 7000 g). A protein extract was prepared by addition of a solution of 50 % ethanol/3.3 % trifluoroacetic acid (TFA), followed by stirring for 60 min at 4 °C in order to extract the soluble proteins. The preparation was then centrifuged at 30,000 g for 60 min at 4 °C and the supernatant lyophilized. The dried material was dissolved in 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid buffer (20 mM), and neutralized with 5 M NaOH before final centrifugation at 30,000 g for 30 min at 4 °C; the result was applied to a Shim-pack DIOL-150 (Shimadzu Co., Tokyo, Japan) column (7.9 mm ID x 25 cm) previously equilibrated with 0.2 M sodium sulfate in 0.01 M phosphate buffer, pH 7.0. The column was eluted with the same buffer at a flow rate of 1 mL/min, and the elution was monitored at 280 nm. The fractions with antiviral activity were pooled and loaded onto Shim-pack PA-DEAE-01 (Shimadzu Co., Tokyo, Japan) anion-exchange column (8 mm ID x 5 ml) equilibrated with 14 mM Tris-HCl, pH 8.2 (eluent A). The column was eluted with eluent B (A + 0.5 M sodium chloride) 60-min linear gradient from 0 % to 100 % B, at a flow rate of 1 mL/min. The elution was monitored at 280 nm. The active fraction was collected and applied in a Microsorb MV 100-5 C-18 reversed-phase column (250 mm x 4.6 mm) equilibrated with 0.1 % TFA in water. An elution gradient (0-60 % acetonitrile in 0.1 % TFA in water, from 8 to 20 min) was employed, and the fraction with antiviral activity was collected and rechromatographed under the same conditions until a single antiviral peak appeared during elution. A single peak of antiviral activity was also applied to a column of Shim-pack DIOL, and the molecular weight was estimated using a least-squares plot constructed for a range of proteins of known molecular weight: bovine serum albumin (66 kD), ovalbumin (45 kD), lysozyme (14 kD), trypsin inhibitor (21 kD), and vitamin B12 (1.3 kD).

## 2.2 Cells and virus

African green monkey kidney cells (Vero), used to measure the antiviral activity against HSV-1, were originally purchased from the ATCC. Vero cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle medium [DMEM (Gibco, Grand Island, NY, USA)] supplemented with 10 % fetal calf serum (FCS, Gibco) and 50 µg/mL gentamicin (Gibco).

The HSV-1 was provided by Dr. Rosa Elisa Linhares, Microbiology Department, State University of Londrina. The virus strain was propagated in Vero cells and stored at – 20 °C. The virus titer was determined by plaque assay. The virus titer used in the plaque reduction assay was 60-80 PFU/well.

## 2.3 Cytotoxicity assay and selectivity index (SI)

Vero cells were plated onto 96-well microplates at  $2.5 \times 10^4$  cells per well. After 24 h, the cells were treated with the protein extract, fractions, and peptide at 37 °C in a humidified 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere for 72 h at concentrations ranging from 0.1 to 1000 µg/mL (ratio 1:10). Cell viability was assessed by sulforhodamine B assay [18]. Each experiment was repeated three times, and the concentration (CC<sub>50</sub>) of each compound that inhibited cell growth by 50 % compared to untreated controls was estimated by nonlinear regression of concentration-response curves generated from these data, and the SI was evaluated as the ratio of CC<sub>50</sub> to IC<sub>50</sub>.

## 2.4 Antiviral assays

### 2.4.1. Sulforhodamine B assay - Screening of *in vitro* anti-HSV-1 effect

Vero cells were seeded onto 96-well microplates (Nunc) at  $2.5 \times 10^4$  cells per well. After 24 h, the cells were washed with PBS and infected with TCID<sub>50</sub> /well of HSV-1 at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and treated for 72 h with non-cytotoxic concentrations of protein extract, fractions, and peptide. Next, the culture medium was removed, and the monolayer was fixed with 10 % trichloroacetic acid for 1 h at 4 °C, and subsequently washed 5 times with deionized water. The microplates were left to dry at room temperature for at least 1 h, and then stained for 30 min with 0.4 % sulforhodamine B (SRB) in 1 % acetic acid. Next, the microplates were washed 4 times with 1 % acetic acid. Bound

SRB was solubilized with a 150  $\mu$ L 10 mM unbuffered Tris-base solution, and the plates were left on a plate shaker for at least 15 min. Absorbance was read in a 96-well plate reader at 530 nm. The virus-induced cytopathic effect (CPE) of the test was expressed as a percentage of the optical density in comparison with the parallel virus control and cell control [17]. Each experiment was repeated three times, and the concentration that inhibited 50 % of CPE compared to untreated controls was estimated by nonlinear regression of concentration-response curves generated from these data. Acyclovir (Sigma, St. Louis) was used as a positive control drug.

#### *2.4.2 Plaque reduction assay*

This assay followed the procedures previously described [6] with minor modifications. Acyclovir was used as a positive control. Vero cells were seeded onto 24-well microplates at  $2.5 \times 10^5$  cells per well. After 24 h, the cells were incubated with 60-80 PFU of HSV-1. After 1 h of adsorption at 37 °C, the cells were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) and overlaid with 2X DMEM plus 1.0 % carboxymethylcellulose (CMC) containing different concentrations of protein extract, fractions, or peptide. After 72 h at 37 °C in a humidified 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere, the cells were fixed with 10 % formaldehyde and the overlay medium was removed. Cell monolayers were stained with 0.5 % crystal violet in 20 % ethanol, and the plaques were counted. The inhibitory activity (%) of each test compound was determined by the following formula: (Number of plaques control – Number of plaques experiment) X 100 / (Number of plaques control). Each experiment was repeated three times, and the concentration that inhibited 50 % of plaque formation (IC<sub>50</sub>) compared to untreated controls was estimated by nonlinear regression of concentration-response curves generated from these data.

#### *2.5 Assays for antiviral activity*

##### *2.5.1 Effect of 6 kD peptide and of heparin before virus infection*

Vero cells were seeded onto 24-well microplates at  $2.5 \times 10^5$  cells per well. The next day, the cells were treated with the 6 kD peptide or heparin at 4 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at concentrations ranging from 0.1 to 100  $\mu$ g/mL (ratio 1:10). After 1 h, the cells were washed with PBS and incubated with 60-80 PFU of HSV-1. After 1 h of adsorption at

37 °C the cells were washed three times with PBS and overlaid with 2X DMEM plus 1.0 % CMC. After 72 h at 37 °C in a humidified 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere, the cell monolayers were fixed and stained as described for the plaque reduction assay.

#### *2.5.2 Effect of 6 kD peptide during the infection*

The HSV-1 stock was diluted in pre-chilled medium and mixed with an equal volume of pre-chilled medium containing 0.1, 1, 10, and 100 µg/mL of 6 kD peptide or with medium (control). The mixture in 0.2 ml volumes containing 60-80 PFU of HSV-1 was immediately inoculated into Vero cell cultures at 37 °C. After 1 h adsorption, the inocula were removed from the cultures, followed by three washes with PBS, and overlaid with 2X DMEM plus 1.0 % CMC. After 72 h at 37 °C in a humidified 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere, the cell monolayers were fixed and stained as described for the plaque reduction assay.

#### *2.5.3 Effect of 6 kD peptide on infected cells*

Vero cells were seeded onto 24-well microplates at  $2.5 \times 10^5$  cells per well. After 24 h, the cells were incubated with 60-80 PFU of HSV-1. After 1 h of adsorption at 37 °C, the cells were washed three times with PBS and overlaid with 2X DMEM plus 1.0 % CMC containing (or not) 0.1, 1, 10, or 100 µg/mL of the 6 kD peptide. After 72 h at 37 °C in a humidified 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere, the cell monolayers were fixed and stained as described for the plaque reduction assay.

#### *2.5.4 Direct virucidal effect of 6 kD peptide on HSV-1*

For studying the direct effect of the 6 kD peptide on HSV-1, the viral suspension was pre-incubated with different concentrations of 6 kD peptide or with medium (control). The mixture was incubated at 37 °C. After 1 h, 0.2 mL volumes of the mixture containing 60-80 PFU plus 0.1, 1, 10, or 100 µg/mL of 6 kD peptide or the medium alone were inoculated into Vero cell cultures at 37 °C. After 1 h incubation, the cultures were washed three times with PBS and overlaid with 2X DMEM plus 1.0 % CMC. After 72 h at 37 °C in a humidified 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere, the cell monolayers were fixed and stained as described for the plaque reduction assay.

## 2.6 Penetration assay

The procedures for the virus penetration assay were as described elsewhere [19] with some modifications. The Vero monolayer was grown on a 24-well culture plate and pre-chilled at 4 °C for 1 h. The cell monolayer was then infected with 60-80 PFU HSV-1 and incubated at 4 °C for another 2 h to allow the HSV-1 to attach to the cell monolayer. 5.0 µg/mL of 6 kD peptide was added. The control group contained no 6 kD peptide. The infected cell monolayer was then incubated at 37 °C to maximize the penetration of viruses. At 10 min intervals, the infected cell monolayer was treated with PBS at pH 3 for 1 min to inactivate unpenetrated virus. PBS at pH 11 was then added immediately to neutralize acidic PBS (pH 3). The neutral PBS was removed and the cell monolayer was overlaid with 2X DMEM plus 1.0 % CMC. After 72 h at 37 °C in a humidified 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere, the cell monolayers were fixed and stained as described for the plaque reduction assay.

## 2.7 Combined effect of 6 kD peptide with ACV

To analyze the combined effect of the 6 kD peptide with acyclovir on plaque formation graphically, the IC<sub>50</sub> of these agents in their various concentrations were plotted as an isobologram [20]. Curves falling below the line of additivity indicate synergy, curves on the line indicate an additive reaction and curves above the line indicate an antagonistic reaction.

The combined effect of the 6 kD peptide with ACV was examined for anti-HSV-1 activity in the plaque reduction assay. The Vero monolayer was grown on a 24-well culture plate was infected with 60-80 PFU HSV-1 for 1 h. The cells were washed three times with PBS and overlaid with 2X DMEM plus 1.0 % CMC containing various concentrations of the 6 kD peptide and/or ACV, and then cultured at 37 °C for 3 days. After 3 days, the cell monolayers were fixed and stained as described for the plaque reduction assay. The combined action of the 6 kD peptide with acyclovir was evaluated by constructing an isobologram [8].

## 3 Results

### 3.1. Extraction and isolation of 6 kD peptide of *Helianthus annuus*

The crude acid-soluble protein extract of *H. annuus* seeds was subjected to bioassay-guided fractionation by column chromatographic techniques, where the eluates were

monitored by absorbance determination at 280 nm and assayed for antiviral activity against HSV-1. Upon fractionation by gel filtration on Shim-pack DIOL, the mixture resolved into 3 peaks, with the antiviral activity coeluting with the second peak (Fig. 1A). In the second step, the protein fraction was further separated by anion-exchange chromatography at pH 8.2 on a Shim-pack PA-DEAE-01 anion-exchange column in HPLC. Elution of the column with a linear gradient from 0 to 500 mM sodium chloride yielded 3 distinct peaks, with the antiviral activity coeluting with the second peak (Fig. 1B). In a third step, the protein fraction was further separated by reversed-phase chromatography on a Microsorb MV 100-5 C-18 column. Elution of the column with a gradient of acetonitrile in 0.1 % TFA in water gave 13 distinct peaks, with the antiviral activity coeluting with the seventh peak (Fig. 1C). In the final step, the active fraction was purified by rechromatographing under the same conditions until a single antiviral activity peak appeared during elution (Fig. 1D). This single peak of antiviral activity was then applied to a column of Shim-pack DIOL. On the basis of the chromatographic mobility of the purified antiviral peptide on a molecular exclusion column in HPLC (Fig. 2A), a molecular weight of 6000 D was estimated using a least-squares plot constructed for a range of proteins of known molecular weight (Fig. 2B).

### *3.2. Effect of protein extract, fractions and 6 kD peptide on Vero cells*

Before the antiviral activity of the test samples was assessed, their cellular toxicity was determined. Cytotoxicity was evaluated using the SRB assay and by examining the cell morphology by light microscopy. The data shown in Table 1 demonstrate that the protein extract, fractions, and the 6 kD peptide showed some level of cytotoxic effect on growing Vero cells at high concentrations. They significantly affected 50 % cell viability at a concentration of  $2,250 \pm 3.7$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $2,546 \pm 2.4$   $\mu\text{g/mL}$  and  $3,278 \pm 4.1$   $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The toxic effect, however, gradually diminished as the concentration decreased.

### *3.3. Assessment of anti-HSV-1 activity of protein extract, fractions and 6 kD peptide*

The antiviral activities of the protein extract and fractions against HSV-1 were examined in susceptible cells that were infected with 60-80 PFU/well of HSV-1. After incubating at 37 °C for 1 h, the unadsorbed virus was removed with PBS and incubated with increasing concentration of test compounds. Antiviral activity was determined by plaque reduction assay. The protein extract and fractions gave a dose-dependent response in

inhibiting HSV-1 plaque formation (data not shown). The  $IC_{50}$  values are reported in Table 1. We considered that the protein extract and fractions showed moderate antiviral activity with  $IC_{50}$  of 10 to 50  $\mu\text{g/mL}$ . The F-7 fraction showed strong activity against HSV-1 with  $IC_{50}$  4.8  $\mu\text{g/mL}$ . The cellular toxicity of the peptide showed a  $CC_{50}$  value of 3,278  $\mu\text{g/mL}$ , thus exceeding the  $EC_{50}$  value by 683 times.

#### *3.4. Possible mode of action of 6 kD peptide against HSV-1*

In order to investigate the possible mode of action of the antiviral 6 kD peptide, four different experiments were performed because an antiviral compound could protect cells against virus infection in several ways, by directly inactivating the virus or by interfering with the replication cycle. The 6 kD peptide was tested for its virucidal effect and antiviral activity before, during, and after virus infection by the plaque reduction assay. Pre-incubation of HSV-1 with various concentrations of 6 kD peptide showed dose-dependent at concentrations from 10 to 100  $\mu\text{g/mL}$  (Fig. 3), but the virucidal activity was weak because the  $IC_{50}$  value was 78.6 $\mu\text{g/mL}$ . To determine whether the 6 kD peptide can be internalized into cells or bound to the cellular membrane to exert antiviral effects, confluent Vero cells were incubated with (i) different concentrations of peptide, and then incubated for 1 h and removed before HSV-1 infection; (ii) different concentrations of peptide added together with the virus; or (iii) infected with the HSV-1 for 1 h and then incubated with different concentrations of peptide. When the 6 kD peptide was incubated before, during, and after HSV-1 infections, it showed dose-dependent plaque reduction (Fig. 3). The presence of the 6 kD peptide before and during HSV-1 infections resulted in strong inhibition of plaque formation in treated cultures ( $IC_{50}$  5.3  $\mu\text{g/mL}$  and  $IC_{50}$  4.5  $\mu\text{g/mL}$ , respectively), as compared to after infections ( $IC_{50}$  410  $\mu\text{g/mL}$ ), which was considered inactive (Fig. 3). The results suggested that the 6 kD peptide blocked HSV-1 adsorption to cells and its inhibitory effect was dependent on the dosage levels (Fig. 3).

#### *3.5. Effect of temperature on HSV-1 adsorption*

To investigate the direct effect of the temperature on HSV-1 adsorption, Vero cell monolayers were incubated with 60-80 PFU/well at 4 °C and at 37 °C. After 1 h adsorption, the inocula were removed from the cultures, followed by three washes with PBS and plaques were allowed to form at 37 °C in methylcellulose medium. A dose-dependent inhibition by

the of 6 kD peptide of virus adsorption was observed at 4 °C, and a similar dose-dependent inhibition of virus adsorption was also observed at 37 °C. The 6 kD peptide was equally effective in preventing plaque formation at the two temperatures used for viral adsorption ( $P < 0.05$ ).

### *3.6. Effect of heparin on HSV-1 adsorption*

To determine the effect of heparin on HSV-1 adsorption, Vero cell monolayers were treated with heparin at 4°C in concentrations ranging from 0.1 to 100 µg/mL (ratio 1:10). After 1 h, cells were washed with PBS and incubated with 60-80 PFU of HSV-1. After incubation at 37 °C for 1 h, the unabsorbed viruses were removed with PBS and antiviral activity was determined by the plaque reduction assay. There was a clear difference between the effect of 6 kD peptide and heparin on the formation of plaque. The peptide was more effective than an equal concentration of heparin.

### *3.7. Effect of 6 kD peptide on viral penetration*

HSV-1 entry involves complex ligand-receptor interactions and has been showed to be an ideal target for antiviral compounds [13]. To determine whether the peptide blocks HSV-1 replication at the entry step, the effects on viral penetration were investigated. The 6 kD peptide was shown to inhibit HSV-1 penetration into the Vero cell (Fig. 4). A significant inhibitory effect was noted as early as 20 min after the peptide was added ( $P < 0.05$ ). The percentage of blocking of penetration by 5 µg/mL peptide in the first 20 min was 86.2 %.

### *3.8. Synergism of 6 kD peptide with ACV in anti-HSV-1 activity*

The combined effect of the 6 kD peptide with ACV on plaque formation of HSV-1 in Vero cells was analyzed by an isobologram, and the percentage of plaque formation of each combination was expressed as the representative data from three independent experiments. The data are shown in Fig. 5. The curve fell below the line of additive effect, indicating that the combination of acyclovir and the peptide.

## 4 Discussion

HSV-1 infections are common, because it is transmitted through contact with saliva [12, 21] and causes recurrent facial lesions [22]. Infection with HSV-1 is normally limited [23], but in immunocompromised patients this infection lead to serious complications [23]. The treatment of choice is acyclovir. Some immunocompromised patients with recurrent HSV-1 develop resistance to ACV after repeated treatments [21], and the increasing use of ACV, especially in prophylaxis treatments among transplant patients, has increased concern about an increasing incidence of ACV-resistant infections [12]. The prevalence of resistance in acyclovir-treated immunocompromised individuals is approximately 4-7 % [24]. In the management of ACV-resistant infections, other antivirals drugs with different mechanisms of action may be used. Consequently, plant-derived antiviral are of increasing interest for the development of new, more effective and specific anti-herpes virus agents.

Antimicrobial peptides are plant defensins that are recognized as part of the armament of the plant innate immune system. Several peptide antibiotics, in particular defensins, have also been shown to display *in vitro* antiviral activity [16,24]. The antiviral activity of antimicrobial cationic peptides cecropin A, melittin, and magainin I and II against HSV-1 and HSV-2 was evaluated by Matanic and Castilla (2004). Cecropin A had no exhibit inhibitory effect on the production of HSV-1 and HSV-2 infectious particles, even at a concentration of 40  $\mu\text{M}$ . On the other hand, 3  $\mu\text{M}$  of mellitin showed an inhibitory action against the HSV-1 and HSV-2. Magainin I and II produced a dose-dependent inhibition of HSV-1 and HSV-2. The 2 kD peptide, at a concentration of 12.5  $\mu\text{g/mL}$ , inactivated 80 % of HSV-1. Similar results were observed when the 2 kD peptide was assayed against the bovine herpes virus [15].

In this study, we investigated the presence of antimicrobial peptides in sunflower seeds. The active anti-HSV-1 was isolated from seeds of *Helianthus annuus*, by acid extraction and chromatography methods. The active principle is a peptide with a molecular weight of 6000 D. It is anionic, because was adsorbed in the Shim-pack PA-DEAE-01 anion-exchange instead of several cationic peptides that have shown antiviral activity against HSV [25-27].

The results from the virus pre-treatment experiment suggest that the 6 kD peptide exerts its effect by binding to the viral particles and preventing them from binding and infecting Vero cells. The  $\text{IC}_{50}$  value was 78.6  $\mu\text{g/mL}$ . The 6 kD peptide and heparin are excellent inhibitors of extracellular viral yield, presumably via binding to the virions or by blocking receptors cells. However, the 6 kD peptide is a better inhibitor of extracellular viral yield than

is heparin. In fact, the highest viral inhibition was detected when the 6 kD peptide was added before ( $IC_{50}$  value was 5.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or during ( $IC_{50}$  value was 4.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) viral attachment.

In the pre-treatment of uninfected cells with the 6 kD peptide, the cells were prevented from acquiring the virus infection. Similar results were observed during viral attachment. This suggests that the 6 kD peptide also competes with the receptors-cell system with HSV-1 for the heparan sulphate receptor on the cell surface, since membrane fusion between the enveloped virion and the plasma membrane of the target cell requires glycoproteins. A similar result was found by Ammendolia et al. (2007), where the bovine lactoferrin prevents the entry of HSV-1 into Vero cells.

Attempting to investigate the post-binding stage affected by the 6 kD peptide treatment, we performed a penetration assay. HSV-1 was allowed to attach to the cells at 4 °C; after the temperature was changed to 37 °C to permit virus internalization, the addition of the 6 kD peptide resulted in a reduction of viral infection. In this study, we demonstrate that 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of 6 kD peptide exerts its anti-HSV-1 effect by inhibiting 86 % of viral penetration into Vero cells after 20 minutes of incubation. Therefore, it appears that the 6 kD peptide can block these two early steps in the HSV infection cycle.

Plant extracts contain many chemicals, and some of these compounds could be acting synergistically. Sometimes, isolation of the compounds from the extract may cause a decrease in the desired activity, underlining the importance of screening extracts. In an isobologram analysis, the combined effect of the 6 kD peptide with ACV in Vero cells, enhanced the anti-HSV-1 activity of the ACV synergistically. The  $IC_{50}$  for ACV and the 6 kD peptide, when combined with ACV was by two-to threefold higher compared to the  $IC_{50}$  when the drugs were used alone. Thus, the mode of anti-HSV-1 action of the 6 kD peptide was different from that of ACV. The combined application of the 6 kD peptide with ACV had a synergistic activity, and should delay the development of drug (ACV) resistance. The simultaneous application of antiviral compounds may allow the use of smaller doses and reduce any cytotoxic effects of the drugs.

In summary, we have isolated an anionic peptide from the seeds of *Helianthus annuus* that exhibits strong activity against HSV-1. To the best of our knowledge, this is the first report of the isolation of an anionic 6 kD peptide with anti-HSV activity from this plant. Our results suggest that this peptide may be a potential anti-HSV drug candidate.

## Acknowledgements

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Capacitação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, (Capes), Fundação Araucária, and Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina.

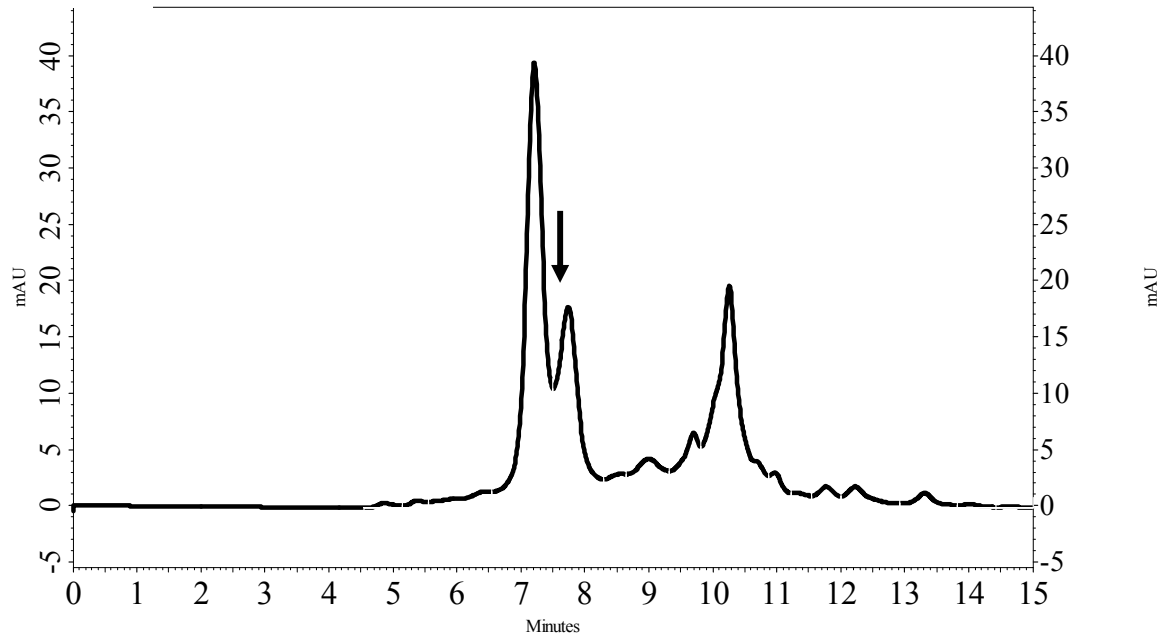
## References

- [1] M. Mukhtar, M. Arshad, M. Ahmad, R. J. Pomerantz, B. Wigdahl, Z. Parveen, Antiviral potentials of medicinal plants, *Virus Research*. 131 (2008) 111-120.
- [2] M. R. Schleiss, Persistent and Recurring Viral Infections: The Human Herpesviruses, *Current Problems Pediatric Adolescent Health Care*. (2009) 7-21.
- [3] S. Sakdarat, A. Shuyprom, C. Pientong, T. Ekalaksananan, S. Thongchai, Bioactive constituents from the leaves of *Clinacanthus nutans* Lindau, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*.17 (2008) 1857-1860.
- [4] R. J. Whitley, B. Roizman, Herpes simplex virus infections, *The Lancet*. 357 (2001) 1514-1518.
- [5] T. H. Bacon, M. J. Levin, J.J. Leary, R.T. Sarisk, D. Sutton, Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy, *Clinical Microbiology Reviews*. 16 (2008) 114-128.
- [6] H.Y. Cheng, T.C. Lin, C.M. Yang, K.C. Wang, C.C. Lin, Mechanism of action of the suppression of herpes simplex virus type 2 replication by pterocarnin A. *Microbes Infection*. 6 (2004) 738-744.
- [7] Y. Zhang, P. P. But, V. E. Ooi, H. XU, G. D. Delaney, S. H. S. Lee, F. L. Song, Chemical properties, mode of action, and in vivo anti-herpes activities of a lignin-carbohydrate complex from *Prunella vulgaris*. *Antiviral Research*. 75 (2007) 242-249.
- [8] 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. *Antiviral Research*. 80 (2008) 62-70.
- [9] D. Sharma, B. Narasimhan, P. Kumar, V. Judge, R. Narang, E. De Clerq, J. Balzarini, Synthesis, antimicrobial and antiviral evaluation of substituted imidazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 44 (2009) 2347-2353.
- [10] H.Y. Cheng, H. H. Huang, C. M. Yang, L. T. Lin, C. C. Lin, The in vitro anti-herpes simplex type-2 activity of long dan xie gan tan, a prescription of traditional chinese medicine, *Chemotherapy*. 54 (2008) 77-83.

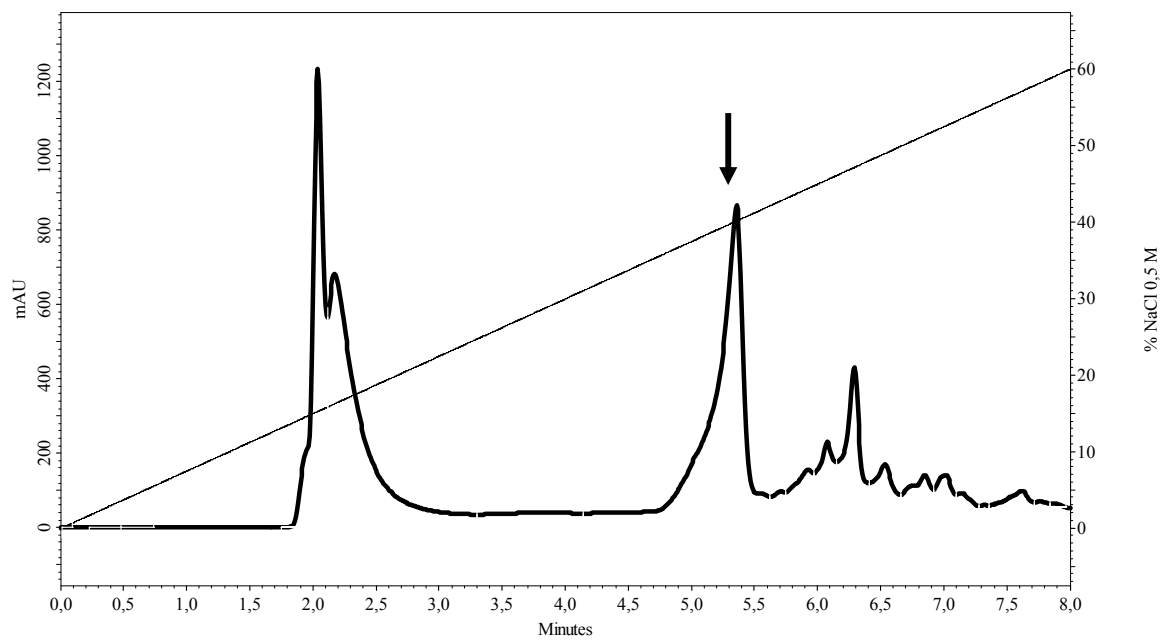
- [11] H.Y. Cheng, L. T. Lin, C. M. Yang, D. E. Shieh, C. C. Lin, *ent*-Epiafzelechin-(4 $\mu$ →8)-epiafzelechin extracted from *Cassia javanica* inhibits herpes simplex virus type 2 replication, *Journal Medical Microbiology*. 55 (2006) 201-206.
- [12] F. Morfin, D. Thouvenot, Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs, *Journal of Clinical Virology*. 23 (2003) 29-37.
- [13] C. T. Su, J. T. A. Hsu, H. P. Hsieh, P. H. Lin, T. C. Chen, C. L. Kao, C. N. Lee, S. Y. Chang, Anti-HSV activity of digitoxin and its possible mechanisms, *Antiviral Research*. 79 (2008) 62-70.
- [14] I. Zelezetsky, U. Pag, N. Antcheva, H. G. Sahl, A. Tossi, Identification and optimization of an antimicrobial peptide from the ant venom toxin pilosulin, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 434 (2005) 358-364.
- [15] I. Camargo Filho, D. A. G. Cortez, T. Ueda- Nakamura, C. V. Nakamura, B. P. Dias Filho, Antiviral activity and mode of action of a peptide isolated from *Sorghum bicolor*, *Phytomedicine*. 15 (2008) 202-208.
- [16] V. C. A. Matanic, V. Castilla, Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against Junin virus and herpes simplex virus, *Antimicrobial Agents*. 23 (2004) 382-389.
- [17] K. T. Paparazis, G. D. Geromichalos, K. A. Dimitriadis, A. H. Kortasaris, Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay, *Journal of Immunological Methods*. 208 (1997) 151-158.
- [18] P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, D. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, M. R. Boyd, New colorimetric cytotoxicity assay for anti-cancer-drug screening, *Journal of the National Cancer Institute*. 82 (1990) 1107-1112.
- [19] K. S. Rosenthal, R. Perez, C. Hodnichak, Inhibition of herpes simplex virus type 2 penetration by cytochalasins B and D, *Journal General Virology*. 66 (1985) 1601-1605.
- [20] M. Kurokawa, K. Nagasaka, T. Hirabayashi, S. Uyama, H. Sato, T. Kageyama, S. Kadota, H. Ohyama, T. Hozumi, T. Namba, T. Shiraki, Efficacy of traditional herbal medicines in combination with acyclovir against herpes simplex virus type 1 infection in vitro and in vivo, *Antiviral Research*. 27 (1995) 19-37.
- [21] P. Schnitzler, A. Schuhmacher, A. Astani, J. Reichling, *Melissa officinalis* oil affects infectivity of enveloped herpesviruses, *Phytomedicine*. 15 (2008) 734-740.
- [22] H. Jessen, J. H. Andersen, D. Mantzilas, T. J. Gutteberg, A wide range of medium-sized, highly cationic,  $\alpha$ -helical peptides show antiviral activity against herpes simplex virus, *Antiviral Research*. 64 (2004) 119-126.
- [23] M. G. Ammendolia, M. Marchetti, F. Superti, Bovine lactoferrin prevents the entry and intercellular spread of herpes simplex virus type 1 in Green Monkey Kidney cells, *Antiviral Research*. 76 (2007) 252-262.
- [24] A. Bastian, H. Schafer, human alpha-defensin 1 HNP-1 inhibits adenoviral infection, *Regulation Peptides*. 101 (2001) 157-161.
- [25] M. Egal, M. Conrad, D. L. McDonald, W.L. Maloy, M. Motley, C. A. Genco, Antiviral effects of synthetic membrane-active peptides on herpes simplex virus, type 1, *International Journal of Antimicrobial Agents*. 13 (1999) 57-60.

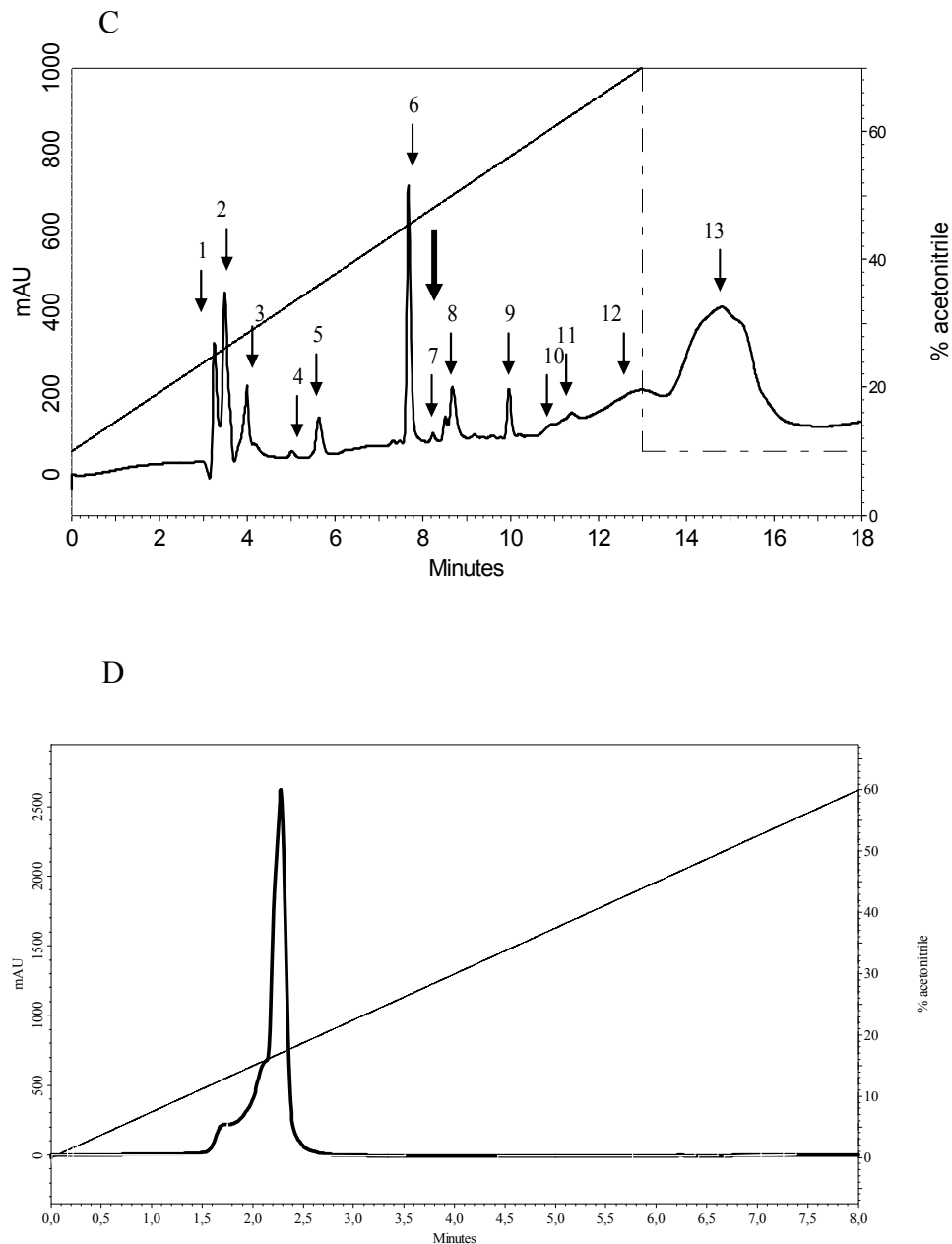
- [26] A. Belaid, M. Aouni, R. Khelifa, A. Trabelsi, M. Jemmali, K. Hani, In vitro antiviral activity of dermaseptins against herpes simplex virus type 1, *Journal Medical Virology*. 66 (2002) 229-234.
- [27] S. Sinha, N. Cheshenko, R. I. Lehrer, B. C. Herold, NP-1, a rabbit alpha-defensin, prevents the entry and intercellular spread of herpes simplex virus type 2, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 47 (2003) 19-23.

A

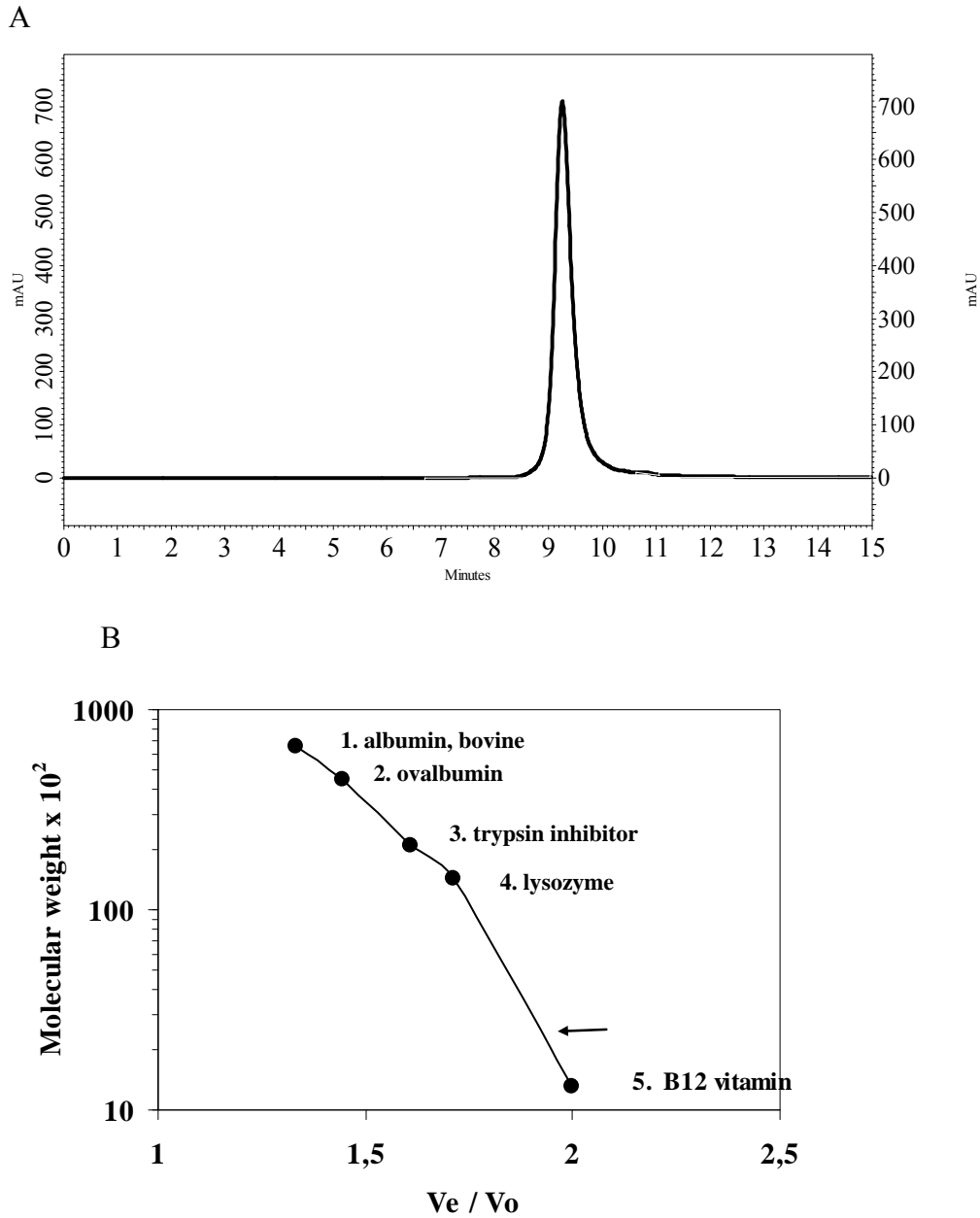


B





**Fig. 1.** Purification of the antiviral peptide from sunflower seeds. (A) *HPLC gel filtration on Shim-pack DIOL*. The protein extract was applied to a Shim-pack DIOL column, previously equilibrated with 0.2 M sodium sulfate in 0.01 M phosphate buffer, pH 7.0, and eluted with the same buffer at a flow rate of 1 ml/min. (B) *HPLC ion-exchange resin PA-DEAE*. The antiviral fraction from gel filtration was loaded onto a Shim-pack PA-DEAE-01 anion-exchange column equilibrated with eluent A (14 mM Tris-HCl, pH 8.2). The column was eluted with eluent B (A + 0.5 M sodium chloride) in a 60-min linear gradient from 0 % to 100 % B, at a flow rate of 1 ml/min. (C) *HPLC on reversed-phase resin Microsorb C-18*. The fraction with antiviral activity was applied in a reversed-phase column Microsorb-MV 100-5 C-18 (250 x 4.6) equilibrated with 0.1 % TFA in water. An elution gradient of acetonitrile in 0.1% TFA in water was employed to elute the protein. (D) The antiviral fraction was rechromatographed under the same conditions until a single antiviral peak appeared during elution. Data correspond to one representative experiment performed of three.



**Fig. 2.** Estimation of the molecular weight of the 6 kD peptide. On the basis of the chromatographic mobility of the purified antiviral peptide on the molecular exclusion column in HPLC (A), a molecular weight of 6000 was estimated using a least-square plot constructed for a range of proteins of known molecular weight (B). Data correspond to one representative experiment performed of three.

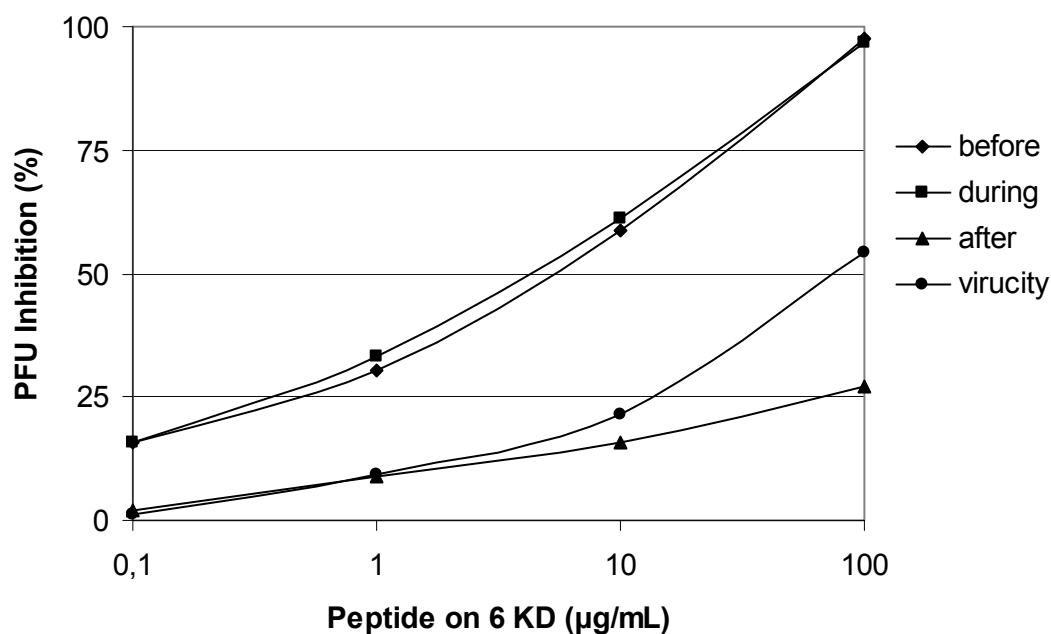
**Table 1** - Antiviral activities of the acid-soluble protein extract, fractions, and 6 kD peptide on herpes simplex virus HSV-1 by inhibition of plaque reduction assay.

Purification step	IC <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>a</sup>	CC <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>b</sup>	SI <sup>c</sup>
Acid-soluble protein extract	21.5 ± 1.2	2250 ± 3.7	104.6
DEAE HPLC	15.9 ± 1.6	2546 ± 8.4	160.1
C <sub>18</sub> HPLC	4.8 ± 2.5	3278 ± 4.1	682.9

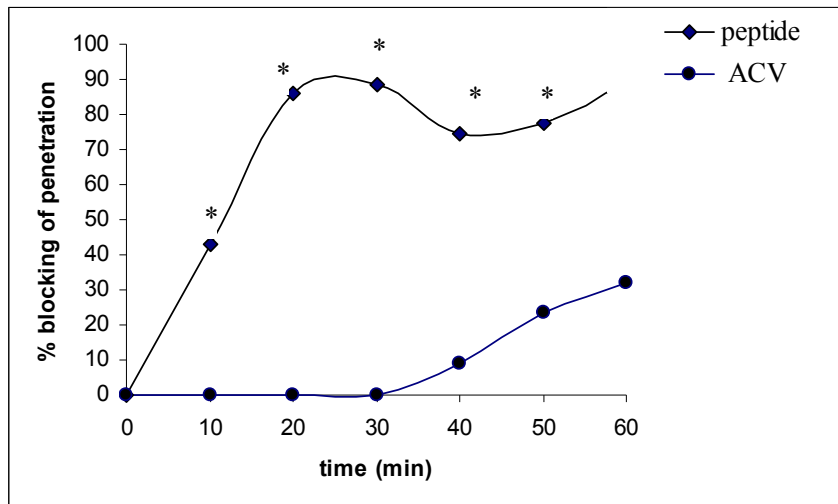
<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> (50% inhibition concentration, defined as a drug concentration that induced 50% inhibition of HSV-1, as compared to the untreated culture)

<sup>b</sup> CC<sub>50</sub> (50% cytotoxic concentration, defined as a drug concentration that induced 50% inhibition of Vero cells, as compared to the untreated culture)

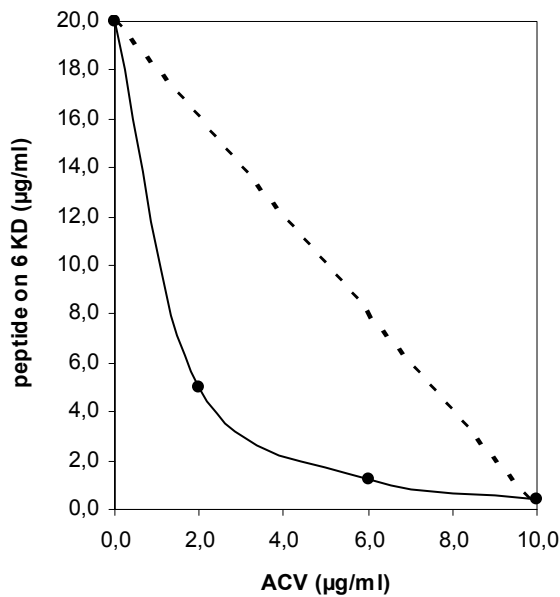
<sup>c</sup> SI = selectivity index, determined by the ratio of CC<sub>50</sub> to IC<sub>50</sub>.



**Fig. 3.** Mechanism of the 6 kD peptide antiviral activity in vitro against HSV-1. Determined by pre-treatment of Vero cells with 6 kD peptide (before); pre-mixing virus with different concentrations of 6 kD peptide (during), treatment of virus-infected cells with 6 kD peptide (after), and pre-incubation of viral suspension with different concentrations of 6 kD peptide (virucidal). The antiviral effect was determined by plaque reduction. The results represent mean values for at least three separate experiments.



**Fig. 4.** Effect of 6 kD peptide and ACV on the penetration of HSV-1 by plaque reduction. The Vero monolayer was pre-chilled at 4 °C for 1 h and then infected with 60-80 PFU/well at 4 °C for 2 h. After 2 h incubation, 5 µg/ml 6 kD peptide was added. At intervals, the extracellular virus was inactivated by PBS for 1 min. PBS at pH 11 was then added to neutralize acidic PBS. The neutral PBS was removed on overlay medium was added. Each point represents the mean for three independent experiments. The asterisk (\*) indicates a significant difference between the test sample and the control solvent ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 5.** Combination of the 6 kD peptide and acyclovir on wild-type HSV-1 plaque formation analyzed by isobologram. The figure shows representative data from three independent experiments. The dotted lines indicated the theoretical additive activity. The measured line was significantly lower than the dotted line ( $P < 0.005$ ) by the paired  $t$ -test, indicating synergy.