



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LÍGIA CARLA FACCIN GALHARDI

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE POLISSACARÍDEOS ISOLADOS  
DE *Azadirachta indica* NA INFECÇÃO POR POLIOVÍRUS E  
HERPESVÍRUS, *IN VITRO*.**

LÍGIA CARLA FACCIN GALHARDI

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE POLISSACARÍDEOS ISOLADOS  
DE *Azadirachta indica* NA INFECÇÃO POR POLIOVÍRUS E  
HERPESVÍRUS, *IN VITRO*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Carlos Nozawa

Londrina  
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

G155a Galhardi, Lígia Carla Faccin.  
Atividade antiviral de polissacarídeos isolados de *Azadirachta indica*  
na infecção por poliovírus e herpesvírus, *in vitro* / Lígia Carla Faccin  
Galhardi. – Londrina, 2013.  
123 f. : il.

Orientador: Carlos Nozawa.  
Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina,  
Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2013.  
Inclui bibliografia.

1. Poliovírus – Teses. 2. Vírus do herpes – Teses. 3. Polissacarídeos –  
Teses. 4. Agentes antivirais – Teses. 5. *Azadirachta indica* – Teses. I. Nozawa,  
Carlos. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas.  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 578.7

LÍGIA CARLA FACCIN GALHARDI

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE POLISSACARÍDEOS ISOLADOS DE  
*Azadirachta indica* NA INFECÇÃO POR POLIOVÍRUS E  
HERPESVÍRUS, *IN VITRO*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa. Dra. Juliana G. Castilho Kawai  
Instituto Pasteur

---

Profa. Dra. Maria Angélica E. Watanabe  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Rosa Elisa Carvalho Linhares  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Sergio Paulo Dejato da Rocha  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 19 de fevereiro de 2013.

Ao Fabio e Manuela Galhardi

“O amor é assim: é a paz de Deus em sua  
casa”

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, amando e acreditando sempre que minhas conquistas não devem-se apenas as minhas lutas, mas na fé e bênçãos recebidas.

A minha família, e especialmente ao Fabio e Manuela, pela paciência infinita, compreensão nos momentos de ausência e contínuo apoio nestes anos. A colaboração e crença absoluta na capacidade de realização a mim atribuída foram, indubitavelmente, os elementos propulsores desta tese.

Aos professores Carlos Nozawa e Rosa Elisa C. Linhares, pela amizade, confiança e oportunidade de trabalhar em seu laboratório. Meus sinceros agradecimentos pelos ensinamentos e orientações constantes em minha capacitação acadêmica, científica e profissional.

Aos colegas e amigos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste doutorado, e em especial aos que participaram efetivamente desta tese e são listados como colaboradores nos artigos científicos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Microbiologia, pelos ensinamentos transmitidos e contribuição em minha formação acadêmica.

Aos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia, pela amizade, colaboração e disposição no suporte técnico-científico.

Aos membros da banca, Dra. Juliana G. Castilho Kawai, Dra. Maria Angélica E. Watanabe, Dra. Rosa Elisa C. Linhares e Dr. Sergio Paulo Dejato da Rocha, pela disponibilidade na participação e pelas sugestões para a conclusão da tese.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela bolsa concedida durante os anos do curso. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Araucária e Coordenadoria de Pesquisa e Pós-graduação da UEL pelo apoio financeiro.

"Sonhe com aquilo que você quer ser,  
porque você possui apenas uma vida  
e nela só se tem uma chance  
de fazer aquilo que quer.

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.  
Dificuldades para fazê-la forte.  
Tristeza para fazê-la humana.  
E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes não tem as melhores  
coisas.  
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades  
que aparecem em seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram.  
Para aqueles que se machucam.  
Para aqueles que buscam e tentam sempre.  
E para aqueles que reconhecem a importância  
das pessoas que passaram por suas vidas."

**Clarice Lispector (O sonho)**

GALHARDI, Lígia Carla Faccin. **Atividade antiviral de polissacarídeos isolados de *Azadirachta indica* na infecção por Poliovírus e Herpesvírus, *in vitro***. 2013. 123f. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

## RESUMO

O poliovírus (PV), agente etiológico da poliomielite, é um vírus não envelopado com genoma de RNA fita-simples, positiva. Atualmente, a doença está controlada na maior parte dos países, mas, ainda é endêmica na África e Ásia. Os herpesvírus são vírus envelopados, com DNA de fita-dupla e possuem uma ampla gama de hospedeiros, além de causarem infecções persistentes com possíveis reativações. O herpesvírus bovino-1 (BoHV-1) produz diversas infecções, como, rinotraqueíte, vulvovaginite, balanopostite e infecções sistêmicas fatais. O vírus herpes simplex-1 (HSV-1) ocasiona infecções em humanos, normalmente, benignas, porém, em indivíduos imunocomprometidos pode levar a infecção generalizada, encefalite e ceratoconjuntivite. Além da importância médica e animal, esses agentes são modelos de vírus de RNA e DNA, para diversos estudos *in vitro*. A *Azadirachta indica* (nim) tem sido amplamente utilizada etnofarmacologicamente para o tratamento de diversas doenças, entre elas as infecções virais, sendo algumas com base científica. Neste trabalho avaliamos a atividade antiviral dos polissacarídeos (P1 e P2) e seus derivados químicos sulfatados (P1S e P2S), obtidos de *A. indica*, na infecção por PV, BoHV-1 e HSV-1, em células HEp-2. A citotoxicidade foi avaliada pelo MTT, a atividade antiviral pelo ensaio de redução de plaques (PRA) e a inibição da síntese proteica viral pela reação de imunofluorescência (IF). A reação em cadeia de polimerase (PCR) foi aplicada para estudar a inibição da síntese do DNA na replicação do HSV-1. Demonstramos que P1 e P1S inibiram a replicação do BoHV-1, com concentração inibitória 50% (CI<sub>50</sub>)/índice de seletividade (IS) de 105,2µg/ml/3,6 e 32,1µg/ml/>51,4, respectivamente, sendo P1S mais efetivo que P1. P1 e P1S demonstraram inibição dose-dependente na síntese proteica. A maior inibição foi encontrada quando os compostos foram adicionados simultaneamente a infecção (tempo 0h). Os compostos testados exibiram efeito antiviral contra o PV, com CI<sub>50</sub> de 80µg/ml (P1), 37,5µg/ml (P1S), 77,5µg/ml (P2) e 12,1µg/ml (P2S) e IS variando de 18-131,9, demonstrando também, melhor efeito inibitório no tempo 0h. Quando testados contra HSV-1, P1S e P2S também exibiram melhor atividade antiviral no tempo 0h, com CI<sub>50</sub>/IS de 31,1µg/ml/> 51,4 e 80,5µg/ml/>19,8, respectivamente. Os compostos apresentaram pequeno efeito profilático, cerca de 20%. O P1S demonstrou melhor efeito inibitório de 91,8% em comparação com P1 (50%), P2 (71,1%) e P2S (70%) em 200µg/ml. A inibição da síntese proteica foi dose-dependente, em concordância com os resultados de PRA. Os polissacarídeos inibiram a síntese de DNA do HSV-1 em todas as concentrações testadas no PRA, para P1 e P1S, e até 50µg/ml, para P2 e P2S. Neste caso, os grupos sulfatos de P1S e P2S não alteraram o efeito inibitório dos polissacarídeos originais. Portanto, os nossos resultados demonstraram a atividade antiviral dos polissacarídeos de *A. indica* contra PV, BoHV-1 e HSV-1 com ação nas fases iniciais da replicação, além da inibição da síntese proteica viral e ação virucida. A inibição em etapas diferentes da infecção viral representa uma vantagem em relação aos antivirais convencionais que, normalmente, atuam em uma única etapa, com menor probabilidade de

selecionar mutantes resistentes, além da inocuidade e de outros benefícios relatados.

**Palavras-chave:** Poliovírus. Herpesvírus. Polissacarídeos. *Azadirachta indica*.  
Antiviral.

GALHARDI, Lígia Carla Faccin. **Antiviral activity of polysaccharides from *Azadirachta indica* against Poliovirus and Herpesvirus infection, *in vitro***. 2013. 123p. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

## ABSTRACT

Poliovirus (PV), etiological agent of poliomyelitis, is a non-enveloped and positive single-stranded RNA virus. The disease is under control in most part of the world, but, remains endemic in some countries in Africa and Asia. The herpesvirus is an enveloped and double-stranded DNA virus, and has a broad host range and establishes persistent infections in neurons ganglia. Bovine herpesvirus-1 (BoHV-1) is the causal agent of various infections, such as, rhinotracheitis, vulvovaginitis, balanoposthitis, and fatal systemic infections. The herpes simplex virus (HSV) usually causes benign infections in humans, but, can be serious in immunocompromised leading to generalized infections, encephalitis and keroconjunctivitis. Besides the animal and medical importance, these agents are used as models of RNA and DNA virus for many *in vitro* studies. The *Azadirachta indica* (nim) has been widely used in Indian ayurvedic and homeopathic medicine for treatment of several diseases, including viral infections. We evaluated the antiviral activity of *A. indica* polysaccharides (P1 and P2) and their chemical sulfated derivatives (P1S and P2S), in PV, BoHV-1 and HSV-1 infection, in HEp-2 cells. The cytotoxicity of the compounds was evaluated by MTT and the antiviral activity was determined by the plaques reduction assay (PRA). The inhibition of viral protein synthesis was conducted by immunofluorescence (IF). The polymerase chain reaction (PCR) used to evaluate the inhibition of DNA synthesis in HSV-1 replication. P1 and P1S inhibited the replication of BoHV-1, with following inhibitory concentration 50% ( $IC_{50}$ )/selectivity index (SI),  $105.2 \mu\text{gml}^{-1}/3.6$  and  $32.1 \mu\text{gml}^{-1}/>51.4$ , respectively, and P1S was more effective than P1. P1 and P1S presented a dose-dependent inhibition in protein synthesis. The greatest inhibition was found when the compounds were added simultaneously with infection (time 0h). The compounds also exhibited effect against PV, with  $IC_{50}$  of  $80 \mu\text{g/ml}$  (P1),  $37.5 \mu\text{g/ml}$  (P1S),  $77.5 \mu\text{g/ml}$  (P2) and  $12.1 \mu\text{g/ml}$  (P2S) and SI ranged of 18 to 131.9, showing also better inhibitory effect at the time 0h. For HSV-1, P1S and P2S showed effect, with better results also at the time 0h and  $IC_{50}/SI$  of  $31.1 \mu\text{gml}^{-1}/>51.4$  and  $80.5 \mu\text{gml}^{-1}/>19.8$ , respectively. The compounds demonstrated low prophylactic effect, about 20%. P1S presented better inhibitory effect, 91.8% compared to P1 (50%), P2 (71.1%) and P2S (70%), at  $200 \mu\text{g/ml}$ . Inhibition of protein synthesis was dose-dependent, corroborating with the results of PRA. The polysaccharides inhibited the HSV-1 DNA synthesis at all tested concentrations in PRA, for P1 and P1S, and up to  $50 \mu\text{g/ml}$  for P2 and P2S. In this case, sulfated derivatives (P1S and P2S) did not differ their inhibitory effect in comparison to original polysaccharides. Therefore, our results demonstrated *A. indica* polysaccharides were active for PV, BoHV-1 and HSV-1 replication, suggesting effect at early stages of replication, however, virucidal effect and inhibition of viral protein were also shown. The action at several stages of viral infection represents an advantage over the one-step effect of conventional drugs by the less possibility to select resistant mutants. Moreover, the use of natural products can represent lower toxicity, beyond other benefic features.

**Key words:** Poliovirus. Herpesvirus. Polysaccharides. *Azadirachta indica*. Antiviral.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	– Distribuição global do poliovírus em 1988 e em 2012.....	17
<b>Figura 2</b>	– Eletromicrografia do poliovírus.....	19
<b>Figura 3</b>	– Estrutura de um picornavírus típico.....	20
<b>Figura 4</b>	– Organização e expressão do genoma dos picornavírus .....	23
<b>Figura 5</b>	– Bloqueio da tradução e início da replicação do genoma do poliovírus.....	23
<b>Figura 6</b>	– Modelo de replicação do RNA do poliovírus .....	25
<b>Figura 7</b>	– Visão geral do ciclo de infecção dos picornavirus.....	26
<b>Figura 8</b>	– Estrutura e eletromicrografia do vírus Herpes Simplex .....	32
<b>Figura 9</b>	– Fusão do HSV com a membrana celular.....	35
<b>Figura 10</b>	– Ativação da expressão de genes IE.....	36
<b>Figura 11</b>	– Mecanismo de replicação círculo rolante .....	37
<b>Figura 12</b>	– Montagem do capsídeo e empacotamento do genoma do HSV .....	38
<b>Figura 13</b>	– Esquema representativo da formação do envelope por duplo envelopamento e liberação das partículas virais do HSV da célula hospedeira .....	39
<b>Figura 14</b>	– Estrutura química de polissacarídeos (Gla, GIIa e GIIIa) isolados do extrato aquoso da casca de <i>Melia azadirachta</i> .....	53
<b>Figura 15</b>	– <i>Azadirachta indica</i> : Árvore (1) e seus produtos (2). A - galhos, B - folhas, C - frutos, D - semente com endocarpo, E - semente sem endocarpo .....	55
<b>Figura 16</b>	– Estruturas químicas de compostos isolados de <i>Azadirachta indica</i> .....	56

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>POLIOVÍRUS</b> .....	17
2.1	PROPRIEDADES GERAIS .....	19
2.2	REPLICAÇÃO DOS POLIOVÍRUS .....	21
2.3	PATOGENIA DO POLIOVÍRUS.....	26
2.4	POLIOVÍRUS SELVAGEM E VACINAL .....	27
2.5	TRATAMENTO.....	29
<b>3</b>	<b>HERPESVÍRUS</b> .....	31
3.1	PROPRIEDADES GERAIS DA FAMÍLIA <i>Alphaherpesvirinae</i> .....	32
3.2	REPLICAÇÃO DOS HERPESVÍRUS .....	34
3.3	VÍRUS HERPES SIMPLEX 1 E 2 .....	39
3.4	HERPESVÍRUS BOVINO .....	42
3.5	LATÊNCIA.....	43
<b>4</b>	<b>ANTIVIRAIS</b> .....	47
4.1	PRODUTOS NATURAIS .....	49
4.2	PRODUTOS NATURAIS COM ATIVIDADE ANTIVIRAL.....	50
4.3	<i>AZADIRACHTA INDICA</i> .....	54
	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	58
	<b>OBJETIVOS</b> .....	59
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	60
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	61
	<b>ANEXOS</b> .....	83

ANEXO A – Water-extracted polysaccharides from <i>Azadirachta indica</i> leaves: structural features, chemical modification and anti-bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) activity .....	84
ANEXO B – The <i>in vitro</i> antiviral property of <i>Azadirachta indica</i> polysaccharides for poliovirus .....	91
ANEXO C – Antiherpetic activity of the <i>Azadirachta indica</i> sulfated polysaccharides .....	97

## 1 INTRODUÇÃO

As evidências sobre a existência de infecções virais surgiram desde os primeiros registros da atividade humana. A prática de domesticação de animais e a ocupação de terras tornaram frequentes os contatos intra e interespecies, incluindo o homem, permitindo que diversos tipos de patógenos, entre eles os vírus, fossem transmitidos e mantidos nas populações. Conseqüentemente, os vírus – apesar do desconhecimento da existência do agente, que ocasionavam doenças mais benignas e com a manutenção no hospedeiro, foram os primeiros a se adaptar no início das civilizações, tais como o papilomavírus, herpesvírus e retrovírus. Por outro lado, os vírus extremamente patogênicos, como o da varíola, gripe, sarampo ocasionavam epidemias que dizimavam as comunidades não imunes, não permanecendo viáveis por muito tempo.

Os primeiros registros das doenças virais encontram-se nas civilizações egípcias e greco-romanas e datam, aproximadamente, do ano de 1500 a.C. Há esculturas do antigo Egito que retratam indivíduos com deformidade anatômica (aparentemente paralisia flácida, com evidência de atrofia do membro inferior) relacionada a sequela supostamente da infecção pelo vírus da poliomielite. A mumificação do faraó Ramsés V que permitiu a observação das lesões (pústulas/crostas) na face, como sequela da varíola. A existência de leis que responsabilizavam os donos de animais domésticos, caso esses animais ficassem raivosos, na Mesopotâmia. A lenda do navio-fantasma, O Holandês Voador, na qual barcos comerciais eram encontrados à deriva, com toda a tripulação morta, pode estar relacionada com a disseminação do vírus da Febre Amarela, a partir de sua descoberta, na África, pelos europeus (FERREIRA et al., 2008).

Epidemias históricas, como a da varíola foram mencionadas desde 1100 a.C., na China, com o nome de “tai-tu” (HORWITZ, 1968) e nos anos de 312, em Roma e 675, na Irlanda, e, posteriormente, na Espanha. Em 710 atingiu a Europa, através das batalhas das cruzadas e migrações populacionais, com proporção de praga, durante o século XVIII. Foi introduzida nas Américas em 1519, tendo sido, supostamente, um dos fatores da queda dos impérios Asteca e Inca. A doença começou a ser controlada, a partir do desenvolvimento da vacina antivariólica por Edward Jenner, em fins do século XVIII, embora, com o mesmo intuito, na antiga China, a prática da variolização (emprego do próprio vírus da

variola) já era conhecida. O último caso natural relatado da doença foi em 26 de outubro de 1977, tendo sido, posteriormente, considerada erradicada pela OMS. Desde a década de 80, o estoque do vírus da variola existente em vários laboratórios do mundo foi destruído, mantendo-se amostras do vírus apenas em dois laboratórios, nos Estados Unidos e na Rússia (FERREIRA et al., 2008).

O sarampo, historicamente, sempre foi considerado a maior causa de óbitos em crianças, no mundo. No entanto, embora haja algumas referências à enfermidade nos séculos VI e VII da era cristã, a doença só foi descrita no século X, por Rhazes, médico e filósofo persa. Nenhuma descrição da doença foi encontrada nos relatos de Hipócrates ou outros autores da era pré-cristã. Isso ocorreu, provavelmente, devido ao padrão epidemiológico da doença, que não possui reservatório animal, e nem induz infecções latentes. Assim, acredita-se que o vírus do sarampo se estabeleceu na população há 5000 anos, aproximadamente, quando as populações do Oriente Médio atingiram densidade suficiente para a manutenção da transmissão do vírus, dada a necessidade de uma população de milhões de novos indivíduos susceptíveis, para manter a circulação do vírus, o que não ocorria naquela época (SANTOS; WIGG; OLIVEIRA, 2008). Até o ano 2000, estimou-se a morte de 535.000 crianças no mundo devido à doença, e, atualmente, apesar da existência de vacina eficaz, desenvolvida há mais de 30 anos, há casos notificados na África, sudeste Asiático, Europa, Mediterrâneo e região Ocidental do Pacífico, com 30.625 casos em 2010 (WHO, 2012). Na Europa, apenas no primeiro semestre de 2012, dos 1.339 casos suspeitos, 359 (27%) foram confirmados como sendo de infecção por sarampo, destes, apenas 12 possuíam o esquema de vacinação completo (VIVANCOS et al., 2012). Nas Américas foram notificados 1.067 casos em 2011 (WHO, 2012).

A caxumba também é uma doença conhecida desde o século V a.C., quando Hipócrates descreveu-a pela primeira vez como uma doença epidêmica, caracterizada por tumefação não supurativa próxima ao ouvido, podendo também comprometer as glândulas sexuais (SANTOS; WIGG; OLIVEIRA, 2008). Embora a infecção seja mais comum na infância, o vírus também pode afetar adultos que podem apresentar complicações, como a meningite, orquite ou ooforite. A imunidade após a infecção natural ou por vacinação é sólida, no entanto, a possibilidade de re-infecção vem sendo considerada um problema de saúde pública mundial (SANTOS et al., 2008). Há muitos casos reportados de caxumba em populações vacinadas

(BRISS et al., 1994; CHEEK et al., 1995; HERS et al., 1991; HIDALGO, 2002) tendo sido atribuídos a falhas da vacina (SANTOS et al., 2008). De acordo com WHO (2012), em 2011, apenas nas Américas, foram reportados 31.229 casos de caxumba.

Os surtos de Influenza, na Grécia antiga, foram relatados por Hipócrates e Livy, no ano de 412 a.C. A presença do vírus também é relatada durante a Guerra do Peloponeso em Atenas, 430 a.C., e durante a Guerra dos Cem Dias. Há ainda vários relatos de epidemias e pandemias que ocorreram desde o século XVI e que continuam a ocorrer até os dias atuais. De 1876 até o presente, ocorreram pandemias em 1889, 1918, 1957, 1968, 1977 e 2009. Na pandemia de 1918, ocorreram cerca de 675.000 mortes nos Estados Unidos e cerca de 50 milhões no mundo. A pandemia de 2009 iniciou no México e disseminou para outros países, ocasionando a morte de 16.813 pessoas, no mundo, até março de 2010 (TAUBENBERGER; MORENS, 2010).

Nas décadas de 40 e 50, após inúmeras campanhas de controle do vetor da dengue, *Aedes aegypti*, foi possível controlar a doença nas Américas, porém, essas medidas não foram seguidas pelos países do Caribe, Guianas e Equador. No Brasil, a doença foi reintroduzida, a partir da década de 70, na cidade de Salvador e, nos anos de 1997 e 1998, a dengue já estava presente em todos os Estados brasileiros (GUBLER, 2002). De acordo com Halstead (2007) estimava-se que 2 a 5 bilhões de pessoas, residentes nos países tropicais e sub-tropicais, seriam infectadas com o vírus e cerca de 50 a 200 milhões de novas infecções ocorreriam anualmente (GUBLER, 2011). No Brasil, a maior incidência dos casos ocorre de janeiro a maio, quando o clima é mais quente e úmido. Três dos quatro sorotipos do vírus da dengue são encontrados em todo território brasileiro, representando cerca de 60% dos casos de dengue registrados nas Américas (NOGUEIRA; ARAÚJO; SCHATZMAYR, 2007). As epidemias de dengue causam grande impacto nos serviços de saúde, pois, não há vacina, o tratamento disponível é paliativo e o controle do vetor é a única medida de prevenção da doença. Além do vírus da dengue, o ressurgimento de novos flavivírus tem sido de grande preocupação em países tropicais. O gênero engloba mais de 70 arbovírus, que podem causar encefalite grave, febre hemorrágica e doença febril em humanos (GUBLER; KUNO; MARKOFF, 2007). Cerca de 10 flavivírus já foram isolados de mosquitos, animais ou humanos, no Brasil, tais como, o Bussuquara, Cacipacoré, Iguape, Ilhéus, Rocio, o

vírus da Encefalite de Saint Louis, além, evidentemente, do vírus da Febre Amarela (FIGUEIREDO, 2000). O conhecimento da circulação desses vírus é essencial para a implantação de programas de vigilância.

Após o reconhecimento do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), como agente etiológico da SIDA, as evidências experimentais levaram a hipótese do surgimento do agente a partir de um ancestral de origem animal, o vírus da imunodeficiência de símios (SIV), causador de doença em macacos asiáticos, principalmente, macaco reso. O HIV apresenta elevada taxa de mutação, sendo o conceito de quasiespecies apropriado para descrever essa variabilidade genética. A síndrome foi descrita como uma nova entidade clínica em 1981 e o HIV isolado pela primeira vez em 1984. São classificados na família *Retroviridae* apresentando dois tipos, o HIV-1, com três grupos (M, N e O) e onze subtipos (A – K) e HIV-2 com cinco subtipos (A-E). A heterogeneidade genética do HIV é devido à alta taxa de erro na transcrição reversa ( $3 \times 10^5$  mutações/nucleotídeo/ciclo), à elevada frequência de recombinação envolvendo a transcriptase reversa, à grande quantidade de vírus produzidos na infecção ( $10^9$ - $10^{10}$  partículas/ dia) e ao grande número de indivíduos infectados (WIGG, 2008a).

No Brasil, o primeiro caso de SIDA foi diagnosticado em 1982 e, desde então, mais de 600.000 casos foram notificados em todo o país. A prevalência da SIDA na população adulta é de 0,6% e a incidência de novos casos foi de 17,9/100.000 habitantes em 2010 (GRAF; PINTO, 2012). Os dados epidemiológicos sobre o HIV demonstram que as medidas preventivas são insuficientes para conter a transmissão do vírus, o que torna essencial as pesquisas para o desenvolvimento de novos medicamentos antiretrovirais e o desenvolvimento de vacinas. Existem cerca de 30 medicamentos anti-HIV licenciados para uso clínico (BRODER, 2010), mas, apesar disso, o tratamento é apenas para controle, pois não promovem a cura do paciente.

Portanto, as doenças virais continuam sendo responsáveis por inúmeras mortes, além de afetar a qualidade de vida, promover mudanças significativas de comportamento, e, em particular, à medida que as populações mundiais menos favorecidas crescem desordenadamente. Além disso, a evolução dos meios de transportes e as alterações ambientais aumentam a chance de disseminação dos vírus e a sua manutenção na população. De acordo com Santos, Romanos e Wigg (2008) subestima-se a complexidade do ambiente e a capacidade

de adaptação e evolução de outras espécies do ecossistema, no aspecto da emergência e reemergência das doenças infecciosas em geral. Por outro lado, superestima-se o poder dos quimioterápicos, pesticidas e vacinas para combater as doenças. Considerando todos estes fatores abordados, e, associando-os a um maior conhecimento da natureza viral e o seu mecanismo de replicação, é mister a consolidação das pesquisas em virologia, em particular, no desenvolvimento de drogas para o controle das infecções virais.

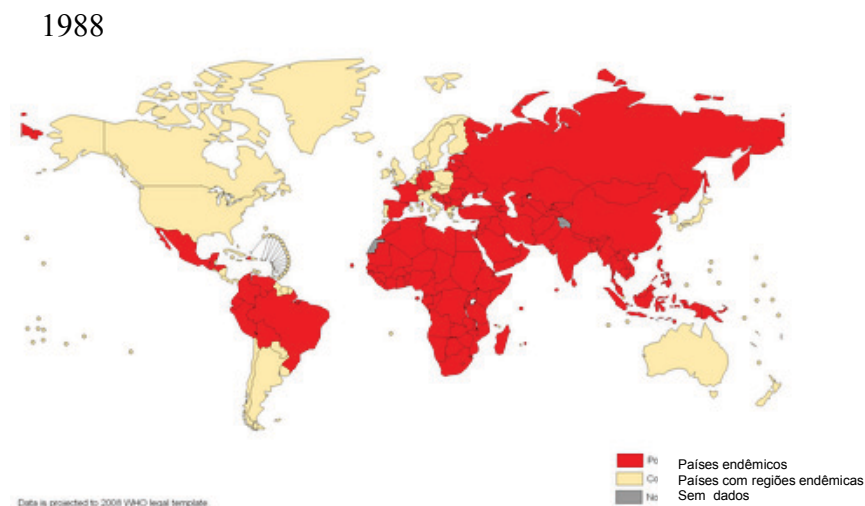
## 2 POLIOVÍRUS

O poliovírus é o agente etiológico da poliomielite, uma doença infecciosa aguda que, em sua forma grave, afeta o sistema nervoso central. A destruição dos neurônios motores na medula espinhal resulta em paralisia flácida dos membros e mais raramente a tetraplegia (ADU, 2005). O vírus é classificado na família *Picornaviridae*, do gênero *Enterovirus*. A família *Picornaviridae* ainda engloba os gêneros *Rinovirus* (vírus do resfriado), *Aftovirus* (vírus da Febre Aftosa), *Hepatovirus* (vírus da hepatite A), além dos *Cardiovirus*, *Parechovirus*, *Erbovirus*, *Kobuvirus* e *Teschovirus*. No gênero *Enterovirus*, além do poliovírus sorotipos 1, 2 e 3, outras espécies de importância médica e veterinária estão inclusas, a saber, os *Enterovirus* humanos de A a D (neste último grupo encontram-se os coxsackievírus, echovírus e enterovírus) e os *Enterovirus* símio, bovino e suíno (GONÇALVES et al., 2008; RACANIELLO, 2007).

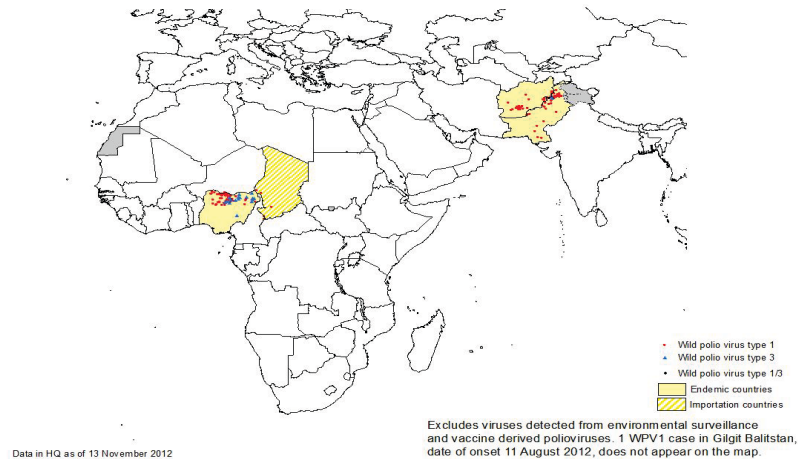
O poliovírus foi responsável por muitas epidemias nos séculos passados. Na Europa, a doença ocorreu nos anos de 1800 e na América do Norte em 1890 (NATHANSON; MARTIN JR, 1979). As pesquisas com o vírus possibilitaram grandes avanços no desenvolvimento da virologia geral. Em 1905, Landsteiner e Popper produziram a doença em macacos, através da inoculação intracerebral de material obtido de tecido cerebral humano infectado (LANDSTEINER; POPPER, 1909). Em 1948, os pesquisadores Enders, Weller e Robbins conseguiram cultivar o vírus em tecidos não neurais, eliminando deste modo o uso de animais para estudos experimentais, motivando o prêmio Nobel de medicina em 1954 (ENDERS; WELLER; ROBBINS, 1949) marcando o início da virologia moderna (FERREIRA et al., 2008). Em função destes achados, houve um progresso significativo no estudo da estrutura do vírus, epidemiologia da doença, controle e prevenção da poliomielite e a descoberta dos três sorotipos (PV-1, PV-2 e PV-3), além de possibilitar o desenvolvimento das vacinas de vírus inativado, por Jonas Salk, em 1955 e a de vírus atenuado, desenvolvida por Albert Sabin, em 1961. Em 1974, a Assembleia Mundial da Saúde (OMS) lançou o Programa Expandido de Imunização com o objetivo de vacinar todas as crianças no mundo e em 1988 aprovou a resolução para a erradicação da poliomielite até o ano 2000. Naquele ano, o programa de Iniciativa de Erradicação Global da Poliomielite (GPEI) foi criado em parceria com os governos nacionais e a OMS, em conjunto com o

Rotary International, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), dos EUA e o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF). O objetivo da GPEI era melhorar o programa de imunização, através da distribuição da vacina oral (VOP), em áreas de maior incidência do vírus, vigilância da paralisia flácida aguda e implementação de uma rede de laboratórios para o isolamento e caracterização de poliovírus. Desde 1988, mais de 2,5 bilhões de crianças foram imunizadas contra a doença, graças à cooperação de mais de 200 países, 20 milhões de voluntários e um investimento internacional de mais de oito bilhões de dólares. Quando o GPEI foi lançado, a doença ocorria em mais de 125 nações, atingindo cerca de 350.000 pessoas, na maioria crianças, desenvolvendo quadros de paralisia. Em 2012 ocorreram apenas 187 casos da doença e em apenas quatro países: Afeganistão, Nigéria, Paquistão e Chade (Figura 1) (GPEI, 2012). O GPEI utiliza exclusivamente a VOP, devido ao custo e facilidade de administração. A VOP é segura e eficaz, no entanto, em algumas localidades da Índia, a vacina não foi eficiente como em outros países, e, além disto, mesmo em baixa frequência (um em 750.000 vacinados), a doença parálitica associada à vacina foi constatada (COLLETT; NEYTS; MODLINC, 2008).

**Figura 1** - Distribuição global do poliovírus em 1988 e em 2012.



2012

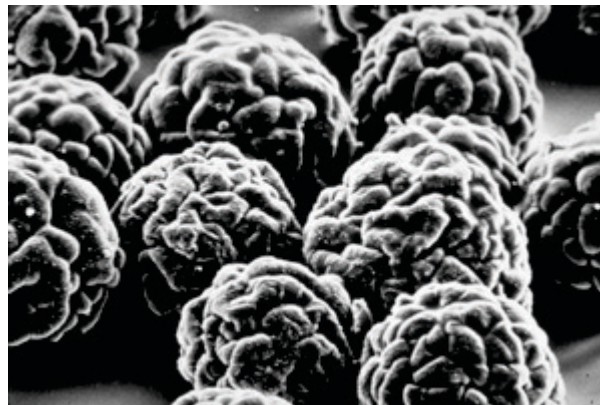


Fonte: GPEI (2012)

## 2.1 PROPRIEDADES GERAIS

O vírion apresenta forma esférica com 26 a 30 nm de diâmetro, sem envelope e simetria icosaédrica (Figura 2). A composição química do vírus é de 30% de ácido nucleico e 70% de proteína (RACANIELLO, 2007). São estáveis a pH ácido (3 a 5) durante 1 a 3h (BROOKS et al., 2012).

**Figura 2** - Eletromicrografia do poliovírus.

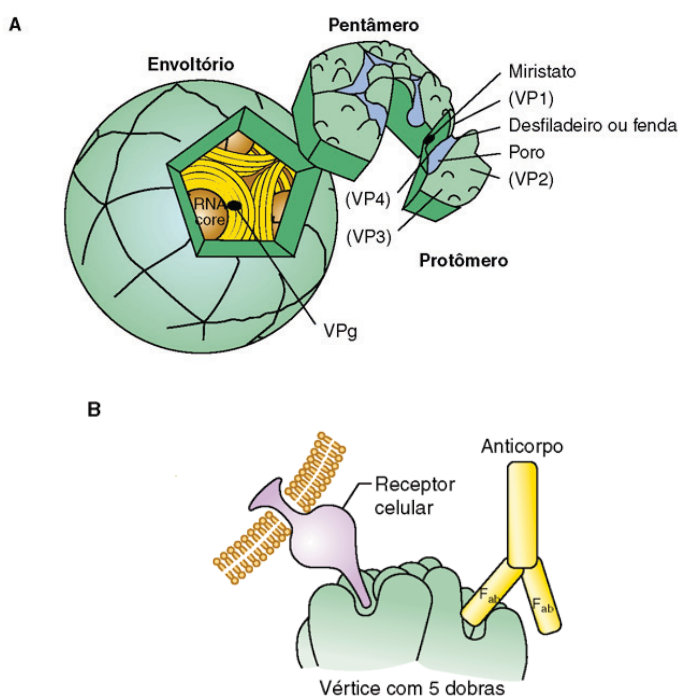


Fonte: GPEI (2012).

O capsídeo é constituído de 60 capsômeros e cada capsômero é formado por quatro polipeptídeos estruturais denominados VP1, VP2, VP3 e VP4, sendo os três primeiros superficiais. VP1 é o mais externo e nele se localiza o sítio antigênico mais importante, que é, possivelmente, o sítio de reconhecimento do

receptor celular (GONÇALVES et al., 2008). Existe uma fenda ou “desfiladeiro” proeminente em torno de cada vértice pentamérico, na superfície da partícula viral. Acredita-se que o local de ligação do receptor, utilizado para a fixação do vírion a célula hospedeira seja próximo, ou diretamente, no assoalho da fenda. Mutações nos aminoácidos da fenda podem alterar a afinidade de ligação do vírus ao receptor da célula (RACANIELLO, 2007). A fenda é hidrofóbica e nos poliovírus 1 e 3 parece conter esfingosina (FILMAN et al., 1989). Esta região hidrofóbica, comum aos picornavirus, parece ser o local de ligação para os fármacos, como o Pleconaril, que ao se ligar fortemente à fenda desloca qualquer lipídeo que esteja presente, inibindo o desnudamento do vírus (PEVEAR et al., 2005).

**Figura 3** – Estrutura de um picornavírus típico. **A.** Localização interna do genoma de RNA circundado pelo capsídeo composto de pentâmeros das proteínas VP1, VP2, VP3 e VP4; desfiladeiro ou fenda que circunda o vértice do pentâmero. **B.** Ligação do receptor celular ao assoalho da fenda.



Fonte: Brooks et al. (2012).

A subunidade VP4 localiza-se mais internamente no capsídeo, associando-se ao ácido nucleico, RNA linear de filamento simples, com cerca de 7,5 kb, de polaridade positiva. Na extremidade 5' está localizado o gene que codifica a proteína VPg (proteína do vírion associado ao genoma), presente nas cadeias nascentes de RNA e nas fitas negativas, supostamente, iniciador para síntese do

RNA viral e na extremidade 3' apresenta a cauda poli(A) (RACANIELLO, 2007). As regiões 5' não-codificantes são longas (624 – 1.119 pb) e contêm sequências que controlam a replicação e a tradução, já a região 3' não-codificante é curta (14 – 125 pb) e contém uma estrutura secundária, que tem sido implicada no controle da replicação viral (GONÇALVES et al., 2008). As sequências de leitura abertas (ORFs) são sintetizadas sob a forma de precursores poliprotéicos. As ORFs referentes às proteínas estruturais estão organizadas no terço inicial do genoma (extremidade 5') e às proteínas não-estruturais nos dois terços terminais do genoma (FERREIRA et al., 2008).

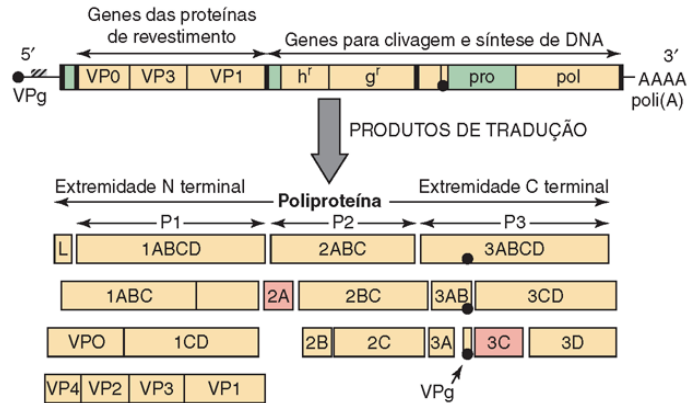
## 2.2 REPLICAÇÃO DO POLIOVÍRUS

O ciclo de replicação do poliovírus ocorre no citoplasma das células. O vírus fixa-se a um receptor específico na membrana plasmática, o CD-155. Este receptor é uma glicoproteína da membrana celular que apresenta-se na forma de 3 domínios extracelulares (semelhante a imunoglobulina), um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático (TUTHILL et al., 2010). Esta propriedade explica porque o homem é o único hospedeiro para o vírus (RACANIELLO, 2007). Este receptor liga-se à fenda do capsídeo do poliovírus e essa interação de alta energia pode funcionar como um gatilho para o início das transições estruturais no capsídeo envolvidos na penetração na membrana e liberação do genoma (TUTHILL et al., 2010). As moléculas de anticorpos também podem penetrar na fenda, neutralizando o vírus. No entanto, podem realizar mutações para alterar os aminoácidos da fenda impedindo o bloqueio pelos anticorpos (ROSSMANN; HE; KUHN, 2002).

A ligação ao receptor provoca uma alteração estrutural no virion, formando as partículas alteradas ou partículas A, que contêm o RNA viral, mas perderam a proteína VP4. Nesta conformação, a porção N-terminal da VP1 (que na partícula nativa encontra-se no interior do capsídeo) apresenta-se na superfície da partícula A. Essa sequência é hidrofóbica e apresenta maior afinidade para as membranas, inserindo-se na membrana celular, levando a formação de poros através dos quais o RNA viral é liberado para o citoplasma da célula (FRICKS; HOGLE, 1990). A presença de canais iônicos quando as partículas A são adicionadas as bicamadas lipídicas reforçam esta hipótese (TOSTESON; CHOW, 1997).

Após a liberação do RNA viral, a VPg é removida por enzimas celulares (fosfodiesterases) e o RNA associa-se aos ribossomos, onde acontece a tradução, pois não podem ser copiados por nenhuma RNA polimerase celular. A tradução ocorre por um mecanismo independente de cap, por meio do reconhecimento do sítio interno de entrada no ribossomo (IRES), presente na extremidade 5' do genoma viral (BROOKS et al., 2012). Duas proteínas celulares, a PCBP (Poly-C binding protein) associa-se ao IRES favorecendo a tradução da poliproteína e a PABP (Poly-A binding protein) liga-se a cauda poli(A) levando a aproximação das extremidades 5' e 3' do RNAm, aumentando a taxa da síntese proteica (FERREIRA et al., 2008). O RNA de polaridade positiva, sem a VPg liga-se a porção 40S do ribossomo e é traduzido em uma poliproteína, a partir da extremidade N-terminal (esquerda) para C-terminal (direita). A poliproteína é clivada em três precursores proteicos: P1 – proteína precursora do capsídeo (estrutural) e P2 e P3 – proteínas envolvidas no processamento das proteínas e na replicação do genoma (não-estruturais). Essas proteínas precursoras, P1, P2 e P3, por sua vez, são clivadas em 4 (VP4, VP2, VP3 e VP1), 3 (2A, 2B e 2C) e 4 produtos finais (3A, VPg, 3C e 3D), respectivamente (Figura 4). A clivagem é realizada por três proteinases codificadas pelo genoma viral: Lpro, 2Apro e 3Cpro ou 3CDpro. A clivagem primária entre P1 e P2 ocorre entre os aminoácidos tirosina e glicina e é mediada pela 2Apro, que também cliva várias proteínas celulares, incluindo eIF4GI, eIF4GII e PABP (RACANIELLO, 2007). A clivagem da proteína eIF4 pela protease viral parece interromper a síntese proteica celular e preferencialmente traduzir o RNA viral (BROOKS et al., 2012).

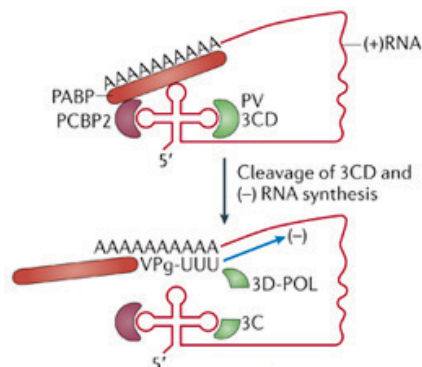
**Figura 4** – Organização e expressão do genoma dos picornavírus. A poliproteína é clivada por proteases codificadas pelos vírus: 2A e 3C. A clivagem de maturação (VP0 – VP4 + VP2) só ocorre após o acondicionamento do RNA no envoltório proteico.



Fonte: Brooks et al. (2012).

Quando a poliproteína viral é processada, as proteínas não estruturais se associam ao RNAm viral para o início da transcrição da fita negativa de RNA, iniciando assim o processo de replicação do genoma viral. Portanto, para que ocorra a replicação é necessário interromper a tradução. Esse processo é regulado pela associação da proteína viral precursora 3CD à estrutura secundária na extremidade 3' denominada de *clover leaf* (folha de trevo). Quando a 3CD se liga a essa estrutura e estabelece interações tanto com a PABP, na 3'UTR, quanto a PCBP, na 5'UTR, a tradução é inibida, porque a 3CD promove o desligamento da interação da PCBP com o sítio IRES presente no 5'UTR e, conseqüentemente, dele com a cauda poli(A) na extremidade 3' (Figura 5) (FERREIRA et al., 2008).

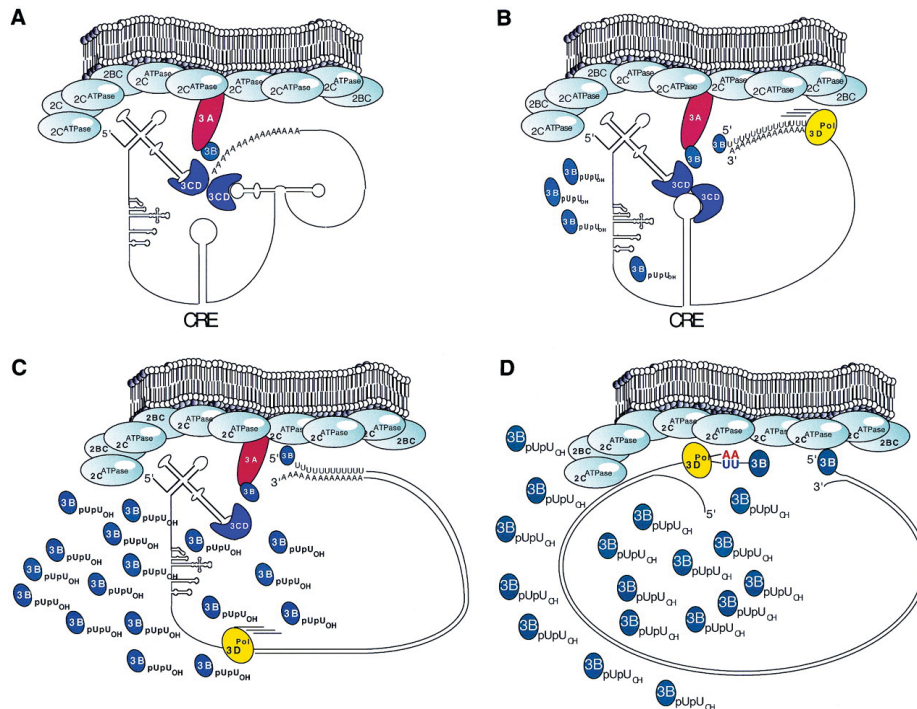
**Figura 5** – Bloqueio da tradução e início da replicação do genoma do poliovírus.



Fonte: Adaptado de Nagy e Pogany (2012).

Dessa forma, inicia-se a fase de transcrição dos genomas virais. A transcrição acontecerá em associação íntima com a fase citoplasmática de membranas perinucleares. Quem se associa a essas membranas é a proteína precursora 3AB, um polipeptídeo ligado à membrana. Vírus mutantes para 3AB possuem a hidrofobicidade diminuída e são defeituosas na iniciação da síntese de RNA, na uridinilação da VPg *in vitro* e na síntese da fita positiva do RNA viral *in vivo* (GIACHETTI; SEMLER, 1990; GIACHETTI; HWANG; SEMLER, 1992). A 3AB se liga à proteína precursora 3CD, que está fortemente associada ao RNAm viral e essa ligação determinará a uridinilação do último resíduo do aminoácido C-terminal de 3B (precursor da VPg), originando assim o iniciador necessário para a síntese do RNA negativo. A 3AB é então processada, permanecendo a VPg associada a extremidade 5' do RNA recém-sintetizado (Figura 6). As novas moléculas de RNA negativas servirão como molde para a síntese de novos RNAm genômicos por um processo de formação do iniciador, idêntico ao da síntese do RNA negativo. A presença das fitas negativas de RNA é sempre detectada sob a forma de intermediários de replicação, que são formados pela fita negativa mais a fita positiva (FERREIRA et al., 2008). Várias fitas de sentido positivo são produzidas a partir de cada molde de sentido negativo, cerca de 30-70:1 com o objetivo de garantir quantidades suficientes de proteínas virais sendo sintetizadas e de RNA genômico para empacotamento nos novos vírions.

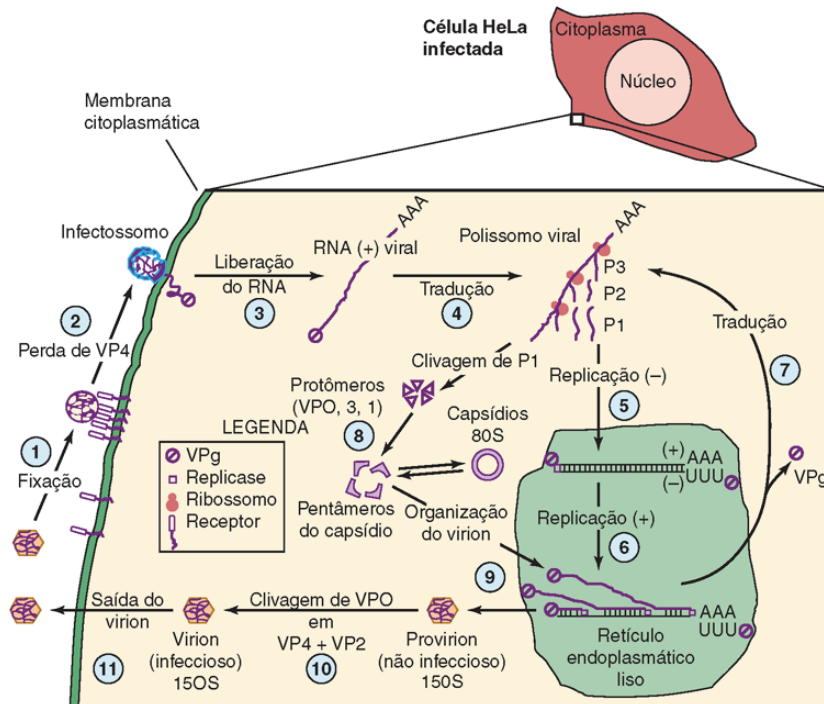
**Figura 6** – Modelo de replicação do RNA do poliovírus. **A.** Início da síntese da fita negativa do RNA (ligação da proteína 3AB com 3CD); **B.** Início da uridilação da VPg; **C.** Término da uridilação da VPg; **D.** Início da síntese da fita positiva do RNA.



Fonte: Murray e Barton (2003).

O processo de maturação envolve diversos eventos de clivagem. A proteína precursora do envoltório P1 é clivada em VP0, VP3 e VP1. Ao atingirem uma concentração adequada, esses protômeros organizam-se em pentâmeros que acondicionam o VPg-RNA de filamento positivo formando o pró-víriões, que não são infecciosos, até a ocorrência de uma clivagem final que transforma VP0 em VP4 e VP2. As partículas virais maduras são liberadas quando a célula hospedeira sofre desintegração (Figura 7) (BROOKS et al., 2012). Em células infectadas, o genoma é amplificado para cerca de 50.000 cópias por célula. O tempo necessário para um ciclo inteiro varia de 5 a 10 horas, dependendo de muitas variáveis, como a cepa viral, temperatura, pH, a célula hospedeira e a multiplicidade de infecção (GONÇALVES et al., 2008).

**Figura 7 - Visão geral do ciclo de infecção dos picornavirus.**



Fonte: Brooks et al. (2012).

### 2.3 PATOGENIA DO POLIOVÍRUS

A patogenia da infecção está intimamente relacionada ao sítio de replicação viral e a doença pode se manifestar de forma abortiva, não paralítica e paralítica. A doença abortiva é a forma mais comum, caracterizada por febre, lassidão, sonolência, cefaleia, náuseas, vômitos, prisão de ventre e inflamação da garganta. O paciente se recupera em poucos dias. Na forma não paralítica, além dos sintomas referidos anteriormente, o paciente tem rigidez e dor nas costas e nuca. A doença dura entre 2 a 10 dias, e a recuperação é rápida e completa, com um baixo percentual de evolução à forma paralítica. A forma paralítica ocorre em cerca de 1% das infecções, sendo o período de incubação geralmente de 4 a 10 dias e a paralisia aparece de 2 a 5 dias após os sintomas iniciais inespecíficos. Há inflamação e destruição da massa cinzenta do sistema nervoso central (SNC) e da medula espinhal. A paralisia é classificada como espinhal ou bulbar ou associada, levando a doença bulboespinhal. A doença espinhal geralmente é assintomática, com paralisia flácida, limitada às extremidades e ao tronco, com apresentação desde fraqueza branda à tetraplegia. Apenas 10 a 15% são da forma bulbar, envolvendo nervos

motores ou centros medulares que controlam a respiração e o sistema vasomotor (GONÇALVES et al, 2008).

#### 2.4 POLIOVÍRUS SELVAGEM E VACINAL

Os epítomos virais neutralizantes estão localizados nas proteínas externas do capsídeo (VP1-3) e o tipo do vírus é determinado pela sequência codificante do capsídeo (VP1) que é altamente conservada (ADU, 2005). O poliovírus, como outros vírus de RNA, são propensos a erros pela RNA polimerase viral o que leva a um acúmulo de mutações durante a replicação (HOLLAND; DE LA TORRE; STEMHAWER, 1992). As categorias do vírus da poliomielite são denominadas de selvagens e vacinais (ADU, 2005). Os vírus são de transmissão fecal-oral ocorrendo multiplicação primária na orofaringe, ou diretamente no intestino, com subsequente viremia. Os vírus selvagens podem propagar-se ao longo dos axônios dos nervos periféricos até o sistema nervoso central, afetando a medula espinhal ou o cérebro (COLLETT; NEYTS; MODLINC, 2008), contrariamente aos vacinais que perderam a neurovirulência e são também eliminados pelas fezes e são úteis na infecção de suscetíveis, levando a uma vacinação coletiva. O vírus é regularmente encontrado na orofaringe até uma semana após a infecção e nas fezes mesmo após o aparecimento dos anticorpos no sangue.

A imunoproliferação ativa à doença é feita pelas vacinas oral (vírus atenuados com perda da neurovirulência) e inativada (vírus inativos), conhecidas pelas siglas VOP e VIP, respectivamente, que contêm os três sorotipos do vírus. A VOP é administrada por via oral e simula uma infecção natural, porém, é destituída de neurovirulência e, portanto, não patogênica. Estas cepas vacinais competem com o vírus selvagem ao nível das células intestinais, sendo esta uma das vantagens da VOP. Há vantagens e desvantagens das duas formas de vacinas, que vão desde a forma de administração, mecanismos de desenvolvimento da imunidade e efeito indesejáveis. No caso da VOP, a soroconversão para os três vírus vacinais não é homogênea. Enquanto a maioria das crianças apresenta excelentes taxas de soroconversão para o PV2, a resposta ao PV1 e PV3 é baixa (BRICKS, 2007). Esse problema tem sido registrado, principalmente, em países de clima tropical, onde são necessárias diversas doses da vacina para obtenção de mais de 95% de soroconversão para os três poliovírus. A baixa imunogenicidade da VOP tem sido

responsável por diversos casos de falha vacinal primária em crianças que haviam recebido mais de três doses da VOP. Na Índia e África, algumas crianças que haviam recebido até oito doses da VOP desenvolveram paralisia, demonstrando que, nessas regiões, fatores locais (interferência com outros vírus) ou genéticos interferem com a efetividade da vacina oral (BRICKS, 2007).

Embora o risco de paralisia associada aos vírus vacinais seja bastante baixo, atualmente é reconhecida a capacidade de cepas vacinais sofrerem mutações e o sequente resgate da neurovirulência, originando as cepas derivadas dos vírus vacinais (VDPV), que podem causar paralisia em pessoas vacinadas ou que tiveram contato com pessoas vacinadas (HEYMANN; AYLWARD, 2006; KEW et al., 1998; MARTÍN, 2006).

Normalmente, os vírus da VOP são excretados pelas fezes de indivíduos saudáveis e vacinados por até 8 semanas. Os VDPVs podem circular por vários anos em indivíduos imunodeficientes, indivíduos não imunes e em regiões submetidas à vacinação parcial, adquirindo a capacidade de causar a doença parálitica. Em casos detectados de poliomielite por VDPV, os vírus isolados possuíam a diferença de sequência da VP1 entre 1% e 15%, comparativamente à cepa vacinal, sendo, portanto classificados como tal. Por outro lado, os casos descartados apresentavam diferenças menores que 1% (ADU, 2005). Além disso, estimou-se que, quanto maior a diferença no genoma dos VDPVs em comparação com os vírus vacinais, maior o tempo de manutenção desses vírus na região (BRICKS, 2007).

O primeiro surto de poliomielite parálitica causada por VDPV ocorreu na ilha Hispaniola, no Caribe, no final de 2000 (KEW et al., 2002) tendo sido demonstrado que as cepas isoladas apresentavam a capacidade replicativa e de neurovirulência comparadas ao vírus selvagem. Além disto, estas propriedades foram associadas com apenas algumas alterações nucleotídicas no genoma do vírus (ALMOND, 1987; KEW; NOTTAY, 1984; KEW et al, 2005). Após a identificação deste surto na ilha Hispaniola, foram registrados casos no Egito (YANG et al., 2003). Estima-se a ocorrência de pelo menos um surto de pólio em todo o mundo devido ao VDPV, a cada ano (DUINTJER TEBBENS et al., 2012). Embora haja essa possibilidade, os benefícios da VOP superam esse risco e, além disso, utilização da VOP faz com que a transmissão do poliovírus selvagem seja eliminada. Assim, a vacina é crucial para manter o controle da doença na maioria dos países. Atualmente, os países que tem

a circulação do vírus selvagem controlada, devem decidir pela substituição da VOP pela VIP. Isso pode representar um risco no controle da doença, uma vez que a VIP é mais onerosa e países mais pobres podem não suprir a necessidade da população, ocorrendo falhas na imunização (COLLETT; NEYTS; MODLINC, 2008).

No Brasil, as ações de combate à pólio iniciaram-se em 1961 e consolidou em 1971, com a criação do Plano Nacional de Controle da Poliomielite. Desde então, integrado ao Plano Nacional de Imunização, com a vacinação massiva, uma vez por ano, destinada aos menores de cinco anos, independente de história vacinal anterior (BRASIL, 2012). O último registro de poliomielite no Brasil ocorreu em março de 1989 (NASCIMENTO, 2004). Em agosto de 2012, a VIP foi introduzida no calendário nacional de vacinação, em esquema sequencial com 2 doses de VIP e 2 doses de VOP. As doses da VIP visam minimizar o risco de paralisia associada à vacina, e VOP, manter a imunidade populacional contra o risco potencial de introdução do vírus selvagem de áreas endêmicas (BRASIL, 2012).

Os Estados Unidos adotaram em 1997 o esquema sequencial, com duas doses da VIP seguidas pela VOP e, a partir do ano 2000, apenas a VIP. De 1999 a 2005, não foi identificado nenhum caso de paralisia associada aos vírus vacinais. Entretanto, em 2005 foi confirmado o primeiro caso importado de paralisia por VDPV, em uma paciente de 22 anos, não vacinada, e que havia viajado ao exterior, onde teve contato com crianças, recentemente, vacinadas com a VOP (CDC, 2005).

## 2.5 TRATAMENTO

Não existe antiviral para o tratamento da infecção pelo poliovírus. As imunoglobulinas podem fornecer proteção por poucas semanas contra a doença paralítica, mas não previne a infecção subclínica, sendo eficazes somente se forem administradas pouco antes da infecção.

A tentativa de desenvolvimento de drogas antipoliovírus é uma abordagem nova, uma vez que a vacina tem sido utilizada com sucesso, nos últimos 50 anos. As drogas antipoliovírus representam mais uma opção para o controle da doença e que podem ser utilizadas em conjunto com as vacinas (COLLETT; NEYTS; MODLINC, 2008). O Pleconaril é uma droga relativamente nova que vem sendo testada, em caráter experimental, para o tratamento de infecções por alguns

enterovírus, incluindo o poliovírus, e rinovírus. Sua administração reduz o risco de evolução grave da doença em indivíduos não imunizados com replicação contínua do vírus (WOOD; SUTTER; DOWDLE, 2000). O fármaco interage com a parte hidrofóbica da fenda do capsídeo dos picornavirus, impedindo a ligação ao receptor celular e a decapsidação do vírion (PEVEAR et al., 1999).

Em que pese a eficácia da vacina e considerando o baixo risco de recuperação da neurovirulência pelas cepas vacinais, as pesquisas para o desenvolvimento de antivirais eficazes para o controle da doença, em conjunto com a vacina, têm sido incentivada, na última década. O desenvolvimento de drogas antipoliiovírus poderá ser, eventualmente, benéfico também no controle de outras enterovirose, tais como as causadas pelos Enterovírus 70 e 71, que podem ocasionar também a paralisia flácida aguda (GONÇALVES et al., 2008).

### 3 HERPESVÍRUS

Os herpesvírus pertencem a ordem *Herpesvirales* composta por 3 famílias: *Herpesviridae*, compreendendo os herpesvírus de mamíferos, pássaros e répteis; *Alloherpesviridae* incluindo vírus de peixes e anfíbios e *Malacoherpesviridae*, abrangendo os herpesvírus de moluscos (DAVISON, 2010). A família *Herpesviridae* é caracterizada por vírus que codificam várias enzimas envolvidas na replicação ( timidina-quinase, timidilato-sintetase, ribonucleotídeo-redutase) e na síntese do ácido nucleico viral (DNA polimerase, helicase, primase) e no processamento das proteínas virais (proteína-quinase). A capacidade de causar infecções persistentes latente com reativações também são características dessa família.

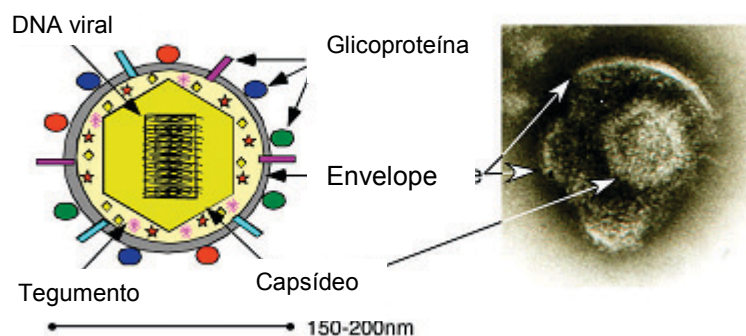
Com base na análise genética do gene conservado que codifica para a glicoproteína H (gH) do envelope, os *Herpesviridae* são classificados em três subfamílias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gamaherpesvirinae* (PELLETT; ROIZMAN, 2007). Os vírus da subfamília *Alphaherpesvirinae* apresentam um ciclo de replicação rápido e lítico, *in vitro* e *in vivo* e possuem a capacidade de infectar células epiteliais e nervosas, estabelecendo infecção latente em gânglios do sistema nervoso (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007). Os membros da subfamília *Betaherpesvirinae* replicam-se lentamente, também estabelecem latência e possuem poucos hospedeiros (PELLETT; ROIZMAN, 2007). Estão classificados nessa subfamília o citomegalovírus humano (HCMV), herpesvírus humano 6 (HHV-6) e herpesvírus humano 7 (HHV-7) e estão associados a diferentes quadro clínicos, principalmente, em imunocomprometidos (WIGG; MIRANDA, 2008). Já os vírus da subfamília *Gamaherpesvirinae*, herpesvírus 8 (HHV-8), agente etiológico do sarcoma de Kaposi (KSHV) e o vírus Epstein-Barr (EBV) ou vírus da mononucleose infecciosa, capaz de causar também o linfoma de Burkitt, infectam linfócitos de forma lítica ou latente e possuem potencial oncogênico (WIGG; MIRANDA, 2008). Os vírus das subfamílias *Beta* e *Gamaherpesvirinae* ocasionam manifestações sistêmicas (PELLETT; ROIZMAN, 2007). Na subfamília *Alphaherpesvirinae* encontram-se o gênero *Simplexvirus* onde estão classificados os Herpesvírus humano 1 e 2 (HHV-1 e HHV-2) ou vírus herpes simplex 1 e 2 (HSV-1 e 2) e o gênero *Varicellovirus* com o herpesvírus humano 3 (HHV-3) ou vírus da varicela-zoster (VZV) que infecta humanos e o Herpesvírus bovino 1 e 5 (BoHV-1 e 5) que infectam bovinos. As propriedades gerais, assim como as etapas de

biossíntese e a latência são semelhantes entre os vírus da subfamília *Alphaherpesvirinae*.

### 3.1 PROPRIEDADES GERAIS DA FAMÍLIA *Alphaherpesvirinae*

Os vírions são constituídos de quatro componentes estruturais: o genoma de DNA dupla-fita linear (125-240 kb), o capsídeo com uma simetria icosaédrica, um tegumento que recobre o capsídeo e um envelope lipoprotéico contendo espículas de glicoproteínas na sua superfície (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007). Apresentam diâmetro superior a 100 nm, podendo chegar a 225 nm, incluindo as espículas do envelope (WIGG; MIRANDA, 2008) (Figura 8).

**Figura 8** – Estrutura e eletromicrografia do vírus Herpes Simplex.



Fonte: Taylor et al. (2002).

O capsídeo é formado por seis proteínas externas a  $U_L6$ ,  $U_L18$  (VP23),  $U_L19$  (VP5),  $U_L26$  (VP24),  $U_L35$  (VP26) e  $U_L38$  (VP19) (PELLETT; ROIZMAN, 2007). É formado por 162 capsômeros, sendo 150 hexaméricos e 12 pentaméricos, e não está localizado simetricamente no centro do envelope viral. Entre o capsídeo e o envelope há uma camada amorfa denominada tegumento que contém 22 proteínas:  $U_L4$ ,  $U_L11$ ,  $U_L13$ ,  $U_L14$ ,  $U_L16$ ,  $U_L17$ ,  $U_L21$ ,  $U_L36$  (VP1/2),  $U_L37$  (VP11/12),  $U_L41$ ,  $U_L46$ ,  $U_L47$  (VP13/14),  $U_L48$  (VP16),  $U_L49$  (VP22),  $U_L51$ ,  $U_L56$ ,  $U_S2$ ,  $U_S3$ ,  $U_S10$ ,  $U_S11$ , ICP0 e ICP4 (METTENLEITER, 2004, 2006). As principais são as proteínas VP16 $\alpha$  ou -trans-inducing factor ( $\alpha$ -TIF) que é potente transativadora de genes  $\alpha$ ; a VP22 ou virion host shut-off (VHS) que pára a síntese de macromoléculas da célula infectada; e uma grande proteína, a VP1-2, que parece participar da liberação do DNA viral no poro nuclear após a penetração (WIGG;

MIRANDA, 2008). O envelope consiste em uma bicamada lipídica contendo 5 proteínas: U<sub>L</sub>20, U<sub>L</sub>43, U<sub>L</sub>45, U<sub>L</sub>49A e U<sub>S</sub>9, e 11 glicoproteínas: U<sub>L</sub>1 (**gL**), U<sub>L</sub>10 (**gM**), U<sub>L</sub>22 (**gH**), U<sub>L</sub>27 (**gB**), U<sub>L</sub>44 (**gC**), U<sub>L</sub>53 (**gK**), U<sub>S</sub>4 (**gG**), U<sub>S</sub>5 (**gJ**), U<sub>S</sub>6 (**gD**), U<sub>S</sub>7 (**gI**) e U<sub>S</sub>8 (**gE**) (METTENLEITER, 2004, 2006).

O genoma viral pode ser dividido em seis regiões: 1) sequências “a” - importantes na circularização do DNA viral e no empacotamento do DNA no vírion; 2) Sequência longa repetida (R<sub>L</sub>) – codifica a proteína regulatória inicial ( $\alpha 0$ ), assim como o promotor e a maioria dos genes associados aos transcritos associados à latência (LATs – latency-associated transcripts); 3) Região longa única (U<sub>L</sub>) – codificam diferentes proteínas, incluindo enzimas que participam da replicação do DNA e formação do capsídeo; 4) Sequência curta repetida (R<sub>S</sub>) – codifica proteínas ativadoras transcricional que atuam na estimulação da expressão dos genes que levam à replicação viral; 5) Região curta única (U<sub>S</sub>) – codifica 12 ORFs, várias das quais são glicoproteínas importantes na formação do vírus e nos mecanismos de evasão; 6) Origem de replicação da região U<sub>L</sub> (Ori<sub>L</sub>) e da região U<sub>S</sub> (Ori<sub>S</sub>) (WIGG; MIRANDA, 2008).

As regiões únicas, U<sub>L</sub> e U<sub>S</sub> são flanqueadas pelas sequências repetidas invertidas (TR<sub>L</sub>-IR<sub>L</sub> e IR<sub>S</sub>-TR<sub>S</sub>) (WATANABE, 2010). Há uma única cópia da sequência ‘a’ em cada terminal e entre as junções IRL e IRS (TAYLOR et al., 2002). Alguns membros, como os HSV sofrem rearranjos do genoma, originando diferentes isômeros de genoma, criando diferentes tipos de moléculas de DNA que diferem somente na orientação da sequência de DNA (WHITLEY; ROIZMAN, 2001). O número de sequência de leitura aberta que codificam as proteínas estruturais e funcionais varia de 70 a mais de 200 (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007).

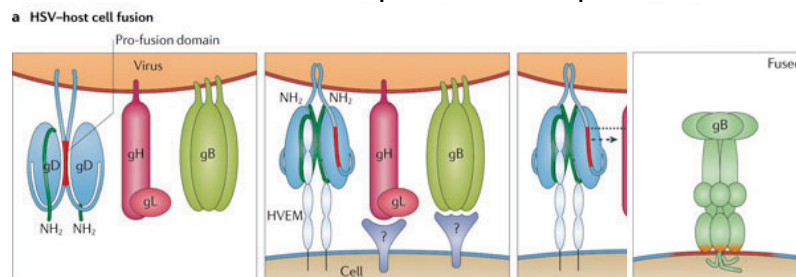
O genoma dos herpesvírus codifica aproximadamente 90 RNAm e, pelo menos, 84 codificam proteínas regulatórias da replicação e proteínas estruturais (PELLETT; ROIZMAN, 2007). Os genes são classificados em  $\alpha$  ou precoce imediato (IE) que codificam proteínas regulatórias como a proteína de célula infectada 0 (infected-cell protein 0 – ICP0) e ICP4; em  $\beta$  ou precoce tardio (E) que codificam proteínas de replicação do DNA, incluindo a timidina-quinase e a DNA polimerase; e  $\gamma$  ou tardio (L) que codificam as glicoproteína B (gB), ICP5 e gC (KUO et al., 2002). De acordo com Su et al. (2008), os RNAm de IE são detectados na primeira meia hora pós-infecção (hpi), os de E de 2-3 hpi e os de L, pelo menos após 12 hpi.

### 3.2 REPLICAÇÃO DOS HERPESVÍRUS

A replicação dos herpesvírus, em condições naturais, ocorre em células epiteliais da pele e mucosas e células neuronais (SPEAR et al., 2006). A adsorção das partículas virais é mediada pelas glicoproteínas (g) virais. Os principais receptores responsáveis pela adsorção viral são os glicosaminoglicanos: sulfato de heparana (HS), sulfato de condroitina (CS) e sulfato de dermatana (DS) (MARDBERG et al., 2002; OH; FRASER, 2008). A ausência desses receptores, especialmente o HS, demonstra uma inibição na capacidade dos herpesvírus de se ligarem às células *in vivo*. A molécula de HS também parece ser um receptor importante para a entrada do vírus em células neuronais (WIGG; MIRANDA, 2008).

A entrada do vírus nas células ocorre através da fusão do envelope com a membrana celular por fusão direta, em pH neutro (MILNE et al., 2005; NICOLA; STRAUS, 2004) e requer a participação das glicoproteínas gB, gC, gD, gH e gL (PERTEL et al., 2001). A interação inicial na superfície da célula é mediada pela interação da gC e/ou gB com HS (SHUKLA; TIWARI; VALYI-NAGY, 2012). Embora gC não seja essencial para a entrada viral, sua ausência diminui a eficiência da adsorção à célula (SPEAR; LONGNECKER, 2003). Essa interação é lábil até que gD participe do processo, proporcionando uma ligação estável através da ligação com outros receptores celulares que é crucial para a iniciação do processo de fusão (TAYLOR et al. 2007). A gD pode interagir com três famílias de receptores que incluem, receptor mediador de entrada de herpesvirus (HVEM) - membro da família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF); receptor de nectinas 1 e 2 - ambos membros da superfamília de imunoglobulinas; e uma forma modificada do HS, conhecida como sulfato de heparana 3-O-sulfatado (3-OS HS) (PERTEL et al., 2001). A interação entre gD e o receptor celular proporciona a interação com o heterodímero formado por gH/gL, expondo o domínio de fusão de gB e do heterodímero, permitindo a fusão e entrada do nucleocapsídeo no citoplasma (Figura 9).

**Figura 9** – Fusão do HSV com a membrana celular. Expressão das glicoproteínas virais gD (forma de dímero), gH/gL (heterodímero) e gB (trímero). A gD pode interagir com o receptor HVEM propiciando a interação com gH/gL e expondo o domínio fusogênico (laranja) de gB permitindo a fusão e entrada do nucleocapsídeo no citoplasma.

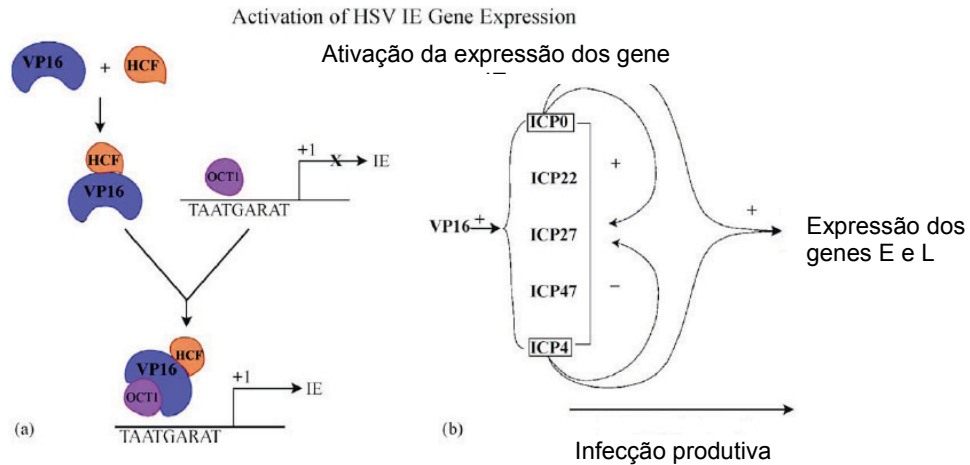


Fonte: Connolly et al. (2011).

Após a penetração no citoplasma, o nucleocapsídeo viral é transportado pelo citoesqueleto através dos microtúbulos até as proximidades do núcleo, onde o capsídeo vazio é deixado no citoplasma (MAROZIN; PRANK; SODEIK, 2004). A proteína “bloqueadora” da síntese do hospedeiro (VHS) permanece no citoplasma, onde causa a desagregação de polirribossomas e a degradação de RNAs celulares, parando a síntese de proteínas celulares. O DNA, acompanhado da proteína VP16 (ativadora da transcrição de genes IE virais via fatores de transcrição celulares) complexam-se com proteínas citoplasmáticas: octâmero 1 (OCT-1) e fator celular do hospedeiro (HCF) e penetram no núcleo através do poro nuclear. Recentemente foi proposto que a proteína do tegumento VP1/2, ligada ao capsídeo, deve ser clivada por uma serino ou cisteíno-protease para que o DNA seja liberado no núcleo e que esse evento só ocorre quando o capsídeo se liga ao poro nuclear (WIGG; MIRANDA, 2008).

A expressão gênica viral é coordenada em cascata e é iniciada pela RNA polimerase II. O recrutamento de VP16/OCT-1/HCF forma um potente complexo trimérico com sequências consensos, por exemplo: 5'GyATGnTAATGAArATTCyTTGnGGG3', para a ativação de transcrição dos genes  $\alpha$  (EFSTATHIOU; PRESTON, 2005). Essas sequências são localizadas nos promotores dos cinco primeiros genes IE: ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 e ICP47 (WYSOCKA; HERR, 2003). (Figura 10).

**Figura 10** – Ativação da expressão de genes IE. (a) A expressão de genes IE é ativada por um complexo trimérico que consiste em OCT-1, VP16 e HCF. (b) Como consequência da expressão de genes IE subsequentes classes de genes são expressos para facilitar a infecção produtiva do vírus.



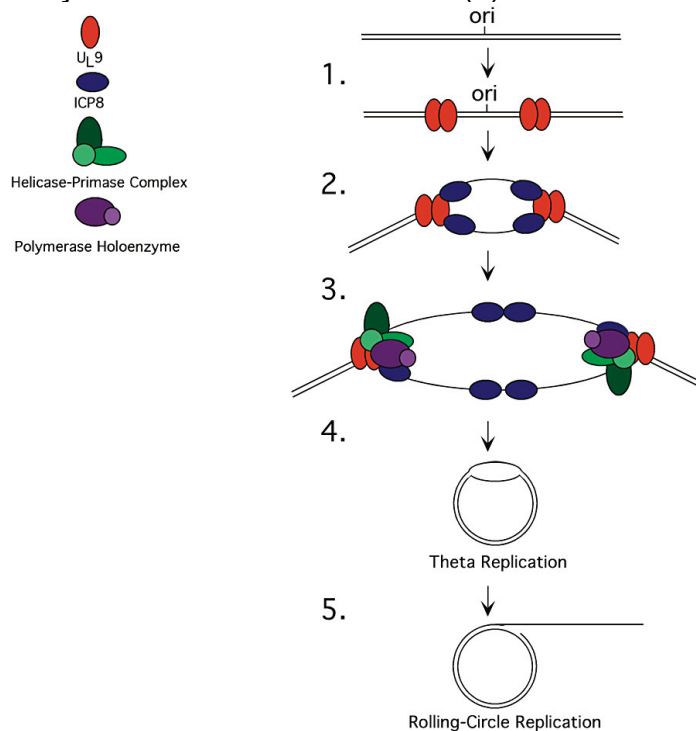
Fonte: Efstathiou e Preston (2005).

As proteínas codificadas pelos genes  $\alpha$ , acumuladas em quantidades suficientes no citoplasma, retornam ao núcleo e estimulam a transcrição e tradução dos genes  $\beta$ , sendo regulatórias de toda síntese proteica e genômica dos vírus. As proteínas  $\beta$  são importantes para a síntese de novas moléculas de DNA, pois incluem as enzimas necessárias para a replicação do genoma viral: DNA polimerase, proteína de ligação a fita-simples de DNA (ICP8), helicase-primase DNA, proteína de ligação a origem (UL9) e as enzimas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos. Quando níveis suficientes das proteínas  $\beta$  sintetizadas se acumulam na célula infectada, a replicação do DNA viral ocorre. A síntese do DNA viral começa pouco depois do aparecimento das proteínas  $\beta$  e são detectadas a partir das 3 primeiras hpi e continuam até 15 hpi, com a maior parte do DNA sendo sintetizada no período de 7 -10 hpi. A expressão dos genes virais termina com o aparecimento das proteínas  $\gamma$ , que constituem as proteínas estruturais do vírus, como as proteínas do tegumento, capsídeo e glicoproteínas (BOEHMER; LEHMAN, 1997). As proteínas  $\gamma$ , reguladas pelas proteínas  $\alpha$  e  $\beta$ , são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e as proteínas do envelope ainda são glicosiladas no complexo de Golgi (WIGG; MIRANDA, 2008)

Nas primeiras 0,5 hpi e na ausência de síntese proteica, o DNA viral se acumula no núcleo e adota uma configuração circular (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007). A circularização do genoma é um pré-requisito para a replicação

viral e requer a ação da Ori<sub>L</sub> e Ori<sub>S</sub> e da UL9 (BOEHMER; LEHMAN, 1997). Ao penetrar no núcleo, a proteína UL9 liga-se aos dois sítios da Ori e associa-se a ICP8. A helicase/primase é então recrutada para a origem, promovendo o desenrolamento do DNA e síntese de um iniciador (primer) para a síntese do DNA. Consequentemente há a formação de uma bolha permitindo que o complexo da polimerase inicie a síntese do DNA. Esse mecanismo de replicação é chamado de “círculo rolante” (Figura 11) que produz concatâmeros de alto peso molecular e a clivagem destes, em unidades monoméricas, está relacionada ao empacotamento do DNA no capsídeo (LEHMAN; BOEHMER, 1999; STRANG; STOW, 2007). Ocorre um remodelamento da estrutura nuclear com modificações profundas e o DNA genômico inicia sua replicação próximo ao domínio nuclear 10 (ND10). O DNA pode localizar-se nessa região sem necessidade de síntese de proteínas, e a transcrição dos genes  $\alpha$  pode ter início nesse local.

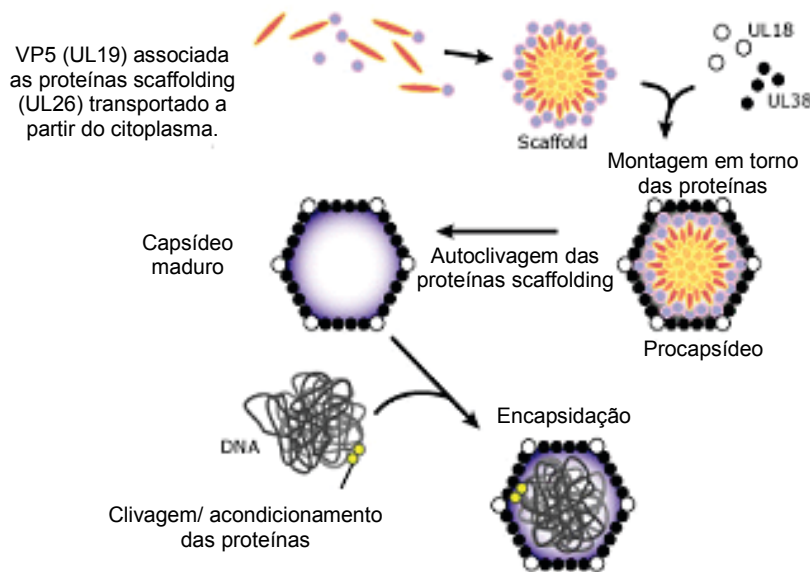
**Figura 11** – Mecanismo de replicação círculo rolante. 1) A proteína de ligação a origem, UL9, liga-se a locais específicos (ori) e começa a desenrolar o DNA. 2) A proteína de ligação a cadeia simples de DNA, ICP8, é recrutado para o DNA desenrolado. 3) UL9 e ICP8 recruta as proteínas da replicação (complexo helicase-primase e polimerase) para a forquilha de replicação. 4) síntese do DNA inicialmente pelo mecanismo de replicação teta, e em seguida, para um mecanismo de replicação do círculo de rolamento (5).



Fonte: TAYLOR et al. (2002)

A formação do capsídeo ocorre quando a VP5 se associa às proteínas de suporte (scaffolding) e a outras proteínas. Ocorre a autoclivagem proteolítica das proteínas scaffolding, liberando o capsídeo vazio (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007) e a seguir o DNA viral é empacotado dentro do capsídeo (Figura 12).

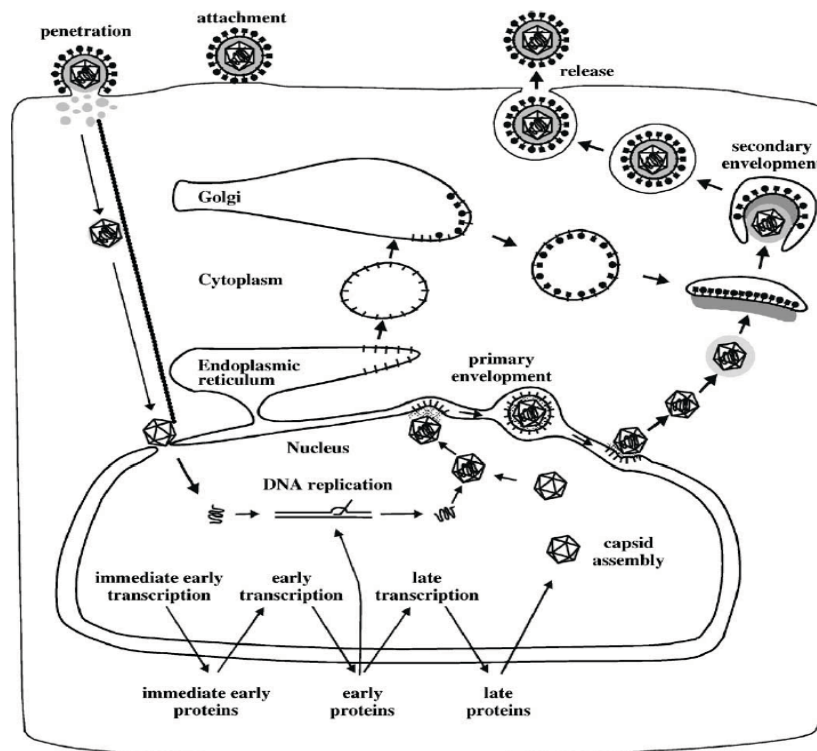
**Figura 12** – Montagem do capsídeo e empacotamento do genoma do HSV.



Fonte: Wigg e Miranda (2008).

A primeira etapa de maturação ocorre na membrana nuclear interna que fornece ao nucleocapsídeo um envelope primário (METTENLEITER, 2004).). O envelopamento secundário é frequentemente observado nas proximidades do aparelho de Golgi, tendo sido proposto que as vesículas nas quais ocorre o brotamento são derivadas deste aparato (METTENLEITER, 2006) (Figura 13). A liberação da progênie viral causa lise da célula e destruição final da célula infectada (PEÑA et al., 2010). A replicação total dos herpesvírus demora em torno de 18 a 20 horas.

**Figura 13** – Esquema representativo da formação do envelope por duplo envolvimento e liberação das partículas virais do HSV da célula hospedeira.



Fonte: Mettenleiter (2004).

### 3.3 VÍRUS HERPES SIMPLEX 1 E 2

O vírus herpes simplex foi o primeiro herpesvírus humano a ser descrito e mais estudado por mais de 25 séculos em relação às características gerais da doença, patogenia da infecção, epidemiologia, taxonomia e aspectos moleculares. Hipócrates (460/377 a.C.), na antiga Grécia, documentou as lesões, denominando-as de herpes (derivado do grego herpein que significa rastejar, réptil), em referência ao aparecimento das vesículas na pele. O historiador Heródoto (484/425 a.C.) descreveu a doença como capaz de causar febre e pequenas vesículas na boca e ulcerações nos lábios, denominando-a *herpes febrilis*. A descrição da ocorrência da doença em órgãos genitais somente foi atribuída a John Astruc, por volta de 1736, conhecida desde então como herpes genital. Fournier descreveu sobre o diagnóstico e o tratamento do herpes genital. Coube a Vidal, em 1873, a comprovação de que o herpes era infeccioso e podia ser transmitido entre pessoas (PELLETT; ROIZMAN, 2007).

Entre 1920 e 1960, os estudos sobre as manifestações da doença tiveram expansão devido à descoberta de uma grande variedade de hospedeiros laboratoriais, tais como, ratos, camundongos, coelhos, cobaias, aves, e, posteriormente, o estabelecimento da infecção em cultura de células fibroblásticas, epiteliais, nervosas e em ovo embrionado. Estes achados possibilitaram novas abordagens ao estudo das doenças (WIGG; MIRANDA, 2008). Em 1968, Nahmias e Dowdle demonstraram que havia dois tipos de herpesvírus, com base em suas diferenças antigênicas e biológicas (PELLETT; ROIZMAN, 2007).

O homem é o único reservatório do HSV-1 e -2. A doença se manifesta através da formação de vesículas nos lábios, boca, nariz, olhos, rosto, órgãos genitais, nádegas e outras partes do corpo. A transmissão ocorre por contato direto, por compartilhamento de objetos contaminados e por auto-inoculação. Os indivíduos são expostos ao HSV-1 normalmente a partir de seis meses a três anos de idade, através da saliva, ao passo que o HSV-2 é adquirido, principalmente, na fase da adolescência, coincidindo com o início da atividade sexual. A penetração no hospedeiro ocorre através de microfissuras ou escarificações da pele e mucosas e a primeira replicação se dá nas células epiteliais locais, seguida de disseminação pelas vias hematogênica e neurogênicas (MEHNERT; CANDEIAS, 2005). Os HSV-1 e 2 causam uma variedade de infecções em humanos, normalmente, benignas, porém, em indivíduos transplantados, imunocomprometidos ou pacientes com câncer, apresentam alto risco para infecções severas, além disso, contribui na propagação do HIV (KUO et al., 2008).

A lesão herpética típica inicia-se com uma pequena mancha pápulo-eritematosa que evolui para uma vesícula que contém, no seu interior, um líquido muito rico em partículas virais infecciosas e desaparece em até três semanas, em indivíduos imunocompetentes. A evolução depende da imunidade do hospedeiro. Na infecção por HSV-1, além das lesões vesiculares e ulcerativas, pode ocorrer gengivoestomatite, edema, linfadenopatia localizada, anorexia e mal-estar, principalmente na primoinfecção (MELL, 2008). No herpes genital, as infecções assintomáticas são mais frequentes e a manifestação clínica clássica primária é caracterizada por agrupamentos bilaterais de pápulas eritematosas e vesículas na genitália, geralmente, seis dias após o contato sexual (BEAUMAN, 2005). Nas mulheres, as úlceras podem ocorrer no meato uretral, lábios, períneo e nos homens as úlceras geralmente aparecem na glande e corpo do pênis (BEAUMAN, 2005). As

mulheres que adquirem a infecção no final de gestação e são soronegativas possuem maior probabilidade de transmitir o vírus para o bebê, do que durante uma reativação, levando ao herpes neonatal (GUPTA; WARREN; WALD, 2007). No entanto, na maioria dos casos, o herpes neonatal é adquirido no momento do parto de mães com infecção genital assintomática (ANZIVINO et al., 2009), ocasionando a infecção generalizada, encefalite e a ceratoconjuntivite do recém-nato (WIGG; MIRANDA, 2008).

Segundo Looker, Garnett e Schmid (2008), cerca de 90% da população entra em contato com o HSV-1, porém apenas 40% dos infectados desenvolvem as manifestações. Além disso, mais de 500 milhões de pessoas estão infectadas com o HSV-2 e 23 milhões de novas infecções ocorrem a cada ano. Bernstein et al, (2012) demonstraram que dos 3438 pacientes avaliados, 183 possuíam o HSV, sendo 127 (3.7%) positivos para o HSV-1 e 56 (1.6%) para o HSV-2, apresentando uma razão de 2,5 e 1,1 para cada 100 pessoas, respectivamente.

A terapia administrada na fase inicial contribui para um bom prognóstico da doença, mas, para isso, é essencial a detecção precoce. O diagnóstico pode ser realizado a partir de esfregaços, pelo isolamento do vírus, por técnicas imunológicas como a imunofluorescência ou moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (MADHAVAN et al., 1999).

O vírus pode ser isolado das vesículas e, eventualmente, de lesões que já se apresentam na forma de crostas. Os materiais clínicos são coletados por punção do líquido das vesículas ou por aplicação de swab às lesões e, posteriormente, inoculação direta em cultura de células suscetíveis, após descontaminação do material. As alterações citopatológicas consistem em modificações da estrutura nuclear e marginalização da cromatina. São observados corpúsculos de inclusão intranucleares acidófilos de Cowdry A, assim como a formação de sincícios (WHITLEY; ROIZMAN, 2001). A distinção entre os sorotipos 1 e 2 pode ser feito por imunofluorescência ou PCR, com 100% de especificidade e 99% de sensibilidade (PEÑA et al., 2010).

Os agentes antiherpesvirais desenvolvidos foram os análogos de nucleosídeos, iodo-desoxiuridina, bromo-desoxiuridina, trifluridina e o acicloguanosina (aciclovir), este último, de referência, mesmo após trinta anos de seu desenvolvimento (SCHAECHTER et al., 2002).

O aciclovir é um inibidor da DNA-polimerase de alguns herpesvírus. No momento da infecção é monofosforilado pela timidino-quinase viral e, posteriormente, di e tri fosforilado pelo homólogo celular transformando-o em aciclovir-TP. Este compete com a guanosina-TP, inibindo a DNA-polimerase viral, pela sua incorporação à cadeia de DNA viral nascente, interrompendo-a em função da impossibilidade de incorporação de novos nucleotídeos (o aciclovir não possui a -OH na posição 3' necessária à ligação de novos nucleotídeos). Portanto, a síntese de DNA viral é interrompida. Mutações na timidino-quinase ou DNA polimerase virais podem selecionar mutantes resistentes ao aciclovir (WIGG, 2008b), observado, principalmente, em pacientes imunocomprometidos, que fazem uso constante da droga.

Devido à ampla distribuição da doença, facilidade de transmissão e dificuldades no desenvolvimento de vacinas eficazes, a busca de novos medicamentos tem sido também a tônica na abordagem ao tratamento da infecção por HSV (SU et al., 2008). Soma-se a estes aspectos, a seleção de mutantes resistentes às drogas comercialmente disponíveis para o controle da doença. Ao longo dos últimos anos, grandes esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de estratégias para a identificação de novos antivirais, e, que, também sejam ativos sobre os vírus em latência (BILLAUD; THOUVENOT; MORFIN, 2009).

### 3.4 HERPESVÍRUS BOVINO

Quatro são os herpesvírus que infectam bovinos: o herpesvírus bovino (BoHV)-1, BoHV-2, BoHV-4 e BoHV-5. Os tipos 1 e 5 são os mais disseminados e pertencem ao gênero *Varicellovirus*, o BoHV-2 pertence ao gênero *Simplexvirus* e é responsável pela mamilite herpética bovina, o BoHV-4 pertence a subfamília *Gammaherpesvirinae* e ainda não foi atribuído nenhuma doença específica.

O BoHV-1 é subdivido em BoHV-1.1, BoHV-1.2a e BoHV-1.2b responsáveis pela rinotraqueíte infecciosa bovina, conjuntivite, aborto, vulvovaginite pustular infecciosa, balanopostite infecciosa e manifestações neurológicas. O BoHV-5 é classificado em BoHV-5a, BoHV-5b e BoHV-5na/nb e causam doenças neurológicas (D'ARCE et al., 2002; ENGELS; ACKERMANN, 1996; GAY; BARNOUIN, 2009; HENZEL et al., 2008; PELLETT; ROIZMAN, 2007). Ambos os

tipos, portanto, representam um grande impacto econômico na bovinocultura mundial. As infecções pelo BoHV-1 podem ser transmitidas pelo contato direto e indireto, pois o vírus é disseminado através de secreções respiratórias, oculares, genitais e leite, sendo excretado em altos títulos, durante a infecção aguda (FRANCO; ROEHE, 2007). A transmissão do BoHV-5 provavelmente ocorre de modo semelhante à do BoHV-1 (RISSI et al., 2006).

Embora existam diferenças na prevalência e incidência da infecção pelo BoHV-1, este encontra-se presente em todos os continentes. As infecções pelo BoHV-5, aparentemente, são importantes causa de morbidade e mortalidade somente em países do hemisfério Sul (D'ARCE et al., 2002; FRANCO; ROEHE, 2007). No Brasil, o BoHV-1 foi isolado pela primeira vez a partir de um caso de vulvovaginite no ano de 1978, no estado da Bahia. O BoHV-5 foi relatado primeiramente em 1989 a partir da ocorrência de surtos de meningoencefalite no Rio Grande do Sul, ambos os vírus vêm sendo diagnosticados desde então. Estudos vêm revelando uma elevada frequência de BoHV-5 no Rio Grande do Sul (HOLZ et al., 2010), embora ainda se desconheça a sua real prevalência no Brasil, principalmente devido à reatividade sorológica cruzada com BoHV-1. Estima-se que o BoHV-1 infecte 50-90% da população de gado brasileiro (OLIVEIRA et al., 2011).

Devido as perdas significativas na pecuária, muitos países criaram barreiras comerciais que tentam prevenir a disseminação do BoHV. Contudo, no Brasil, o controle da infecção é dificultado por vários fatores como o território extensivo com vastas áreas de rebanho. Uma vacina está disponível contra o BoHV-1, porém não é capaz de prevenir a infecção e a latência. Além disso, esses vírus apresentam sensibilidade variada aos antivirais padrões (Aciclovir – ACV, Ganciclovir – GCV e Foscarnet - PFA). O ACV é pouco ativo contra o BoHV-1 e moderado contra o BoHV-5, apresenta  $IC_{50}$  elevado e IS baixo *in vitro*, com resultados semelhantes para o GCV. O PFA é o que apresenta atividade antiviral mais pronunciada, sendo o único fármaco que, na concentração de 100 µg/mL, inibe completamente a infecção por ambos os vírus (DEZENGRINI et al., 2010).

### 3.5 LATÊNCIA

A latência dos herpesvirus é estabelecida em neurônios sensoriais, após a replicação primária, que, após fusão com a membrana, o nucleocapsídeo é

internalizado e segue, em sentido retrógrado ao estímulo nervoso, para o núcleo dos neurônios (EFSTATHIOU; PRESTON, 2005). Dependendo do sítio primário da infecção, a latência pode ocorrer no gânglio trigêmio ou no gânglio sacral. Em ambos os casos, periódicas reativações podem ocorrer, nas quais os virions migram no sentido do estímulo nervoso, resultando na replicação produtiva, no sítio inicial de infecção ou próximo a este (EFSTATHIOU; PRESTON, 2005). Uma variedade de estímulos, como, exposição à luz ultravioleta, trauma ou estresse físico e emocional e alterações hormonais podem resultar na reativação dos vírus latentes (WOO; CHALLACOMBE, 2007).

Durante a latência, nenhum dos genes virais expressos durante a fase lítica é detectado, apenas alguns transcritos associados à latência (LATs) (LACHMANN et al., 1999) constituídos de RNAs produzidos por splicings, provenientes da transcrição do gene *LAT* (WIGG; MIRANDA, 2008). Os LATs proporcionam um marcador útil para a detecção de neurônios latentemente infectados (PROENÇA et al., 2011).

Durante a infecção aguda dos gânglios, são identificadas duas populações distintas de neurônios, uma expressando genes do ciclo lítico e a outra, apenas o *LAT*, sugerindo que as vias de expressão gênica lítica e latente divergem, imediatamente, após a infecção do neurônio (LACHMANN et al., 1999). Estudos indicam que os *LATs* são transcritos em apenas uma fração (5-33%) de todas as células latentemente infectadas (SAWTELL; THOMPSON, 1992). A função dos LATs não é clara, porém, experimentalmente foi demonstrado que inibem a apoptose *in vivo* e *in vitro* (JONES, 2003) ou estão relacionados à regulação negativa da expressão de genes do ciclo lítico, nos neurônios, favorecendo o estabelecimento e manutenção da latência (PERNG et al., 2000). A quantidade de DNA do vírus no interior de cada neurônio pode variar de 1 a 100 cópias, na maioria das células, com raros neurônios contendo mais de 1000 cópias (THOMPSON; SAWTELL, 2001).

Após a penetração dos herpesvírus nas células neurais, o DNA viral é liberado no núcleo e circularizado, na forma episomal. Para que ocorra a latência, é necessário uma profunda restrição da expressão dos genes virais, porém o mecanismo ainda é desconhecido. Um mecanismo proposto para o silenciamento dos genes é a associação de heterocromatina com o genoma viral (DU CHENE et al., 2007; KNIPE; CLIFFE, 2008), apresentando histonas acumuladas nos promotores líticos, durante o estabelecimento da latência (DESHMANE; FRASER,

1989; WAGNER et al., 1988), e pelas histonas estarem na forma hipoacetilada (KUBAT et al., 2004) e enriquecidas com heterocromatina marcada com histona H3 dimetil-lisina 9 (H3K9me2) (WAGNER et al., 1988).

O DNA dos herpesvírus não é associado a histonas e é enrolado de forma toróide. Porém, nas células epiteliais, após a infecção, o genoma viral circulariza e, pelo menos, uma parte dos genomas virais associam-se as histonas (OH; FRASER, 2007). A presença da proteína VP16 do núcleo resulta no recrutamento dos fatores de remodelação de histonas (BRG1 e BRM) e nas histonas acetiltransferases (CBP e p300) para a promoção dos genes IE (HERRERA; TRIEZENBERG, 2004). As histonas que estão associadas com os genomas virais apresentam-se marcadas com a eucromatina ativa, tal como a acetilação de histona H3, nos resíduos K9 e K14 (H3K9, H3K14), H3K4me2 e H3K4me3 (HERRERA; TRIEZENBERG, 2004; KENT et al., 2004). As proteínas virais que são expressas após a infecção, ICP0 e ICP8, permitem ainda o remodelamento das histonas associadas, que podem ser removidas pelo recrutamento dos fatores de remodelamento da cromatina do hospedeiro (KENT et al., 2004)).

Nos neurônios, o genoma também se circulariza, porém, a ação da VHS não ocorre e a célula continua suas funções. Além disso, a proteína VP16 permanece no citoplasma impedindo a complexação com HCF e OCT-1, no núcleo, para a ativação dos genes (WYSOCKA; HERR, 2003). O DN A se associa às histonas modificadas, principalmente por metilação e acetilação, presentes na cromatina nuclear e vão regular a expressão dos transcritos associados à latência (LATs). Os níveis de histonas acetiladas nos promotores líticos são baixos e a expressão do *LAT* promove a montagem de heterocromatina na forma de histona H3K9me2, H3K9me3 e H3K27me3 nos promotores dos genes líticos (WANG et al., 2005).

Ainda associado à latência, alguns neurônios são dotados de outra proteína octamérica, a Oct-2, que promove efeito contrário a Oct-1, reprimindo a transcrição dos nucleotídeos (PEREIRA, 1996). Além disso, a latência ocorre em neurônios dependentes do fator de crescimento dos nervos (nerve growth factor – NGF), e na ausência deste fator ocorre uma rápida expressão viral (WIGG; MIRANDA, 2008). Nos neurônios em que há predomínio da proteína Oct-2 há a dependência do NGF, pois a reativação pode ter sua origem, na redução do nível de fator de NGF dos neurônios com excesso da Oct-2, permitindo que a Oct-1 se torne

predominante e permita a transcrição do genoma viral (PEREIRA, 1996; WAGNER; GUZOWSKI; SINGH, 1995). A reativação é dependente de fatores de transcrição virais, celulares e outros, como traumas teciduais, devido a elevação local de prostaglandinas das classes E e F e são liberadas nos espaços extracelulares, ativando a liberação intracitoplasmática de AMPc, que por sua vez ativa a proteín-quinases celulares, com ativação da expressão de genes virais (WIGG; MIRANDA, 2008).

## 4 ANTIVIRAIS

O estudo de antivirais teve início na década de 50 apesar do restrito conhecimento da biologia dos vírus e da toxicidade dos primeiros quimioterápicos (JONES, 1998). Pensou-se, em princípio, que seria impossível obter um agente antiviral que não interferisse no metabolismo celular. As primeiras drogas eram capazes de atuar na síntese do DNA viral, mas também interferiam na síntese do DNA da célula. Assim, o desenvolvimento de novos antivirais esbarrava na dificuldade em se obter drogas com atividade seletiva (WIGG, 2008b).

O desenvolvimento dos antivirais, propriamente dito, ocorreu a partir da identificação de enzimas codificadas pelos vírus, essenciais para a replicação viral, mas, diferentes das enzimas celulares (RÁCZ, 2005). Por volta de 1960, foram desenvolvidos os compostos análogos halogenados de nucleosídeos. A iodo-desoxiuridina (IDU) e o trifluorotimidina (TFT) foram introduzidos no mercado para o tratamento de infecções herpéticas, porém, de emprego tópico, devido a sua toxicidade, quando utilizado via sistêmica (KAUFMAN; HEIDELBERGER, 1964). Seguiu-se ao desenvolvimento de outro análogo de nucleosídeo, considerado como antiherpético de primeira geração, a adenina-arabionosídeo (Ara-A) (vidarabina), bem tolerado para uso sistêmico e durante muito tempo usado para tratamento de encefalite herpética, herpes neonatal e varicela-zoster (WHITLEY et al., 1980, 1992).

As pesquisas por novos compostos continuaram, e, no final da década de 70, foi desenvolvido o primeiro antiviral com elevado índice de seletividade, a acicloguanosina - Aciclovir (ACV), representando um marco no estudo da terapia antiviral e incentivando a busca de novas drogas com efeito seletivo similar (JONES, 1998). O ACV, além de seus derivados, é ainda hoje o fármaco de escolha para infecções herpéticas.

Na década de 80, com a elucidação da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e a descoberta do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), as pesquisas para o desenvolvimento de uma terapia específica, para a referida infecção fizeram-se necessárias, haja vista, os elevados índices de morbidade e mortalidade. Aliado a estes fatores, a melhor compreensão da biologia geral e molecular do vírus promoveram o desenvolvimento de vários antivirais, jamais visto na história.

Teoricamente, os antivirais podem agir em vários estágios do ciclo de replicação: 1) adsorção do vírus, bloqueio de receptores celulares e fusão do envelope; 2) bloqueio do desnudamento e sequente liberação do ácido nucleico viral; 3) inibição da transcrição inicial, tendo como alvo algumas enzimas virais precoces, como a DNA polimerase, transcriptase reversa e integrase; 4) interferência na tradução e no processamento de proteínas virais que regulam o ciclo replicativo; 5) bloqueio da síntese de ácido nucléico viral; 6) interferência na tradução e o processamento de proteínas virais estruturais e/ou funcionais, agindo no processo de clivagem ou glicosilação; 7) inibição da montagem e maturação das partículas virais e 8) inibição da liberação da progênie viral (RÁCZ, 2005; WIGG, 2008b).

Atualmente, 45 compostos estão aprovados para a utilização como antiviral e outros em fase de avaliação (ANTONELLI; TURRIZIANI, 2012). A maioria destes compostos foram introduzidos nos últimos 20 anos e são usados no tratamento de pacientes infectados pelo HIV, vírus das hepatites B e C, herpes simplex, varicela-zoster, citomegalovírus, vírus respiratório sincicial e influenza (ANTONELLI; TURRIZIANI, 2012; DE CLERQ, 2004).

A variedade de antivirais disponíveis está voltada para um número pequeno de vírus e muitos dos quais são, no aspecto epidemiológico, relativamente, controlados, porém, a seleção de mutantes vem ocasionando efeito adverso e cepas virais resistentes aos antivirais têm sido uma das preocupações atuais.

Bright et al. (2005) demonstraram a ocorrência de Influenza A (H3N2) resistente a Adamantadina, em cepas isoladas entre 1994 a 2005. Fujisak et al. (2012) também verificaram cepas resistentes aos inibidores de neuraminidase (Oseltamivir, Zanamivir e Peramivir). A resistência do HIV aos antirretrovirais é a principal causa de falha no tratamento da AIDS e a combinação dos medicamentos, na forma de coquetéis, tem demonstrado uma diminuição na seleção de cepas resistentes (GULICK et al., 1997; HIRSCH et al., 1998, 2000, 2003). O aparecimento de cepas de HSV resistentes ao ACV foi relatado pela primeira vez por Coen e Schaffer (1980), sendo geralmente de ocorrência relevante em pacientes imunocomprometidos. Nesses pacientes, a prevalência de resistência é cerca de 5%, mas pode chegar a 14-30%, em pacientes submetidos a transplantes de medula óssea (CHAKRABARTI et al., 2000). Em pacientes imunocompetentes, a resistência é rara, em níveis abaixo de 1% da população (COLLINS; ELLIS, 1993; DANVE-SZATANEK et al., 2004; ENGLUND et al., 1990). A maioria das cepas mutantes

analisadas apresenta mutações na TK (95%) e algumas na DNA polimerase viral (5%), segundo Frobert et al. (2008), e, ainda segundo estes autores, foi demonstrado que de 81 cepas isoladas de HSV-1, 14 eram resistentes e 67 sensíveis. As cepas resistentes revelaram mutações no gene da TK, sendo 8 com adição/deleção e 4 com substituição no referido gene. Nenhuma das amostras apresentou alterações no gene da DNA polimerase.

A seleção de cepas virais resistentes, a emergência e re-emergência de viroses importantes na medicina humana e animal e a procura por substâncias com maior ação seletiva, têm incentivado as pesquisas, no desenvolvimento de novos e promissores agentes antivirais. Uma linha de pesquisa que vem se destacando intensamente é o uso de produtos naturais. Extratos ou substâncias de origem de plantas, bactérias, fungos, e, da fauna e flora marinha têm apresentado uma enorme variedade de constituintes químicos ativos, sendo uma área potencial, para o estudo de antivirais.

#### 4.1 PRODUTOS NATURAIS

O uso dos produtos naturais como fonte de tratamento para os diversos males é uma prática ancestral. Evidências arqueológicas indicam que a utilização de plantas para fins medicinais, representam a mais velha forma de medicação, desde os tempos pré-históricos (HALBERSTEIN, 2005). O papiro de Ébers, escrito, aproximadamente, em 1500 a.C., contém cerca de 900 receitas de medicamentos, sendo a maioria a base de plantas, e, até o século XIX, os recursos disponíveis para o tratamento das enfermidades eram a base de produtos naturais. Ilustrado pela farmacopeia brasileira, demonstravam-se apenas 30 produtos de origem mineral, 11 de origem animal, porém, cerca de 400 espécies de origem vegetal (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2001). No Brasil, desde a época do descobrimento, os colonizadores relatavam o uso frequente de ervas pelos índios. O conhecimento do uso das plantas medicinais pelos indígenas foi enriquecido pelas informações trazidas pelos primeiros colonizadores europeus. Os padres jesuítas montaram as primeiras boticas que davam assistência aos colonizadores e aos indígenas (CAMARGO, 1985).

Somente em 1807, com a descoberta das substâncias ativas presentes nas plantas medicinais, pelo alemão Woohler, é que ocorreu o início da

era das sínteses químicas dessas substâncias, objetivando-se além do lucro, a obtenção de quantidades maiores de princípios ativos. O domínio e o aprimoramento das técnicas de síntese proporcionaram em 1897, a produção por Kolbe, do primeiro medicamento sintético, o ácido acetilsalicílico, inspirado na salicilina, substância ativa da planta *Salix alba* L (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2001). Com a evolução dos medicamentos sintéticos, de fácil obtenção e menos dispendiosos, o uso das plantas com fins terapêuticos entrou em decréscimo, uma vez que as indústrias farmacêuticas auferiam grandes lucros na produção destes medicamentos.

Entretanto, o interesse na pesquisa com os produtos naturais foi revertido e incentivado, pela possibilidade de descoberta de novos princípios ativos, mais seletivos e com menos efeitos colaterais, com mecanismos de ação diversificados e tratamento de infecções produzidas por cepas resistentes. Os produtos naturais contêm uma variedade de princípios ativos e que, em particular, na sua forma semipurificada pode proporcionar efeitos diferentes, porém, concomitantes, através de diversos compostos. Por exemplo, a ação do produto em várias etapas da replicação viral, concomitantemente, evidenciando benefícios, e, ao mesmo tempo, dificultando a seleção de mutantes resistentes.

#### 4.2 PRODUTOS NATURAIS COM ATIVIDADE ANTIVIRAL

O interesse no desenvolvimento de antivirais, a partir dos produtos naturais, ocorreu na Europa, em 1952, quando a Boots Drugs Company, na Inglaterra, levou a efeito um estudo da ação de cerca de trezentos tipos de plantas, contra o vírus da influenza A, descrevendo pouco mais de dez extratos, que inibiram a replicação viral (CHANTRILL et al., 1952). Além disso, os primeiros antivirais sintéticos foram produzidos a partir da descoberta da espongotimidina e espongouridina, obtidos da esponja marinha *Tethya crypta* (BERGMANN; FEENEY, 1950, 1951). Esses achados levaram a síntese da citarabina (Ara-C) e vidarabina (Ara-A) (PRIVAT de GARILHE; DE RUDDER, 1964) e, posteriormente, a azidotimidina (Zidovudina) (HORWITZ; CHUA; NOEL, 1964) e a acicloguanosina (ACV) (ELION et al., 1977).

Atualmente, os organismos marinhos como bactérias, algas, esponjas, fungos e corais são intensamente estudados visando à descoberta de

novos medicamentos de uso geral. Uma das particularidades desse grupo é a ocorrência neles, por exemplo, de polissacarídeos naturalmente sulfatados. Além deles, os extratos vegetais apresentam um amplo espectro de ação devido à presença de princípios ativos que podem agir de forma sinérgica. A ação antiviral de compostos como flavonóides, taninos, proteínas, polissacarídeos e alcalóides tem sido demonstrado (JASSIM; NAJI, 2003).

Cecílio et al. (2012) demonstraram que os extratos etanólicos de quatro plantas nativas do cerrado brasileiro (*Byrsonima verbascifolia*, *Myracrodruon urundeuva*, *Eugenia dysenterica* e *Hymenaea courbaril*), com elevado teor de taninos, flavonoides, saponinas, cumarinas e terpenos, inibiram o rotavírus, em células MA-104. Cepas de Influenza, sensíveis e resistentes a Amantadina e Oseltamivir, foram inibidas com extrato de *Psidium guajava* (SRIWILAIJAROEN et al., 2012). Os polifenóis de extratos de *Marrubium deserti* impediram a infecção do vírus Cocksackie B3 (EDZIRI et al., 2012). Yang et al. (2012) demonstraram o efeito antiviral do composto polifenólico punicalagina de *Punica granatum* contra o Enterovírus 71 *in vitro* e *in vivo*. Esse mesmo composto também inibiu a replicação do HIV (NONAKA et al., 1990), vírus influenza (HAIDARI et al., 2009) e HSV (LIN et al., 2011). A estricnina, um tanino hidrolisado obtido do chá verde, mostrou efeito inibitório para o vírus Influenza (SAHA et al., 2010a).

Lv et al. (2009) demonstraram que uma hemolisina isolada do basidiomiceto *Pleurotus nebrodensis* apresentou atividade contra o vírus HIV *in vitro* e Nance, Siwak e Shearer (2009) mostraram que catequinas isoladas do chá verde inibiram a ligação da gp120 do HIV aos receptores CD4, das células T. Alen et al. (2009) verificaram que vários produtos de plantas como, lecitinas, manose e N-acetilglucosamina inibiram a adsorção do vírus da dengue *in vitro*.

Jain et al. (2008) demonstraram que extratos da planta *Hippophae rhamnoides* apresentaram atividade contra o vírus da dengue 2 (DEN2). O polissacarídeo sulfatado *fucoïdana*, obtido de alga marinha *Cladosiphon okamuranus*, foi efetivo contra o DEN2, porém não apresentou atividade aos outros sorotipos (HIDARI et al., 2008). O extrato etanólico da folha de *Myrica rubra* mostrou atividade contra o vírus Influenza em células MDCK (MOCHIDA, 2008).

A atividade anti-poliiovírus foi demonstrada por compostos naturais, como os polissacarídeos de *Agaricus brasiliensis* (FACCIN et al., 2007) e de *Lentinus edodes* (RINCÃO et al., 2012). Foram efetivos, da mesma forma, os

extratos de *Coffea arabica* (UTSUNOMIYA et al., 2008), *Heteropteris aphrodisiaca* (MELO et al., 2008), *Lippia alba* (ANDRIGHETTI-FROHNER et al., 2005), *Dianella longifolia* (SEMPLE et al., 2001) e *Anagallis arvensis* (AMOROS; FAUCONNIER; GIRRE, 1987).

A atividade antiherpética dos produtos naturais tem sido amplamente pesquisada, especialmente para os compostos que apresentam mecanismos de ação diferentes dos análogos de nucleosídeos, ou que possam ser utilizados em combinação com estes (CHOU, 2006). Além disso, diversos compostos naturais têm demonstrado atividade contra cepas de HSV resistentes ao ACV.

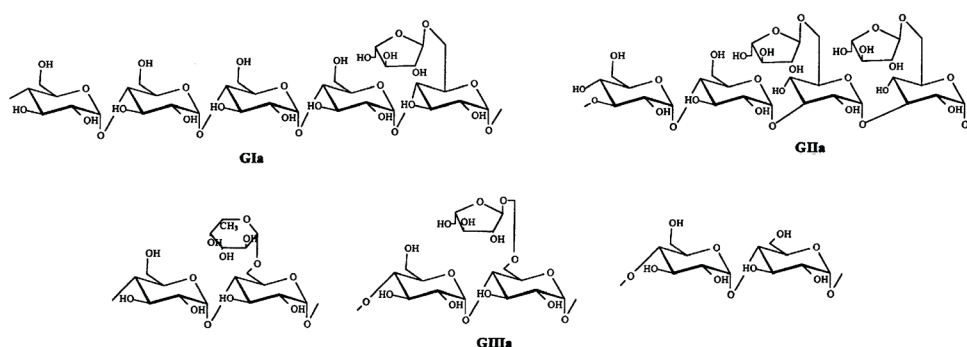
Bertol et al. (2011) testaram cerca de 10 compostos isolados da planta *Digitalis lanata* e demonstraram atividade antiviral para cepas de HSV-1 sensível e resistente ao ACV, em concentrações inibitórias (IC<sub>50</sub>) abaixo de um micromolar. Um dos compostos, glucoevatromonossídeo, inibiu a replicação viral por até 12 h.p.i., apresentando efeito na síntese de proteínas virais (ICP27, UL42, gB, gD), bloqueio da liberação do vírus e redução da disseminação célula-célula. Este efeito pode ser atribuído a alteração eletroquímica da Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase e redução do K<sup>+</sup> intracelular, provocando inicialmente um dano na célula hospedeira e sequente inibição da replicação viral.

Gescher et al. (2011) analisaram o extrato de *Myrothamnus flabellifolia*, rico em polifenóis (proantocianidinas, taninos hidrolisáveis e flavonóides), contra a infecção de HSV-1 e mostraram a atividade virucida do extrato e na penetração do vírus em células Vero, supostamente, pela interação dos produtos com alguns aminoácidos das glicoproteínas virais, principalmente gD, necessárias para entrada na célula. Silva et al. (2010) verificaram a atividade antiherpética da fração C-glicosilflavonóide extraído de *Cecropia glaziovii*. Esta fração também é rica em polifenóis e mostrou efeito inibitório na adsorção à célula e na etapa de penetração, porém não apresentou atividade virucida.

Muitos experimentos vêm relatando o efeito dos polissacarídeos e seus derivados, principalmente, os sulfatados. Os polissacarídeos (PLS), polímeros longos constituídos principalmente de cadeias de β-D-glicanas (Figura 14), possuem uma vasta gama de propriedades biológicas importantes na terapia geral, e são conhecidos por afetar a replicação de vírus humanos e animais (SHANNAN, 1984). As propriedades antivirais dos PLS, incluindo os derivados sulfatados (PLSS) são conhecidas por quase 50 anos, principalmente em vírus envelopados (SINHA et

al., 2010). Estas moléculas, com cargas negativas, exercem seu efeito inibitório pela interação com as cargas positivas do vírus, prevenindo a adsorção e/ou penetração na célula hospedeira (EHRESMANN; DEIG; HATCH, 1979; GHOSH et al., 2009; HATCH et al., 1977). Além disso, a exposição das células aos PLS pode alterar a polaridade e/ou aumentar a hidrofobicidade da membrana, influenciando da mesma forma a penetração dos vírus (BIESERT et al., 1990).

**Figura 14** – Estrutura química de polissacarídeos (GIa, GIIa e GIIIa) isolados do extrato aquoso da casca de *Melia azadirachta*.



Fonte: Biswas et al. (2002)

Os PLS são encontrados naturalmente sulfatados, como aqueles descritos em organismos marinhos, ou serem quimicamente modificados. Outras modificações também podem ser realizadas, como a metilação e carboximetilação, normalmente, para aumentar a solubilidade dos compostos (LIU et al. 2010; WANG et al., 2009) e/ou melhorar a atividade biológica, incluindo a antiviral (ZHANG et al., 2004). Saha et al. (2010b) demonstraram que a sulfatação de um PLS isolado da *Azadirachta indica* aumentou o efeito antiviral contra o herpesvírus bovino. A sulfatação fornece uma densidade de cargas negativa maior do que a encontrada na forma original, interferindo de forma mais eficiente, nas interações eletrostáticas entre as glicoproteínas virais (carga positiva) e os receptores celulares, como o sulfato de heparana (carga negativa).

A atividade antiviral do PLS isolado de *A. brasiliensis* foi demonstrada, em células HEp2, contra o poliovírus (FACCIN et al., 2007) e herpesvírus bovino (MINARI et al., 2011). Yamamoto et al. (2013) avaliaram o mesmo PLS de *A. brasiliensis* e suas formas sulfatadas e carboximetiladas contra o HSV e verificaram que apenas a sulfatação mostrou-se um pouco mais efetiva. Resultado semelhante foi encontrado por Cardoso et al. (2011), porém com o PLSS

isolado do mesmo basidiomiceto, sendo efetivo, inclusive, para uma cepa de HSV-1 resistente ao ACV. As atividades antivirais de outros PLSS, como os de *Gracilaria corticata* (CHATTOPADHYAY et al., 2008); *Padina tetrastromica* (KARMAKAR et al., 2010); *Scinaia hatei* (MANDAL et al., 2010); *Laminaria angustata* (SAHA et al., 2012) também já foram relatados contra HSV.

Além de interferirem na adsorção e penetração dos vírus, os PLSS também podem inibir a transcriptase reversa (TR) de retrovírus (YASUHARA-BELL; LU, 2010), tal como demonstrado pela carragenina, do extrato aquoso da alga marinha vermelha, *Schizymenia californica* (BRUHN et al., 1996; NEUSHUL, 1991).

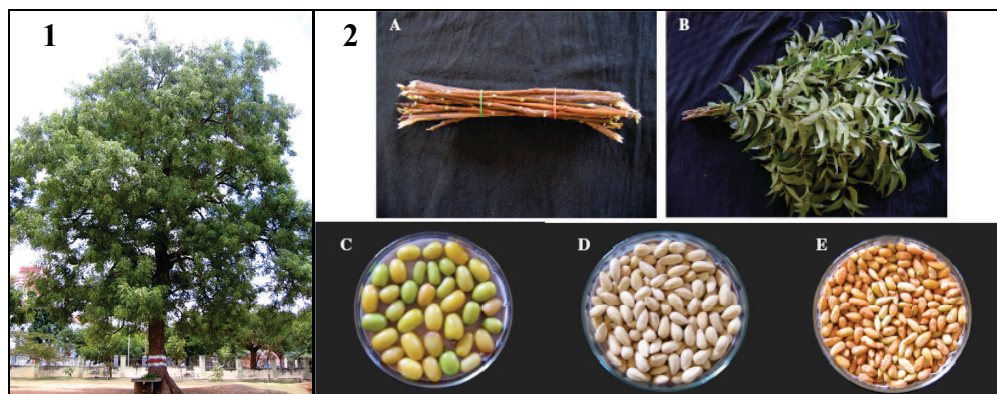
Alguns PLS inibem a infecção viral por induzirem o interferon (IFN) *in vivo* e *in vitro* (DE CLERCQ; LUCZAK, 1976; DE SOMER et al., 1968; GONZALEZ; ALARCON; CARRASCO, 1987; GUEZENNEC et al., 1994). Foi sugerido que as  $\beta$ -glucanas o fazem pela interação com receptores, como a dectina-1 (ADAMS et al., 2008; BROWN; GORDON, 2003; WILLIAMS; LOWMAN; ENSLEY, 2004). Neste contexto, Jung et al. (2004) demonstraram que a  $\beta$ -glucana de *S. cerevisiae* inibiu profilaticamente a infecção do vírus influenza suíno (SIV) pela indução do IFN gama. Além do INF, foi considerada a participação de fator de necrose tumoral (TNF) e interleucinas 12 e 18, nas infecções virais (BABA et al., 1988). Yamamoto et al. (2013) observaram ainda que, de três frações polissacarídicas (F1-F3) de *A. brasiliensis*, que apresentavam, na ordem, quantidades crescentes de  $\beta$ -glucanas, a F3 foi a que mostrou maior efeito antiviral para HSV-1 e BoHV-1. PLSS de organismos marinhos, como os obtidos das bactérias *Bacillus licheniformis* e *Geobacillus thermodenitrificans* inibem a replicação do HSV-2, pela regulação da expressão de citocinas pró-inflamatórias, particularmente de TH1 (ARENA et al., 2006, 2009).

#### 4.3 AZADIRACHTA INDICA

A *A. indica*, popularmente conhecida como nim, é uma árvore da família *Meliaceae* (HABLUETZEL et al., 2007), encontrada em países tropicais e subtropicais, predominantemente, na sub-região asiática (ATANGWHO et al., 2012). A árvore tem cerca de 15 a 20 m de altura, com tronco de coloração marrom-avermelhada, com grande quantidade de folhas, sempre verdes e folíolos de coloração verde-claro intenso. As flores são pequenas, brancas e possuem um odor

semelhante ao do mel. Os frutos são lisos, de cor amarelada quando maduros, com uma polpa doce envolvendo as sementes, que são compostas por uma casca e um ou mais caroços (MARTINEZ, 2002) (Figura 15).

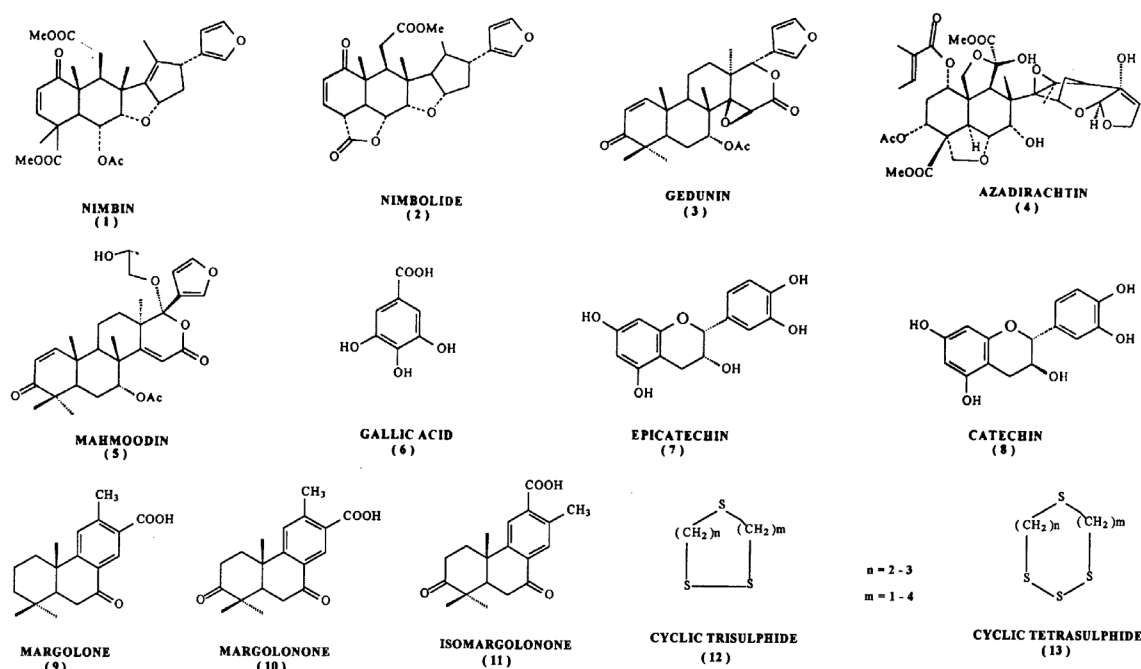
**Figura 15** – *Azadirachta indica*: Árvore (1) e seus produtos (2). A - galhos, B - folhas, C - frutos, D - semente com endocarpo, E - semente sem endocarpo.



Fonte: Girish e Shankara Bhat (2008)

As sementes e as folhas são usualmente empregadas no controle de pragas (MARTINEZ, 2002). Duas classes de compostos são isolados de diferentes partes do nim: os isoprenóides (diterpenóides e triterpenóides) que são os principais responsáveis pelos efeitos praguicidas e outro grupo constituído de proteínas, PLS, compostos sulfurosos, polifenólicos (flavonoides, cumarinas e taninos) e alifáticos (BISWAS et al., 2002). As sementes são bem conhecidas pelo alto teor lipídico e delas foram isolados os princípios ativos azadiractina, meliantriol, limoneno, odoratone e outros triterpenóides (ALIERO, 2003; CHATTOPADHYAY; BANDYOPATHYAY, 2005). A azadiractina é o mais potente isoprenóide presente no nim e atua na inibição da alimentação em insetos. Além disto, afeta o desenvolvimento das larvas, reduz a fertilidade dos adultos, altera o comportamento, causa diversas anomalias nas células, na fisiologia dos insetos e causa deterioração dos ovos, a mortalidade de larvas e adultos (MARTINEZ, 2002). As estruturas químicas de alguns princípios ativos isolados de diferentes partes do nim são demonstrados na Figura 16.

**Figura 16** – Estruturas químicas de compostos isolados de *Azadirachta indica*.



Fonte: Biswas et al. (2002)

As propriedades medicinais de *A. indica* são conhecidas por séculos, principalmente, na medicina homeopática e ayurvédica indiana, para o tratamento de tosse, febre, vômitos, náuseas, icterícia, infecção do trato urinário, gonorreia e verminoses. As cascas e folhas são usadas como tônico adstringente, antisséptico, purificador do sangue e em doenças de pele. O fruto é usado como emoliente e purgativo (CHOPRA; NAYAR; CHOPRA, 1956; KIRTIKAR; BASU, 1935; LAKSHMIPATHI, 1973; SATYAVATI; RAINA; SHARMA, 1976; THAKUR; SINGH; GOSWAMI, 1981). As propriedades medicinais da casca, folhas, flores, sementes, caules e frutas têm sido intensamente exploradas como potenciais fontes de medicamentos (NGURE et al., 2009). Algumas já estão cientificamente comprovadas para o tratamento de diabetes, hipertensão, doença cardíaca, cancro, úlceras, perturbações cutâneas, controle do nível de colesterol, formação de coágulos no sangue e antimicrobiana (ALAM; SIDDIQUI; HUSAIN, 1990; BANDYOPADHYAY et al., 2004; BISWAS et al., 2002; BHOWMIK et al., 2010; CHATTOPADHYAY, 1995; GARG et al., 1993; HARISH et al., 2008; HELMY; AMER; EL-SHAYEB, 2007; KARMAKAR; CHATTERJEE, 1994; MELATHOPOULOS et al., 2000, NWACHUKWU; IWEALA, 2009; SHARMA; SANKARAM; NWANZE, 1999; SINGH et al., 1990).

As atividades antimicrobianas de extratos de várias partes do nim já foram, cientificamente, relatadas. A atividade antibacteriana foi demonstrada com o óleo das folhas, sementes e cascas, contra bactérias gram-negativas e -positivas (CHOPRA; GUPTA; NAIR, 1952). Satyavati, Raina e Sharma (1976) e Almas (1999) descreveram o efeito *in vitro* contra *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *S. faecalis*, além de outras bactérias patogênicas (BASWA et al., 2001). O NIM-76, um contraceptivo vaginal, obtido a partir do óleo de nim, também apresentou efeito inibitório sobre bactérias, fungos e vírus (SAI RAM et al., 2000). O extrato alcoólico de folhas e sementes foram efetivos contra cepas de *Plasmodium falciparum* sensível e resistente a cloroquina (DHAR et al., 1998; RAVIKUMAR; INBANESON; SUGANTHI, 2012). O extrato etanólico da casca inibiu intensamente o *Trypanosoma brucei in vitro* e *in vivo* (MBAYA et al., 2010). Os extratos de folhas, sementes e óleo mostraram-se efetivos contra os fungos *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporium*, *Trichosporon*, *Geotricum* e *Candida* (KHAN; WASSILEW, 1987). Polaquini et al. (2006) demonstraram a ação do extrato aquoso na adesão, hidrofobicidade e formação de biofilme em *Candida albicans*.

Em relação à atividade antiviral, a pasta feita de folhas do nim era usada tradicionalmente nas infecções de pele, incluindo o tratamento de poxviroses bovina e aviária, na Índia (BISWAS et al., 2002). O efeito do extrato aquoso de folha foi relatado contra os vírus vaccinia (RAO et al., 1969), Chikungunya, sarampo (GOGATI; MARATHE, 1989) e HIV (UPADHYAY et al., 1993). Além de apresentar forte ação contra o dengue vírus 2 *in vitro* e *in vivo* (PARIDA et al., 2002). O extrato metanólico das folhas mostrou efeito virucida, e, também nos estágios iniciais da replicação do vírus Coxsackie B (BADAM; JOSHI; BEDEKAR, 1999). O óleo suprimiu a replicação do poliovírus em células Vero (SAI RAM et al., 2000). Tiwari et al. (2010) analisaram o efeito do extrato aquoso da casca sobre a replicação do HSV-1 e verificaram que em concentrações de 50 a 100 µg/ml o extrato apresentou ação virucida, inibiu a adsorção do vírus e a disseminação célula-célula. Saha et al. (2010b) também analisaram um PLS isolado da pasta da planta (P1) e seu derivado sulfatado (P1S). Ambos mostraram efeito nos estágios iniciais da replicação do herpesvírus bovino, em células HEp-2, com IC<sub>50</sub> de 105,5 µg/ml e 32,12 µg/ml para P1 e P1S, respectivamente. Faccin-Galhardi et al. (2012) demonstraram que esses mesmos PLS inibiram a replicação do poliovírus em células Hep-2.

## JUSTIFICATIVA

As infecções virais continuam sendo responsáveis por elevada taxa de morbidade e mortalidade significativa, seja na medicina ou na veterinária, representando uma enorme carga econômica e social. O controle das infecções virais em dimensões globais significaria a melhoria da qualidade de vida e a promoção de mudanças significativas de atitude e comportamento, principalmente, em populações e comunidades menos favorecidas. Entretanto, as condições de desenvolvimento humano global, pelo contrário, têm demonstrado a fragilidade do paradigma mundial, em favor de sistemas que também propiciam a emergência e re-emergência de infecções virais. A globalização do sistema e a maior facilidade de contato entre comunidades de regiões diferentes e distantes aumentam a possibilidade de disseminação e a manutenção de vírus nas populações. Portanto, considerando a importância das doenças virais e as suas inflexões (a capacidade de latência de alguns vírus, o número restrito de antivirais disponíveis, a seleção de cepas mutantes resistentes aos medicamentos convencionais e o aparecimento de viroses emergentes e re-emergentes), tornam-se de extrema importância as pesquisas por novos antivirais. Além disso, o interesse atual nos produtos de origem natural, principalmente, embasado em princípios etnofarmacológicos, apontam para o desenvolvimento de agentes virais mais efetivo e com menor efeito colateral.

## OBJETIVOS

Avaliar a atividade antiviral de polissacarídeos obtidos de folhas de *Azadirachta indica* A. Juss (nim), assim como os seus derivados químicos sulfatados na infecção pelo poliovírus e herpesvírus em células HEp-2.

### Objetivos específicos

- Avaliar as concentrações citotóxicas 50% ( $CC_{50}$ ) dos polissacarídeos P1, P1S, P2 e P2S em células HEp-2, pela avaliação da atividade desidrogenásica mitocondrial, através do método do MTT.
- Avaliar a atividade antiviral dos polissacarídeos contra poliovírus (PV), vírus herpes simples-1 (HSV-1) e herpesvírus bovino-1 (BoHV-1) em células HEp-2, através do ensaio de redução de plaque (PRA) e a determinação da concentração inibitória 50% ( $IC_{50}$ ), reação de imunofluorescência e, para o HSV-1, a reação em cadeia da polimerase.
- Determinar o índice de seletividade (IS) das substâncias avaliadas.

## CONCLUSÃO

Há anos, certo número de relatos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado e comprovado as propriedades medicinais da *Azadirachta indica*. Nossos estudos demonstram a atividade antipoliiovírus e antiherpesvírus de polissacarídeos (PLS) isolados do extrato aquoso das folhas do nim, em células HEp-2. Importantes aspectos podem ser destacados, como a própria extração aquosa dos PLS, em concordância com a base cultural etnofarmacológica do nim; a ausência de toxicidade nas concentrações analisadas; a abordagem da sulfatação química como provável fator de potencialização da atividade antiviral; a ação dos polissacarídeos em pelo menos 3 etapas da replicação viral. Estudos adicionais serão necessários para melhor entendimento do mecanismo de ação destes compostos, seguido pelos estudos pré-clínicos e de experimentos de biodisponibilidade.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, E.L.; RICE, P.J.; GRAVES, B.; ENSLEY, H.E.; YU, H.; BROWN, G.D.; GORDON, S.; MONTEIRO, M.A.; PAPP-SZABO, E.; LOWMAN, D.W.; POWER, T.D.; WEMPE, M.F.; WILLIAMS, D.L. Differential High-Affinity Interaction of Dectin-1 with Natural or Synthetic Glucans Is Dependent upon Primary Structure and Is Influenced by Polymer Chain Length and Side-Chain Branching. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 325, p. 115–123, 2008.
- ADU, F.D. The Virology of the Polio Virus. **Annals of Ibadan Postgraduate Medicine**, v. 3, p.13-19, 2005.
- ALAM, M.M.; SIDDIQUI, M.B.; HUSAIN, W. Treatment of diabetes through herbal drugs in rural India. **Fitoterapia**, v. 61, p. 240-242, 1990.
- ALEN, M.M.; KAPTEIN, S.J.; DE BURGHGRAEVE, T.; BALZARINI, J.; NEYTS, J.; SCHOLS, D. Antiviral activity of carbohydrate-binding agents and the role of DC-SIGN in dengue virus infection. **Virology**, v. 387, p. 67-75, 2009.
- ALIERO, B.L. Larvaecidal effects of aqueous extracts of *Azadirachta indica* on the larvae of *Anopheles* mosquito. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 325–327, 2003.
- ALMAS, K. The antimicrobial effects of extracts of *Azadirachta indica* (Neem) and *Salvadora persica* (Arak) chewing sticks. **Indian Journal of Dental Research**, v. 10, p. 23-26, 1999.
- ALMOND, J.W. The attenuation of poliovirus neurovirulence. **Annual Review Microbiology**, v. 41, p. 154–180, 1987.
- AMOROS, M.; FAUCONNIER, B.; GIRRE, R.L. In vitro antiviral activity of a saponin from *Anagallis arvensis*, Primulaceae, against herpes simplex virus and poliovirus. **Antiviral Research**, v. 8, p. 13–25, 1987.
- ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; SINCERO, T.C.M.; DA SILVA, A.C.; SAVI, L.A.; GAIDO, C.M.; BETTEGA, J.M.R.; MANCINI, M.; DE ALMEIDA, M.T.R.; BARBOSA, R.A.; FARIAS, M.R.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. **Fitoterapia**, v. 76, p. 3–4, 2005.
- ANTONELLI, G.; TURRIZIANI, O. Antiviral therapy: old and current issues International **Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, p. 95– 102, 2012.
- ANZIVINO, E.; FIORITI, D.; MISCHITELLI, M.; BELLIZZI, A.; BARUCCA, V.; CHIARINI, F.; PIETROPAOLO, V. Herpes simplex virus infection in pregnancy and in neonate: status of art of epidemiology, diagnosis, therapy and prevention. **Virology Journal**, v. 6, p. 1-11, 2009.

ARENA, A.; GUGLIANDOLO, C.; STASSI, G.; PAVONE, B.; IANNELLO, D.; BISIGNANO, G.; MAUGERI, T.L. An exopolysaccharide produced by *Geobacillus thermodenitrificans* strain B3-72: antiviral activity on immunocompetent cells. **Immunology Letters**, v. 123, p. 132-137, 2009.

ARENA, A.; MAUGERI, T.L.; PAVONE, B.; IANNELLO, D.; GUGLIANDOLO, C.; BISIGNANO, G. Antiviral and immunomodulatory effect of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis*. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 8-13, 2006.

ATANGWHO, J.; EBONG, P.E.; EYONG, P.U.; ASMAWI, M.Z.; AHMAD, M. Synergistic antidiabetic activity of *Vernonia amygdalina* and *Azadirachta indica*: Biochemical effects and possible mechanism. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 878-887, 2012.

BABA, M.; SNOECK, R.; PAUWELS, R.; DE CLERCQ, E. Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, and human immunodeficiency virus. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 32, p. 1742-1745, 1988.

BADAM, L.; JOSHI, S.P.; BEDEKAR, S.S. *In vitro* antiviral activity of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaf extract against group B coxsackie viruses. **Journal of Communicable Diseases**, v. 31, p. 79-90, 1999.

BANDYOPADHYAY, U.; BISWAS, K.; SENGUPTA, A.; MOITRA, P.; DUTTA, P.; SARKAR, D.; DEBNATH, P.; GANGULY, C.K.; BANERJEE, R.K. Clinical studies on the effect of Neem (*Azadirachta indica*) bark extract on gastric secretion and gastroduodenal ulcer. **Life Science**, v. 75, p. 2867-2878, 2004.

BASWA, M.; RATH, C.C.; DASH, S.K.; MISHRA, R.K. Antibacterial activity of Karanj (*Pongamia pinnata*) and Neem (*Azadirachta indica*) seed oil: a preliminary report. **Microbios**, v. 105, p. 183-189, 2001.

BEAUMAN, J.G. Genital Herpes: A Review. **American Family Physician**, v. 72, p. 1527-1534, 2005.

BERGMANN, W.; FEENEY, R.J. The isolation of a new thymine pentoside from sponges. **Journal of the American Chemical Society**, v. 72, p. 2809-2810, 1950.

BERGMANN, W.; FEENEY, R.J. Contribution to the study of Marine products. XXXII. The Nucleosides of Sponges. **Journal of Organic Chemistry**, v. 16, p. 981-987, 1951.

BERNSTEIN, D.I.; BELLAMY, A.R.; HOOKIII, E.W.; LEVIN, M.J.; WALD, A.; EWELL, M.G.; WOLFF, P.A.; DEAL, C.D.; HEINEMAN, T.C.; DUBIN, G.; BELSHE, R.B. Epidemiology, Clinical Presentation, and Antibody Response to Primary Infection With Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2 in Young Women. **Clinical Infectious Diseases Advance**, v. 29, p. 1-8, 2012.

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

BIESERT, L.; ADAMSKI, M.; ZIMMER, G.; SUHARTONO, H.; FUCHS, J.; UNKELBACH, U.; MEHLHORN, R.; HIDEG, K.; MILBRADT, R.; RUBSAMEN-WAIGMANN, H. Anti- human immunodeficiency virus (HIV) drug HOE/BAY 946 increases membrane hydrophobicity of human lymphocytes and specifically suppresses HIV-protein synthesis. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 179, p. 307–321, 1990.

BISWAS, K.; CHATTOPADHYAY, I.; BANERJEE, R.K.; BANDYOPADHYAY, U. Biological activities and medicinal properties of Neem (*Azadirachta indica*). **Current Science**, v. 82, p. 1336-1345, 2002.

BILLAUD, G.; THOUVENOT, D.; MORFIN, F. Drug targets in herpes simplex and Epstein Barr virus infections. **Infectious Disorders Drug Targets**, v. 9, p. 117-125, 2009.

BOEHMER, P.E.; LEHMAN, I.R. Herpes Simplex Virus DNA replication. **Annual Review Biochemistry** v. 66, p. 347–84, 1997.

BHOWMIK, D.; YADAV, C.J.; TRIPATHI, K.K.; KUMAR, S. Herbal remedies of *Azadirachta indica* and its medicinal application. **Journal of Chemical Pharmacology Research**, v. 2, p. 62-72, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde, secretaria de vigilância em saúde, departamento de vigilância epidemiológica, coordenação geral do programa nacional de imunizações. **Informe técnico da introdução da vacina inativada poliomielite (VIP)**, Brasília, Maio, p. 1-18, 2012.

BRICKS, L.F. Vacina contra poliomielite: um novo paradigma. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 25, p. 172-179, 2007.

BRIGHT, R.A.; MEDINA, M.J.; XU, X.; PEREZ-ORONNOZ, G.; WALLIS, T.R.; DAVIS, X.M.; POVINELLI, L.; COX, N.J.; KLIMOV, A.I. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. **Lancet**, v. 366, p. 1175–1181, 2005.

BRISS, P.A.; FEHRS, L.J.; PARKER, R.A.; WRIGHT, P.F.; SANNELLA, E.C.; HUTCHESON, R.H.; SCHAFFNER, W. Sustained transmission of mumps in a highly vaccinated population: Assessment of primary vaccine failure and waning vaccine-induced immunity. **Journal Infection Diseases**, v. 169, p. 77–82, 1994.

BRODER, S. The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. **Antiviral Research**, v. 85, p. 1-18, 2010.

BROOKS, G.F.; CARROLL, K.C.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A.; MIETZNER, T.A. **Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 25 ed. Porto Alegre: AMGH, 2012, 813 p.

BROWN, G.D.; GORDON, S. Fungal  $\beta$ -glucans and mammalian immunity. **Immunity**, v. 19, p. 311–315, 2003.

BRUHN, T.; DUERIG, J.; KRAISELBURD, E.N.; DE CLERCQ, E.; BRUHN, H-D.; BERESS, L. Antiviral and anticoagulant activity of Polysaccharides from marine brown algae. In: LAZAROVICI, P.; SPIRA, M.; ZLOTKIN, E. **Biochemical Aspects of Marine Pharmacology**. Colorado: Fort Collins, 1996, p. 187-208.

CAMARGO, M.T.L.A. **Medicina popular: aspectos metodológicos para pesquisa, garrafada, objeto de pesquisa, componentes medicinais de origem vegetal, animal e mineral**. São Paulo: ALMED, 1985. 130 p.

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

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Imported vaccine-associated paralytic poliomyelitis - United States. **MMWR - Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 55, p. 97-99, 2005.

CECÍLIO, A.B.; FARIA, D.B.; OLIVEIRA, P.C.; CALDAS, S.; OLIVEIRA, D.A.; SOBRAL, M.E.G.; DUARTE, M.G.E.; MOREIRA, C.P.S.; SILVA, C.G.; ALMEIDA, V.L. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 975– 981, 2012.

CHAKRABARTI, S.; PILLAY, D.; RATCLIFFE, D.; CANE, P.A.; COLLINGHAM, K.E.; MILLIGAN, D.W. Resistance to antiviral drugs in herpes simplex virus infections among allogenic stem cell transplant recipients: risk factors and prognostic significance. **Journal Infections Diseases**, v. 181, p. 2055–2058, 2000.

CHANTRILL, B.H.; COULTHARD, C.E.; DICKINSON, L.; INKLEY, G.W.; MORRIS, W.; PYLE, A.H. The action of plant extracts on a bacteriophage of *Pseudomonas pyocyanea* and on influenza A virus. **Journal of General Microbiology**, v. 6, p. 74–84, 1952.

CHATTOPADHYAY, R.R. Hypolipidemic activity of *Azadirachta indica* leaf extract in rats. **Proceeding - Indian National Science Academy**, v. 61, p. 281–284, 1995.

CHATTOPADHYAY, R.; BANDYOPATHYAY, M. Possible mechanism of hepatoprotective activity of *Azadirachta indica* leaf extract against paracetamol-induced hepatic damage in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 5, p. 1–4, 2005.

CHATTOPADHYAY, K.; GHOSH, T.; PUJOL, C.A.; CARLUCCI, M.J.; DAMONTE, E.B., RAY, B. Polysaccharides from *Gracilaria corticata*: Sulfation, chemical

characterization and anti-HSV activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, p. 346–351, 2008.

CHEEK, J.E.; BARON, R.; ATLAS, H.; WILSON, D.L.J.; CRIDER, R.D. Mumps outbreaks in a highly vaccinated school population. Evidence for large-scale vaccination failure. **Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine**, v. 149, p. 774–778, 1995.

CHOPRA, I.C.; GUPTA, K.C.; NAIR, B.N. Biological activities and medicinal activities of neem.Indian. **The Journal of Medical Research**, v. 40, p. 511-515, 1952.

CHOPRA, R.N.; NAYAR, S.L.; CHOPRA, I.C. **Glossary of Indian medicinal plants**. New Delhi: CSIR, 1956. p. 31–2.

CHOU, T.C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacology**, v. 58, p. 621–681, 2006.

COEN, D.M.; SCHAFFER, P.A. Two distinct loci confer resistance to acycloguanosine in herpes simplex virus type 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, p. 2265–2269, 1980.

COLLETT, M.S.; NEYTS, J.; MODLINC, J.F. A case for developing antiviral drugs against polio. **Antiviral Research**, v. 79, p. 179–187, 2008.

COLLINS, P.; ELLIS, M.N. Sensitivity monitoring of clinical isolates of herpes simplex virus to acyclovir. **Journal of Medical Virology**, v. 1, p. 58–66, 1993.

CONNOLLY, S.A.; JACKSON, J.O.; JARDETZKY, T.S.; LONGNECKER, R. Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 369-381, 2011.

D'ARCE, R.C.F.; ALMEIDA, R.S.; SILVA, T.C.; FRANCO, A.C.; SPILKI, F.; ROEHE, P.M.; ARNS, C.W. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesvirus type 1 and 5. **Veterinary Microbiology**, v. 88, p. 315-324, 2002.

DANVE-SZATANEK, C.; AYMARD, M.; THOUVENOT, D.; MORFIN, F.; AGIUS, G.; BERTIN, I.; BILLAUDEL, S.; CHANZY, B.; COSTE-BUREL, M.; FINKIELSZTEJN, L.; FLEURY, H.; HADOU, T.; HENQUELL, C.; LAFEUILLE, H.; LAFON, M.E.; LE FAOU, A.; LEGRAND, M.C.; MAILLE, L.; MENGELLE, C.; MORAND, P.; MORINET, F.; NICAND, E.; OMAR, S.; PICARD, B.; POZZETTO, B.; PUEL, J.; RAOULT, D.; SCIEUX, C.; SEGONDY, M.; SEIGNEURIN, J.M.; TEYSSOU, R.; ZANDOTTI, C. Surveillance network for herpes simplex virus resistance to antiviral drugs: 3-year follow-up. **Journal Clinical Microbiology**, v. 42, p. 242–249, 2004.

DHAR, R.; ZHANG, K.; TALWAR, G.P.; GARG, S.; KUMAR, N. Inhibition of the growth and development of asexual and sexual stages of drug-sensitive and resistant strains of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by Neem (*Azadirachta indica*) fractions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, p. 31–39, 1998.

DAVISON, A.J. Herpesvirus systematic. **Veterinary Microbiology**, v. 143, p. 52–69, 2010.

DE CLERCQ, E. Antiviral drugs in current clinical use. **Journal of Clinical Virology**, v. 30, p. 115-133, 2004.

DE CLERCQ, E.; LUCZAK, M. Antiviral activity of carbopol, a cross-linked polycarboxylate. **Archives of Virology**, v. 52, p. 151-158, 1976.

DE SOMER, P.; DE CLERCQ, E.; BILLIAU, A.; SCHONNE, E.; CLAESEN, M. Antiviral activity of polyacrylic and polymethacrylic acids. II. Mode of action in vivo. **Journal of Virology**, v. 2, p. 886-893, 1968.

DESHMANE, S.L.; FRASER, N.W. During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. **Journal of Virology**, v. 63, p. 943–947, 1989.

DEZENGRINI, R.; SILVA, S.C.; WEISS, M.; KREUTZ, L.C.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Atividade de três drogas antivirais sobre os herpesvírus bovino tipos 1, 2 e 5 em cultivo celular. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 855-860, 2010.

DU CHENE, I.; BASYUK, E.; LIN, Y. L.; TRIBOULET, R.; KNEZEVICH, A.; CHABLE-BESSIA, C.; METTLING, C.; BAILLAT, V.; REYNES, J.; CORBEAU, P.; BERTRAND, E.; MARCELLO, A.; EMILIANI, S.; KIERNAN, R.; BENKIRANE, M. Suv39H1 and HP1gamma are responsible for chromatin-mediated HIV-1 transcriptional silencing and post-integration latency. **EMBO Journal**, v. 26, p. 424–435, 2007.

DUINTJER TEBBENS, R.J.; PALLANSCH, M.A.; CHUMAKOV, K.M.; HALSEY, N.A.; HOVI, T.; MINOR, P.D.; MODLIN, J.F.; PATRIARCA, P.A.; SUTTER, R.W.; WRIGHT, P.F.; WASSILAK, S.G.F.; COCHI, S.L.; KIM, J.; THOMPSON, K.M. Expert Review on Poliovirus Immunity and Transmission. **Risk Analysis**, p. 1-73, 2012.

EDZIRI, H.; MASTOURI, M.; AOUNI, M.; VERSCHAEVE, L. South African Polyphenols content, antioxidant and antiviral activities of leaf extracts of **Marrubium deserti** growing in Tunisia. **Journal of Botany**, v. 80, p. 104–109, 2012.

EFSTATHIOU, S.; PRESTON, C.M. Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency. **Virus Research**, v. 111, p. 108–119, 2005.

EHRESMANN, D.W.; DEIG, E.F.; HATCH, M.T. **Marine algae in pharmaceutical science**. Berlin: Gruyter, 1979. p. 293–302.

ELION, G.B.; FURMAN, P.A.; FYFE, J.A.; DE MIRANDA, P.; BEAUCHAMP, L.; SCHAEFFER, H.J. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 74, p. 5716–5720, 1977.

ENDERS, J.F.; WELLER, T.H.; ROBBINS, F.C. Cultivation of Lansing strain of poliomyelitis virus in culture of various human tissues. **Science**, v. 109, p. 85-87, 1949.

ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary Microbiology**, v. 53, p. 3-15, 1996.

ENGLUND, J.A.; ZIMMERMAN, M.E.; SWIERKOSZ, E.M.; GOODMAN, J.L.; SCHOLL, D.R.; BALFOUR, H.H. Herpes simplex virus resistant to acyclovir. A study in a tertiary care center. **Annals of Internal Medicine**, v. 112, p. 416-422, 1990.

FACCIN, L.C.; BENATI, F.; RINCÃO, V.P.; MANTOVANI, M.S.; SOARES, S.A.; GONZAGA, M.L.; NOZAWA, C.; LINHARES, R.E.C. Antiviral activity of aqueous and ethanol extracts and of an isolated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* against poliovirus type 1. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 24-28, 2007.

FACCIN-GALHARDI, L.C.; YAMAMOTO, K.A.; RAY, S.; RAY, B.; LINHARES, R.E.C.; NOZAWA, C. The *in vitro* antiviral property of *Azadirachta indica* polysaccharides for poliovirus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 86-90, 2012.

FERREIRA, D.F.; COSTA, L.J.; CAVALEIRO, N.P.; CÂMARA, F.P.; MIRANDA, M.M.F.S. Propriedades gerais dos vírus, Estratégias de replicação do vírus e Arquitetura dos vírus. In: SANTOS, N.O.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D. **Introdução à Virologia Humana**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 1-41.

FIGUEIREDO, L.T.M. The Brazilian flaviviruses. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 1643-1649, 2000.

FILMAN, D.J.; SYED, R.; CHOW, M.; MACADAM, A.J.; MINOR, P.D.; HOGLE, J.M. Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. **EMBO Journal**, v. 8, p. 1567-1579, 1989.

FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. *Herpesviridae*, In: FLORES, E.F., **Virologia Veterinária**. 1 ed. Rio Grande do Sul: UFSM, 2007. p. 433-488.

FRICKS, C.E.; HOGLE, J.M. Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. **Journal of Virology**, v. 64, p. 1934-1945, 1990.

FROBERT, E.; CORTAY, J.C.; OOKA, T.; NAJIOULLAH, F.; THOUVENOT, D.; LINA, B. Genotypic detection of aciclovir-resistant HSV-1: characterization of 67 ACV-sensitive and 14 ACV-resistant viruses. **Antiviral Research**, v. 79, p. 28-36, 2008.

FUJISAKI, S.; TAKASHITA, E.; YOKOYAMA, M.; TANIWAKI, T.; XU, H.; KISHIDA, N.; SATO, H.; TASHIRO, M.; IMAI, M.; ODAGIRI, T. A single E105K mutation far from the active site of influenza B virus neuraminidase contributes to reduced

susceptibility to multiple neuraminidase-inhibitor drugs. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 429, p. 51–56, 2012.

GARG, S.; TALUJA, V.; UPADHYAY, S.N.; TALWAR, G.P. Studies on the contraceptive efficacy of *Praneem polyherbal* cream. **Contraception**, v. 48, p. 591-596, 1993.

GAY, E.; BARNOUIN, J. A nation-wide epidemiological study of acute bovine respiratory disease in France. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 89, p. 265-271, 2009.

GESCHER, K.; KÜHN, J.; LORENTZEN, E.; HAFEZI, W.; DERKSEN, A.; DETERS, A.; HENSEL, A. Proanthocyanidin-enriched extract from *Myrothamnus flabellifolia* Welw. exerts antiviral activity against herpes simplex virus type 1 by inhibition of viral adsorption and penetration. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, p. 468–474, 2011.

GIACHETTI, C.; SEMLER, B.L. Molecular genetic analysis of poliovirus RNA replication by mutagenesis of a VPg precursor polypeptide. In: BRINTON, M.A.; HEINZ, F.X. **New Aspects of Positive-Strand RNA Viruses**. 1 ed. Washington: American Society for Microbiology, 1990. p. 83-93.

GIACHETTI, C.; HWANG, S.S.; SEMLER, B.L. Cis-Acting lesions targeted to the hydrophobic domain of a poliovirus membrane protein involved in RNA replication. **Journal of Virology**, v. 66, p. 6045-6057, 1992.

GIRISH, K.; SHANKARA BHAT, S. Neem – A Green Treasure. **Electronic Journal of Biology**, v. 4, p. 102-111, 2008.

GLOBAL POLIO ERRADICATION INITIATIVE (GPEI) – **Annual report 2012**. Switzerland: WHO Press, World Health Organization, 2012. 76 p.

GOGATI, S.S.; MARATHE, A.D. Antiviral effect of Neem leaf (*Azadirachta indica*) extracts on Chinkugunga and Measles viruses. **The Journal of Research and Education in Indian Medicine**, v. 8, p. 1–5, 1989.

GONÇALVES, J.L.S.; HUBINGER, M.G.; SANTOS, N.S.O.; FERREIRA, D.F. Viroses do Sistema Nervoso Central. In: SANTOS, N.O.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D. **Introdução à Virologia Humana**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 357-398.

GONZALEZ, M.; ALARCON, B.; CARRASCO, L. Polysaccharides as antiviral agents: antiviral activity of carrageenan. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 31, p. 1388–1393, 1987.

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

GRÄF, T.; PINTO, A.R. The increasing prevalence of HIV-1 subtype C in southern Brazil and its dispersion through the continent. **Virology**, v. 435, p. 170-178, 2012.

GUBLER, D.J. The Global Emergence/Resurgence of Arboviral Diseases as Public Health Problems. **Archives of Medical Research**, v. 33, p. 330–342, 2002.

GUBLER, D.J. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21st Century. **Tropical Medicine and Health**, v. 39, p. 3-11, 2011.

GUBLER, D.J.; KUNO, G.; MARKOFF, L. Flaviviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1154–1251.

GUEZENNEC, J.G.; PIGNET, P.; RAGUÉNÈS, G.; DESLANDES, E.; LIJOUR, Y.; GENTRIC, E. Preliminary chemical characterization of unusual eubacterial exopolysaccharides of deep-sea origin. **Carbohydrate Polymers**, v. 24, p. 287–294, 1994.

GULICK, R.M.; MELLORS, J.W.; HAVLIR, D.; ERON, J.J.; GONZALEZ, C.; MCMAHON, D.; RICHMAN, D.D.; VALENTINE, F.T.; JONAS, L.; DEUTSCH, P.; MEIBOHM, A.; HOLDER, D.; SCHLEIF, W.A.; CONDRA, J.H.; EMINI, E.A.; CHODAKEWITZ, J.A. Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. **New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 734–739, 1997.

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

HABLUETZEL, A.; CARNEVALI, F.; LUCANTONI, L.; GRANA, L.; ATTILI, A.R.; ARCHILEI, F.; ANTONINI, M.; VALBONESI, A.; ABBADESSA, V.; ESPOSITO, F.; ESCH, S.A. Impact of the botanical insecticide Neem Azal® on survival and reproduction of the biting louse *Damalinia limbata* on angora goats. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p. 328–337, 2007.

H Aidari, M.; ALI, M.; WARD, C.S.; MADJID, M. Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. **Phytomedicine**, v. 16, p. 1127–1136, 2009.

HALBERSTEIN, R.A. Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns. **Annals of Epidemiology**, v. 15, p. 686-699, 2005.

HALSTEAD, S.B. Dengue. **Lancet**, v. 370, p. 1644–1652, 2007.

HARISH, K.G.; VIDYA, P.R.; VINOTHINI, G.; VIDJAYA LETCHOUMY, P.; NAGINI, S. The neem limonoids azadirachtin and nimbolide inhibit cell proliferation and induce apoptosis in an animal model of oral oncogenesis. **Investigational New Drugs**, v. 27, p. 246-52, 2008.

HATCH, M.; EHRESMANN, D.; DEIG, E.; WEDROS, N. Further studies on the chemical composition and an initial *in vivo* evaluation of antiviral material in extracts of macroscopic algae. **Journal of Phycology**, v. 13, p. 28–35, 1977.

HELMY, W.A.; AMER, H.; EL-SHAYEB, N.M. Biological and anti-microbial activities of aqueous extracts from neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae). **Journal of Applied Sciences Research**, v. 3, p. 1050-1055, 2007.

HENZEL, A.; DIEL, D.G.; ARENHART, S.; VOGEL, F.S.F.; WEIBELN, R.; FLORES, E.F. Aspectos virológicos e clínico-patológicos da infecção genital aguda e latente pelo herpesvírus bovino tipo 1.2 em bezerras experimentalmente infectadas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 140-148, 2008.

HEYMANN, D.L.; AYLWARD, R.B. The polio eradication endgame. As polio eradication nears realization, such real-world vaccination strategies could hold lessons for the future in AIDS vaccine development. **IAVI report**, v. 10, p. 13-17, 2006.

HERRERA, F.J.; TRIEZENBERG, S.J. VP16-dependent association of chromatin-modifying coactivators and underrepresentation of histones at immediate-early gene promoters during herpes simplex virus infection. **Journal of Virology**, v. 78, p. 9689–9696, 2004.

HERS, B.S.; FINE, P.E.M.; KENT, W.K.; COCHI, S.L.; KAHN, L.H.; ZELL, E.R.; HAYS, P.L.; WOOD, C.L. Mumps outbreaks in a highly vaccinated population. **Journal of Pediatrics**, v. 119, p. 187–193, 1991.

HIDALGO, N.T.R. **Surtos de Caxumba em escolares com altas coberturas vacinais** - Documento Técnico SES/CIP/CVE/Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória. São Paulo, 8 jul. 2002.

HIDARI, K.I.; TAKAHASHI, N.; ARIHARA, M.; NAGAOKA, M.; MORITA, K.; SUZUKI, T. Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 376, p. 91-95, 2008.

HIRSCH, M.S.; CONWAY, B.; D'AQUILA, R.T.; JOHNSON, V.A.; BRUN-V'EZINET, F.; CLOTET, B.; DEMETER, L.M.; HAMMER, S.M.; JACOBSEN, D.M.; KURITZKES, D.R.; LOVEDAY, C.; MELLORS, J.W.; VELLA, S.; RICHMAN, D.D. Antiretroviral drug resistance testing in adults with HIV infection. **Journal American Medical Association**, v. 279, p. 1984–1991, 1998.

HIRSCH, M.S.; BRUN-VEZINET, F.; D'AQUILA, R.T.; HAMMER, S.M.; JOHNSON, V.A.; KURITZKES, D.R.; LOVEDAY, C.; MELLORS, J.W.; CLOTET, B.; CONWAY, B.; DEMETER, L.M.; VELLA, S.; JACOBSEN, D.M.; RICHMAN, D.D. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection. **Journal American Medical Association**, v. 283, p. 2417–2426, 2000.

HIRSCH, M.S.; BRUN-VEZINET, F.; CLOTET, B.; CONWAY, B.; KURITZKES, D.R.; D'AQUILA, R.T.; DEMETER, L.M.; HAMMER, S.M.; JOHNSON, V.A.; LOVEDAY, C.;

MELLORS, J.W.; JACOBSEN, D.M.; RICHMAN, D.D. Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human immunodeficiency virus type 1: 2003 recommendations of an International AIDS Society- USA panel. **Clinical Infections Diseases**, v. 37, p. 113–128, 2003.

HOLLAND, J.J.; DE LA TORRE, J.C.; STEMHAWER, D.A. RNA virus population as quasispecies. **Current topic in Microbiology and Immunology**, v. 176, p. 1-20, 1992.

HOLZ, C.L.; CIBULSKI, S.P.; TEIXEIRA, T.F.; BATISTA, H.B.C.R.; DEZEN, D.; CAMPOS, F.S.; VARELA, A.P.M.; ROEHE, P.M. Serum neutralization with different types and subtypes of bovine herpesvirus 1 and 5. **Pesquisa Veterinária Animal**, v. 30, p. 515-522, 2010.

HORWITZ, A.B. Some personal reflections on the clinical aspects of smallpox. **Medical Journal**, p. 1244-1245, 1968.

HORWITZ, J.P.; CHUA, J.; NOEL, M. Nucleosides. V. The monomesylates of 1-(2'-deoxy- $\beta$ -D-lyxofuranosyl) thymine. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 29, p. 2076-2078, 1964.

JAIN, M.; GANJU, L.; KATIYAL, A.; PADWAD, Y.; MISHRA, K.P.; CHANDA, S.; KARAN, D.; YOGENDRA, K.M.; SAWHNEY, R.C. Effect of *Hippophae rhamnoides* leaf extract against Dengue virus infection in human blood-derived macrophages. **Phytomedicine**, v. 15, p. 793-799, 2008.

JASSIM, S.A.A.; NAJI, M.A. Novel antiviral agents from plants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 412–427, 2003.

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

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

JUNG, K.; HA, Y.; HA, S.K.; HAN, D.U.; KIM, D.W.; MOON, W.K.; CHAE, C. Antiviral effect of *Saccharomyces cerevisiae* beta-glucan to swine influenza virus by increased production of interferon-gamma and nitric oxide. **Journal of veterinary medicine - Series B - Infectious diseases and veterinary public health**, v. 51, p. 72-76, 2004.

KARMAKAR, P.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B.; GHOSH, T.; RAY, B. Polysaccharides from *Padina tetrastratica*: Structural features, chemical modification and antiviral activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 513–520, 2010.

KARMAKAR, P.R.; CHATTERJEE, B.P. Isolation and characterization of two IgE-reactive proteins from *Azadirachta indica* pollen. **Molecular Cell Biochemistry**, v. 131, p. 87-96, 1994.

KAUFMAN, H.E.; HEIDELBERGER, C. Therapeutic antiviral action of 5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine in herpes simplex. **Science**, v. 145, p. 585-586, 1964.

KENT, J. R.; ZENG, P.Y.; ATANASIU, D.; GARDNER, J.; FRASER, N.W.; BERGER, S.L. During lytic infection herpes simplex virus type 1 is associated with histones bearing modifications that correlate with active transcription. **Journal of Virology**, v. 78, p. 10178–10186, 2004.

KEW, O.M.; NOTTAY, B.K. Evolution of the oral poliovaccine strains in humans occurs by both mutation and intramolecular recombination. In: CHANOCK, R.; LERNER, R. **Modern Approaches to Vaccines**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1984. p. 357–362.

KEW, O.M.; SUTTER, R.W.; NOTTAY, B.; MCDONOUGH, M.; PREVOTS, D.R.; QUICK, L.; PALLANSCH, M. Prolonged replication of a type 1 vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient. **Journal Clinical Microbiology**, v. 36, p. 2893–2899, 1998.

KEW, O.; MORRIS-GLASGOW, V.; LANDAVERDE, M.; BURNS, C.; SHAW, J.; GARIB, Z.; ANDRE, J.; BLACKMAN, E.; FREEMAN, C.J.; JORBA, J.; SUTTER, R.; TAMBINI, G.; VENCZEL, L.; PEDREIRA, C.; LAENDER, F.; SHIMIZU, H.; YONEYAMA, T.; MIYAMURA, T.; VAN DER AVOORT, H.; OBERSTE, M.S.; KILPATRICK, D.; COCHI, S.; PALLANSCH, M.; DE QUADROS, C. Outbreak of poliomyelitis in Hispaniola associated with circulating type 1 vaccine-derived poliovirus. **Science**, v. 296, p. 356–359, 2002.

KEW, O.M.; SUTTER, R.W.; DE GOURVILLE, E.M.; DOWDLE, W.R.; PALLANSCH, M.A. Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication. **Annual Review Microbiology**, v. 59, p. 587–635, 2005.

KHAN, M.; WASSILEW, S.W. **Natural Pesticides from the Neem Tree and Other Tropical Plants**. In: SCHMUTTERER, H.; ASHER, K.R.S. (eds), Germany: GTZ, 1987, p. 645–650.

KIRTIKAR, A.R.; BASU, B.D. **Indian medicinal plants**. India: Lalit Mohan Basu, 1935. p. 536–542.

KNIPE, D.M.; CLIFFE, A. Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. **Nature reviews microbiology**, v. 6, P. 211-221, 2008.

KUBAT, N.J.; TRAN, R.K.; MCANANY, P.; BLOOM, D.C. Specific histone tail modification and not DNA methylation is a determinant of herpes simplex virus type 1 latent gene expression. **Journal of Virology**, v. 78, p. 1139–1149, 2004.

KUO, Y.C.; LIN, L.C.; TSAI, W.J.; CHOU, C.J.; KUNG, S.R.; HO, Y.H. Samarangenin B from *Limonium sinense* suppresses Herpes Simplex Virus type 1 replication in Vero cells by regulation of viral macromolecular synthesis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 2854–2864, 2002.

KUO, Y.C.; LEE, Y.C.; LEU, Y.L.; TSAI, W.J.; CHANGE, C.S. Efficacy of orally administered *Lobelia chinensis* extracts on herpes simplex virus type 1 infection in BALB/c mice. **Antiviral Research**, v. 80, p. 206-212, 2008.

LACHMANN, R.H.; SADARANGANI, M.; ATKINSON, H.R.; EFSTATHIOU, S. An analysis of herpes simplex virus gene expression during latency establishment and reactivation. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 1271–1282, 1999.

LANDSTEINER, K.; POPPER, E. Übertragung der poliomyelitis acuta auf affen. **Z. Immunitätsforsch**, v. 2, p. 377-390, 1909.

LAKSHMIPATHI, A. **One hundred useful drugs**. 3 ed. Madras: Arogya Ashram Samithi, 1973. p. 85–87.

LEHMAN, I.R.; BOEHMER, P.E. Replication of Herpes Simplex Virus DNA. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 28059–28062, 1999.

LIN, L.T.; CHEN, T.Y.; CHUNG, C.Y.; NOYCE, R.S.; GRINDLEY, T.B.; MCCORMICK, C.; LIN, T.C.; WANG, G.H.; LIN, C.C.; RICHARDSON, C.D. Hydrolyzable tannins (chebulagic acid and punicalagin) target viral glycoprotein–glycosaminoglycan interactions to inhibit herpes simplex virus 1 entry and cell-to-cell spread. **Journal of Virology**, v. 85, p. 4386–4398, 2011.

LIU, D.M.; SHENG, J.W.; LI, W.Z.; ZHANG, L.L.; LI, S.X. Study on content and antioxidant effect of total flavonoids from two kinds of *Athyrium Multidentatum* (Doll) Ching. **Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory**, v. 3, p. 803-808, 2010.

LOOKER, K.J.; GARNETT, G.P.; SCHMID, G.P. An estimate of the global prevalence and incidence of herpes simplex virus type 2 infection. **Bull World Health Organ**, v. 86, p. 805–812, 2008.

LV, H.; KONG, Y.; YAO, Q.; ZHANG, B.; LENG, F.; BIAN, H.; BALZARINI, J.; DAMME, E.V.; BAO, J. Nebrodeolysin, a novel hemolytic protein from mushroom *Pleurotus nebrodensis* with apoptosis-inducing and anti-HIV-1 effects. **Phytomedicine**, v. 16, p. 198–205, 2009.

MADHAVAN, H.N.; PRIYA, K.; ANAND, A.R.; LILY, K. Therese Detection of Herpes simplex virus (HSV) genome using polymerase chain reaction (PCR) in clinical samples Comparison of PCR with standard laboratory methods for the detection of HSV. **Journal of Clinical Virology**, v. 14, p. 145–151, 1999.

MANDAL, P.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B.; GHOSH, T.; RAY, B. Xylans from *Scinaia hatei*: Structural features, sulfation and anti-HSV activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, p. 173–178, 2010.

MARDBERG, K.; TRYBALA, E.; TUFARO, F.; BERGSTRÖM, T. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein C is necessary for efficient infection of chondroitin sulfate-expressing gro2C cells. **The Journal of General Virology**, v. 83, p. 291-300, 2002.

MAROZIN, S.; PRANK, U.; SODEIK, B. Herpes simplex virus type 1 infection of polarized epithelial cells requires microtubules and access to receptors present at cell–cell contact sites. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 775–786, 2004.

MARTIN, J. Vaccine-derived poliovirus from long term excretors and the end game of polio eradication. **Biologicals**, v. 34, p. 117–122, 2006.

MARTINEZ, S.S. **O Nim - *Azadirachta indica*: Natureza, Usos Múltiplos, Produção**. Londrina: IAPAR, 2002. 142 p.

MBAYA, A.W.; IBRAHIM, U.I.; GOD, O.T.; LADI, S. Toxicity and potential anti-trypanosomal activity of ethanolic extract of *Azadirachta indica* (Maliacea) stem bark: An *in vivo* and *in vitro* approach using *Trypanosoma brucei*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 495-500, 2010.

MEHNERT, D.U.; CANDEIAS, J.A.N. Herpesvírus. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 599-606.

MELATHOPOULOS, A.P.; WINSTON, M.L.; WHITTINGTON, R.; SMITH, T.; LINDBERG, C.; MUKAI, A.; MOORE, M. Comparative laboratory toxicity of neem pesticides to honey bees (Hymenoptera: Apidae), their mite parasites *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) and *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae), and brood pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascophaera apis*. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, p. 199-209, 2000.

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

MELO, F. L.; BENATI, F. J.; ROMAN-JUNIOR, W. A.; MELLO, J. C. P.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. The *in vitro* antiviral activity of an aliphatic nitro compound from *Heteropteris aphrodisiaca*. **Microbiological Research**, v. 163, p. 136-139, 2008.

METTENLEITER, C.T. Budding events in herpesvirus morphogenesis. **Virus Research**, v. 106, p. 167–180, 2004.

METTENLEITER, C.T. Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: The herpesvirus assembly puzzle. **Veterinary Microbiology**, v. 113 p. 163–169, 2006.

MILNE, R.S.; NICOLA, A.V.; WHITBECK, J.C.; EISENBERG, R.J.; COHEN, G.H. Glycoprotein D receptor-dependent, low-pH-independent endocytic entry of herpes simplex virus type 1. **Journal of Virology**, v. 79, p. 6655–6663, 2005.

MINARI, M.C.; RINCÃO, V.P.; SOARES, S.A.; RICARDO, N.M.P.S.; NOZAWA, C.; LINHARES, R.E.C. Antiviral properties of polysaccharides from *Agaricus brasiliensis* in the replication of bovine herpesvirus 1. **Acta Virologica**, v. 55, p. 219-223, 2011.

MOCHIDA, K. Anti-influenza virus activity of *Myrica rubra* leaf ethanol extract evaluated using Madino-Darby canine kidney (MDCK) cells. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 72, 3018-3020, 2008.

MURRAY, K.E.; BARTON, D.J. Poliovirus CRE-Dependent VPg Uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. **Journal of Virology**, v. 77, p. 4739-4750, 2003.

NAGY, P.D.; POGANY, J. The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, p. 137-149, 2012.

NANCE, C.L.; SIWAK, E.B.; SHEARER, W.T. Preclinical development of the green tea catechin, epigallocatechin gallate, as an HIV-1 therapy. **The journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, p. 459-465, 2009.

NASCIMENTO, D.R. **Projeto a história da Poliomielite e de sua erradicação no Brasil**: Seminários. Rio de Janeiro: Casa de Oswaldo Cruz, 2004. 184 p.

NATHANSON, N.; MARTIN, J.R. The epidemiology of poliomyelitis: enigmas surrounding its appearance, epidemiology and disappearance. **American Journal Epidemiology**, v. 110, p. 672-692, 1979.

NEUSHUL, M. Antiviral carbohydrates from marine red algae. **Hydrobiologia**, v. 204/205, p. 99-104, 1990.

NGURE, R.M.; ONGERI, B.; KARORI, M.S.; WACHIRA, W.; MAATHAI, R.G.; KIBUGU, J.K.; WACHIRA, F.N. Anti-trypanosomal effects of *Azadiracta indica* (neem) extract on *Trypanosoma brucei rhodesiense*-infected mice. **Eastern Journal of Medicine**, v. 14, p. 2-9, 2009.

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

NOGUEIRA, R.M.R.; ARAÚJO, J.M.G.; SCHATZMAYR, H.G. Aspects of dengue virus infections in Brazil 1986-2007. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 12, p. 7-13, 2007.

NONAKA, G.; NISHIOKA, I.; NISHIZAWA, M.; YAMAGISHI, T.; KASHIWADA, Y.; DUTSCHMAN, G.E.; BODNER, A.J.; KILKUSKIE, R.E.; CHENG, Y.C.; LEE, K.H. Anti-AIDS agents. 2: inhibitory effects of tannins on HIV reverse transcriptase and HIV replication in H9 lymphocyte cells. **Journal of Natural Products**, v. 53, p. 587-595, 1990.

NWACHUKWU, N.; IWEALA, E.J. Influence of extraction methods on the hepatotoxicity of *Azadiracta indica* bark extract on albino rats. **Global Journal of Pure and Applied Sciences**, v. 15, p. 369-372, 2009.

OLIVEIRA, M.T.; CAMPOS, M.T.; DIAS, M.M.; VELHO, F.A.; FRENEAU, G.E.; BRITO, W.M.E.D.; RIJSEWIJK, F.A.M.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls. **Theriogenology**, v. 75, p. 1139-1145, 2011.

OH, J.; FRASER, N.W. Temporal association of the herpes simplex virus (HSV) genome with histone proteins during a lytic infection. **Journal of Virology**, v. 86, p. 3530–3537, 2007.

PARIDA, M.M.; UPADHYAY, C.; PANDYA, G.; JANA, A.M. Inhibitory potential of neem (*Azadirachta indica* Juss) leaves on Dengue virus type-2 replication. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 273–278, 2002.

PELLETT, P.E.; ROIZMAN, B. The Family *Herpesviridae*: A Brief Introduction. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 2479–2500.

□

PEÑA, K.C.; ADELSON, M.E.; MORDECHAI, E.; BLAHO, J.A. Genital Herpes Simplex Virus Type 1 in Women: Detection in Cervicovaginal Specimens from Gynecological Practices in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 150–153, 2010.

PERNG, G. C., JONES, C., CIACCI-ZANELLA, J., STONE, M., HENDERSON, G., YUKHT, A., SLANINA, S. M., HOFMAN, F. M., GHIASI, H. Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript. **Science**, v. 287, p. 1500–1503, 2000.

PEREIRA, F.A. Herpes simplex: evolving concepts. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 35, p.503-20, 1996.

PERTEL, P.E.; FRIDBERG, A.; PARISH, M.L.; SPEAR, P.G. Cell fusion induced by herpes simplex virus glycoproteins gB, gD, and gH-gL requires a gD receptor but not necessarily heparan sulfate. **Virology**, v. 279, p. 313–324, 2001.

PEVEAR, D.C.; TULL, T.M.; SEIPEL, M.E.; GROARKE, J.M. Activity of Pleconaril against Enteroviruses. **Antimicrobiol Agents Chemotherapy**, v. 43, p. 2109–2115, 1999.

PEVEAR, D.C.; HAYDEN, F.G.; DEMENCZUK, T.M.; BARONE, L.R.; MCKINLAY, M.A.; COLLETT, M.S. Relationship of pleconaril susceptibility and clinical outcomes in treatment of common colds caused by rhinoviruses. **Antimicrobiol Agents Chemotherapy**, v. 49, p. 4492-4499, 2005.

POLAQUINI, S.R.B.; SVIDZINSKI, T.I.E.; KEMMELMEIER, C.; GASPARETTO, A. Effect of aqueous extract from Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) on hydrophobicity, biofilm formation and adhesion in composite resin by *Candida albicans*. **Archives of Oral Biology**, v. 51, p. 482 - 490, 2006.

PRIVAT de GARILHE, M.; DE RUDDER, J. Effect of 2 arbinose nucleosides on the multiplication of herpes virus and vaccine in cell culture. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences**, v. 259, p. 2725–2728, 1964.

PROENÇA, J.T.; COLEMAN, H.M.; NICOLL, M.P.; CONNOR, V.; PRESTON, C.M.; ARTHUR, J.; EFSTATHIOU, S. An investigation of herpes simplex virus promoter

activity compatible with latency establishment reveals VP16-independent activation of immediate-early promoters in sensory neurons. **Journal of General Virology**, v. 92, p. 2575–2585, 2011.

RACANIELLO, V.R. *Picornaviridae: The Viruses and Their Replication*. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 796–838.

RÁCZ, M.L. Controle das Infecções virais. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 565-572.

RAO, A.R.; KUMAR, S.; PARAMSIVAM, T.B.; KAMALAKSHI, S.; PARASHURAM, A.R.; SHANTHA, M. Study of antiviral activity of tender leaves of margosa tree (*Melia azadirachta*) on vaccinia and variola virus - A preliminary report. **Indian Journal of Medical Research**, v. 57, p. 495–502, 1969.

RAVIKUMAR, S.; INBANESON, S.J.; SUGANTHI, P. In vitro antiplasmodial activity of ethanolic extracts of South Indian medicinal plants against *Plasmodium falciparum*. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, p. 180-183, 2012.

RINCÃO, V. P.; YAMAMOTO, K. A.; RICARDO, N. M. P. S.; SOARES, S. A.; MEIRELLES, L. D. P.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Polysaccharide and extracts from *Lentinula edodes*: structural features and antiviral activity. **Virology Journal**, v. 9, p. 1-6, 2012.

RISSI, D.R.; OLIVEIRA, F.N.; RECH, R.R.; PIEREZAN, F.; LEMOS, R.A.A.; BARROS, C.S.L. Epidemiologia, sinais clínicos e distribuição das lesões encefálicas em bovinos afetados por meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, p. 123-132, 2006.

ROIZMAN, B.; KNIPE, D.M.; WHITLEY, R.J. Herpes Simplex Viruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 2503–2601.

ROSSMANN, M.G; HE, Y.; KUHN, R.J. **Picornavirus–receptor interactions**. Trends in Microbiology, p. 324–331, 2002. v.10.

SAHA, R.K.; TAKAHASHI, T.; KUREBAYASHI, Y.; FUKUSHIMA, K.; MINAMI, A.; KINBARA, N.; ICHITANI, M.; SAGESAKA, Y.M.; SUZUKI, T. Antiviral effect of strictinin on influenza virus replication. **Antiviral Research**, v. 88, p. 10–18, 2010a.

SAHA, S.; GALHARDI, L.C.F.; YAMAMOTO, K.A.; LINHARES, R.E.C.; BANDYOPADHYAY, S.S.; SINHA, S.; NOZAWA, C.; RAY, B. Water-extracted polysaccharides from *Azadirachta indica* leaves: structural features, chemical modification and anti-bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, p. 640–645, 2010b.

SAHA, S.; NAVID, M.H.; BANDYOPADHYAY, S.; SCHNITZLER, P.; RAY, B. Sulfated polysaccharides from *Laminaria angustata*: Structural features and *in vitro* antiviral activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 123–130, 2012.

SAIRAM, M.; ILAVAZHAGAN, G.; SHARMA, S.K.; DHANRAJ, S.A.; SURESH, B.; PARIDA, M.M.; JANA, A.M.; DEVENDRA, K.; SELVAMURTHY, W. Anti-microbial activity of a new vaginal contraceptive NIM-76 from neem oil (*Azadirachta indica*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 377-382, 2000.

SANTOS, C.L.S.; ISHIDA, M.A.; FOSTER, P.G.; SALLUM, M.A.M.; BENEGA, M.A.; BORGES, D.B.; CORREA, K.O.; CONSTANTINO, C.R.O.; AFZAL, M.A.; PAIVA, T.M. Detection of a New Mumps Virus Genotype during parotitis epidemic of 2006–2007 in the State of São Paulo, Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 80, p. 323–329, 2008.

SANTOS, N.S.O.; WIGG, M.D.; OLIVEIRA, D.P. Viroses multissistêmicas. In: SANTOS, N.O.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D. **Introdução à Virologia Humana**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 290-330.

SANTOS, N.O.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D. **Introdução à Virologia Humana**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

SATYAVATI, G.V.; RAINA, M.K.; SHARMA, M. **Medicinal plants of India**. New Delhi: Indian Council of Medical Research, 1976. p. 112–117. v. 1.

SAWTELL, N.M.; THOMPSON, R.L. Rapid *in vivo* reactivation of herpes simplex virus in latently infected murine ganglionic neurons after transient hyperthermia. **Journal of Virology**, v. 66, p. 2150–2156, 1992.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.I.; MEDOFF, G. **Microbiologia: Mecanismos das doenças infecciosas**, 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-koogan, 2002. 642 p.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN G.; PETROVICK P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (eds). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2001. p. 302-304.

SEMPLE, S.J.; PYKE, S.M.; REYNOLDS, G.D.; FLOWER, R.L.P. *In vitro* antiviral activity of the anthraquinone chrysophanic acid against poliovirus. **Antiviral Research**, v. 49, p. 169–178, 2001.

SHANNAN, W.M. Antiviral agents and viral diseases of man. In: GALASSO, G.J.; MERIGAN, T.C.; BUCHANAN, R.A. (Eds.). **Antiviral Agents and Viral Diseases of Man**. New York: Raven Press, 1984. p. 55– 121.

SHARMA, H.C.; SANKARAM, A.V.B.; NWANZE, K.F. Utilization of natural pesticides derived from neem and custard apple in integrated pest management. In: SINGH, R.P.; SAXENA, R.C. (eds.). **Azadirachta indica A. Juss.** New Delhi: Oxford & IBH Publishing Co., 1999. p.199-211.

SHUKLA, N.D.; TIWARI, V.; VALYI-NAGY, T. Nectin-1-specific entry of herpes simplex virus 1 is sufficient for infection of the cornea and viral spread to the trigeminal ganglia. **Molecular Vision**, v. 18, p. 2711-2716, 2012.

SILVA, I.T.; COSTA, G.M.; STOCO, P.H.; SCHENKEL, E.P.; REGINATTO, F.H.; SIMÕES, C.M.O. In vitro antiherpes effects of a C-glycosylflavonoid-enriched fraction of *Cecropia glaziovii* Sneth/. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, p. 143–148, 2010.

SINGH, P.P.; JUNNARKAR, A.Y.; THOMAS, G.P.; TRIPATHI, R.M.; VARMA, R.K. A pharmacological study of *Azadirachta indica*. **Fitoterapia**, v. 61, p. 164-168, 1990.

SINHA, S.; ASTANI, A.; GHOSH, T.; SCHNITZLER, P.; RAY, B. Polysaccharides from *Sargassum tenerrimum*: Structural features, chemical modification and anti-viral activity. **Phytochemistry**, v. 71, p. 235-242, 2010.

SPEAR, P.G.; LONGNECKER, R. Herpesvirus entry: an update. **Journal of Virology**, v. 77, p. 10179-10185, 2003.

SPEAR, P.G.; MANOJ, S.; YOON, M.; JOGGER, C.R.; ZAGO, A.; MYSCOFSKI, D. Different receptors binding to distinct interfaces on herpes simplex virus gD can trigger events leading to cell fusion and viral entry. **Virology**, v. 344, p. 17-24, 2006.

SRIWILAIJAROEN, N.; FUKUMOTO, S.; KUMAGAI, K.; HIRAMATSU, H.; ODAGIRI, T.; TASHIRO, M.; SUZUKI, Y. Antiviral effects of *Psidium guajava* Linn. (guava) tea on the growth of clinical isolated H1N1 viruses: Its role in viral hemagglutination and neuraminidase inhibition. **Antiviral Research**, v. 94, p. 139–146, 2012.

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.

STRANG, B.L.; STOW, N.D. Blocks to herpes simplex virus type 1 replication in a cell line, tsBN2, encoding a temperaturesensitive RCC1 protein. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 376–383, 2007.

TAUBENBERGER, J.K.; MORENS, D.M. Influenza: The Once and Future Pandemic. **Public Health Reports**, v. 125, p. 16-26, 2010.

TAYLOR, T.J.; BROCKMAN, M.A.; MCNAMEE, E.E.; KNIPE, D.M. Herpes Simplex Virus. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, p. 752-764, 2002.

TAYLOR, J.M.; LIN, E.; SUSMARSKI, N.; YOON, M.; ZAGO, A.; WARE, C.F.; PFEFFER, K.; MIYOSHI, J.; TAKAI, Y.; SPEAR, P.G. Alternative entry receptors for herpes simplex virus and their roles in disease. **Cell Host & Microbial**, v. 2, p. 19-28, 2007.

THAKUR, R.S.; SINGH, S.B.; GOSWAMI, A. *Azadirachta indica* A. Juss. A review. **Current Research Medicinal Aromatic Plants**, v. 3, p. 135–40, 1981.

THOMPSON, R.L.; SAWTELL, N.M. Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript gene promotes neuronal survival. **Journal of Virology**, v. 75, p. 6660–6675, 2001.

TIWARI, V.; DARMANI, N.A.; YUE, B.Y.; SHUKLA, D. In vitro antiviral activity of neem (*Azadirachta indica* L.) bark extract against herpes simplex virus type-1 infection. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 1132-1140, 2010.

TOSTESON, M.T.; CHOW, M. Characterization of the ion channels formed by poliovirus in planar lipid membranes. **Journal of Virology**, v. 71, p. 507-511, 1997.

TUTHILL, T.J.; GROPELLI, E.; HOGLE, J.M.; ROWLANDS, D.J. Picornaviruses. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 343, p. 43–89, 2010.

UPADHYAY, S.N.; DHAWAN, S.; GARG, S.; TALWAR, G.P. Immunomodulatory effects of neem (*Azadirachta indica*) oil. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 14, p. 1187-1193, 1992.

UTSUNOMIYA, H.; ICHINOSE, M.; UOZAKI, M.; TSUJIMOTO, K.; YAMASAKI, H.; KOYAMA, H. Antiviral activities of coffee extracts *in vitro*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 1919–1924, 2008.

VIVANCOS, R.; KEENAN, A.; FARMER, S.; ATKINSON, J.; COFFEY, E.; DARDAMISSIS, E.; DILLON, J.; DREW, R.J.; FALLON, M.; HUYTON, R.; JARVIS, R.; MARSH, G.; MASON, R.; SHRYANE, T.; STEWART, A.; GHEBREHEWET, S. An ongoing large outbreak of measles in Merseyside, England, January to June 2012. **Eurosurveillance**, v. 17, p. 202-226, 2012.

WAGNER, E.K.; DEVI-RAO, G.; FELDMAN, L.T.; DOBSON, A.T.; ZHANG, Y.F.; FLANAGAN, W.M.; STEVENS, J.G. Physical characterization of the herpes simplex virus latency-associated transcript in neurons. **Journal of Virology**, v. 62, p. 1194–1202, 1988.

WAGNER, E.K.; GUZOWSKI, J.F.; SINGH, J. Transcription of the HSV genome during productive and latent infection. **Progress in Nucleic Acid Research & Molecular Biology**, v. 51, p.123-65, 1995.

WANG, Q.Y.; ZHOU, C.; JOHNSON, K.E.; COLGROVE, R.C.; COEN, D.M.; KNIPE, D.M. Herpesviral latency-associated transcript gene promotes assembly of heterochromatin on viral lytic-gene promoters in latent infection. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 102, p. 16055–16059, 2005.

WANG, L.; HUANG, H.Y.; WEI, Y.Y.; LI, X.X.; CHEN, Z.X. Characterization and anti-tumor activities of sulfated polysaccharide SRBPS2a obtained from defatted rice bran. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, p. 427–431, 2009.

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

WILLIAMS, D.L.; LOWMAN, D.W.; ENSLEY, H.E. Introduction to the chemistry and immunobiology of  $\beta$ -glucans. In YOUNG, S.H.; CASTRANOVA, V. (eds). **Toxicology of 133-Beta-Glucans. Glucans as a Marker for Fungal Exposure**. New York: Taylor & Francis, 2004. p. 1–34.

WHITLEY, R.J.; NAHMIAS, A.J.; SOONG, S.J.; GALASSO, G.G.; FLEMING, C.L.; ALFRED, C.A. Vidarabine therapy of neonatal herpes simplex virus infection. **Pediatrics**, v. 66, p. 495-501, 1980.

WHITLEY, R.J.; GNANN JR, J.W.; HINTHORN, D.; LIU, C.; POLLARD, R.B.; HAYDEN, F.; MERTZ, G.J.; OXMAN, M.; SOONG, S.J. Disseminated herpes zoster in the immunocompromised host: a comparative trial of acyclovir and vidarabine. National Institute of Allergy and Infectious Diseases collaborative antiviral study. **Journal infection diseases**, v. 165, p. 450-455, 1992.

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

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Immunization, Vaccines and Biological. **Vaccine preventable diseases: monitoring system**, 2012.

WIGG, M.D. Vírus da Imunodeficiência Humana. In: SANTOS, N.O.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D. **Introdução à Virologia Humana**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008a. P. 410-447.

WIGG, M.D. Antivirais. In: SANTOS, N.O.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D. **Introdução à Virologia Humana**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008b. p. 117-146.

WIGG, M.D.; MIRANDA, M.M.F.S. Vírus dermatotrópicos. In: SANTOS, N.O.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D. **Introdução à Virologia Humana**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 177-211.

WOO, S.B.; CHALLACOMBE, S.J. Management of recurrent oral herpes simplex infections. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology and endodontics**. v. 103, p. 1-18, 2007.

WOOD, D.J.; SUTTER, R.W.; DOWDLE, W.R. Stopping poliovirus vaccination after eradication: issues and challenges. **Bulleting of the world health organization**, v. 78, p. 347-357, 2000.

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

YAMAMOTO, K.A.; GALHARDI, L.C.F.; RINCÃO, V.P.; SOARES, S.A.; VIEIRA, I.G.P.; RICARDO, N.M.P.S.; NOZAWA, C.; LINHARES, R.E.C. Antiherpetic activity of an *Agaricus brasiliensis* polysaccharide, its sulfated derivative and fractions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 52, p. 9– 13, 2013.

YANG, C.F.; NAGUIB, T.; YANG, S.J.; NASR, E.; JORBA, J.; AHMED, N.; CAMPAGNOLI, R.; AVOORT, H.V.D.; SHIMIZU, H.; YONEYAMA, T.; MIYAMURA, T.; PALLANSCH, M.; KEW, O. Circulation of endemic type 2 vaccine-derived poliovirus in Egypt from 1983 to 1993. **Journal of Virology**, v. 77, p. 8366-8377, 2003.

YANG, Y.; XIU, J.; ZHANG, L.; QIN, C.; LIU, J. Antiviral activity of punicalagin toward human enterovirus 71 *in vitro* and *in vivo*. **Phytomedicine**, v. 20, p. 67–70, 2012.

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

ZHANG, M.; CHEUNG, P.C.K.; OOI, V.E.C.; ZHANG, L. Evaluation of sulfated fungal  $\beta$ -glucans from the sclerotium of *Pleurotus tuberregium* as a potential water-soluble antiviral agent. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 2297–2301, 2004.

**ANEXOS**

**ANEXO A**

Water-extracted polysaccharides from *Azadirachta indica* leaves: structural features, chemical modification and anti-bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) activity.



## Water-extracted polysaccharides from *Azadirachta indica* leaves: Structural features, chemical modification and anti-bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) activity

Sudipta Saha<sup>a</sup>, Ligia C.F. Galhardi<sup>b</sup>, Kristie A. Yamamoto<sup>b</sup>, Rosa Elisa C. Linhares<sup>b</sup>, Shrutti S. Bandyopadhyay<sup>a</sup>, Sharmistha Sinha<sup>a</sup>, Carlos Nozawa<sup>b</sup>, Bimalendu Ray<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Natural Products Laboratory, Department of Chemistry, The University of Burdwan, Golapag, Burdwan, WB 713 104, India

<sup>b</sup> Departamento de Microbiologia, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, 86051-990, Londrina, PR, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 13 July 2010

Received in revised form 15 August 2010

Accepted 17 August 2010

Available online 21 August 2010

#### Keywords:

*Azadirachta indica*

Polysaccharide

Chemical modification

Anti-viral activity

### ABSTRACT

In this study, we have analyzed the pectic arabinogalactan isolated from *Azadirachta indica* and its chemically sulfated derivative. The native polysaccharide had an apparent molecular mass of 80 kDa and is made up of (1 → 5)-/(1 → 3,5)-linked α-L-arabinosyl, (1 → 3)-/(1 → 6)-/(1 → 3,6)-linked β-D-galactosyl, and terminal-rhamnosyl and α-L-arabinosyl residues. These macromolecules showed activity against bovine herpesvirus type-1. Their inhibitory concentration 50% values ranging from 31.12 to 105.25 μg/ml were lower than the cytotoxicity values (>1600–1440 μg/ml). The anti-viral effect was exerted during virus adsorption to the cell. Anionic groups in particular the sulfate groups appeared to be very important for the anti-herpetic activity of these polymers.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Herpesviridae* is a family of enveloped, double-stranded DNA viruses with relatively large complex genomes. They replicate in the nucleus of a wide range of vertebrate hosts, including eight varieties isolated in humans, several each in horses, cattle, mice, pigs, chickens, turtles, lizards, fish, and even in some invertebrates, such as oysters. Bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) a member of the *Alphaherpesvirinae* subfamily is an important pathogen of cattle that is distributed worldwide. It has similar biological properties to human herpes simplex virus. BoHV-1 causes infectious bovine rhinotracheitis, a highly contagious disease of cattle, characterized by severe inflammation of the upper respiratory passages and trachea. This virus is also the etiologic agent of vulvovaginitis, balanoposthitis, abortion, conjunctivitis, meningoencephalitis, and fatal systemic infections. BoHV-1, like other alphaherpesviruses can establish latent state in ganglionic neurons after infection [1].

There are two different classes of clinically used anti-viral drugs: the nucleoside analogs and DNA polymerase inhibitors. However, for instance, the prolonged therapy with acyclovir, the most successful anti-herpetic drug, has resulted in some undesirable complications [2] and also induces the emergence of drug-resistant

virus strains [3]. Therefore, development of new anti-herpetic agents, especially those with a novel mode of action is an urgent task.

In recent years, many compounds having potent anti-viral activity in cell cultures have been detected and some of these compounds are currently undergoing either preclinical or clinical evaluation. Among these anti-viral substances, anionic polysaccharides from natural sources and of synthetic origin are noteworthy [4]. To date, the performance of these macromolecules in efficacy trials has been disappointing [5,6], but next-generation concepts now in or approaching clinical trials offer improved prospects for efficacy [7,8]. Because sulfated polysaccharides are safe and acceptable [9,10], development of several second-generation combination formulation based on first generation lead candidates may be more effective [11–13]. The identification of active polysaccharides from natural sources may identify macromolecules with superior efficacy. Moreover, structurally defined polysaccharide made by chemical sulfation may also produce drug candidate with higher potency.

*Azadirachta indica* A. Juss (locally known as neem), prevalent in the tropical countries of the world, has been reported to possess anti-inflammatory, anti-pyretic, hypoglycaemic, anti-microbial and anti-cancerous activities [14–19]. The insecticidal properties of different parts of neem tree have been well documented. Leaves of neem are used by indigenous people in different parts of India for curing gastrointestinal disorder such as diar-

\* Corresponding author. Tel.: +91 34 22 55 65 66; fax: +91 34 22 63 42 00.  
E-mail address: [bimalendu.ray@yahoo.co.uk](mailto:bimalendu.ray@yahoo.co.uk) (B. Ray).

rhea and cholera. However, evaluation of its anti-viral properties is limited to few viruses viz. measles, chicken pox, herpes simplex virus (HSV) and human immunodeficiency virus (HIV). Several reports have also highlighted the pronounced anti-viral efficacy of aqueous extract of neem leaves against small pox, polio and HSV, as assessed by virus inhibition assay [20–22]. While chikungunya, measles and vaccinia viruses were significantly inhibited, no such activity was encountered against certain viruses e.g. Japanese encephalitis, West Nile, dengue (type 2), mumps, parainfluenza and HSV [23]. Recent data suggest that aqueous extract of neem leaves and a fraction from neem oil are able to suppress HIV and poliovirus, respectively [19]. However, these authors used only crude extracts and the identity of the active principle has not yet been reported.

The present study reports isolation and chemical characterization of water-extracted polysaccharides generated from *A. indica* leaves. Using chemical and chromatographic methods, and various forms of spectroscopy we have been able to deduce structural features of a pectic arabinogalactan. The possibility to generate derivative by chemical sulfation in the *O*-positions along the polysaccharide chain has led to the synthesis of sulfated derivative with different charge density. With these tailored modification a macromolecule has been generated that have anti-herpetic activity and low cytotoxicity.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Isolation of polysaccharide

Samples of *A. indica* A. Juss were collected from 'Garden of Medicinal plants', Golapbag Campus, The University of Burdwan, Burdwan, India in February 2009. Collected leaves were washed thoroughly with water and converted into paste by using a blender (Warring Products Inc., Torrington, CT, USA).

Neem paste (84 g) was extracted with distilled water (w:v:: 1:20) at 25–30 °C for 6 h under constant stirring (thrice). Residue was separated from the extraction medium by filtration through a glass filter (G-3), washed with additional distilled water and the wash was collected to maximize polysaccharide recovery. The combined extract was dialyzed extensively against water and lyophilized. The recovered material was dissolved in water, diluted with ethanol (4 volumes) and the precipitate collected by centrifugation (three times). The final pellet was redissolved in water and lyophilized to yield the fraction, named P1 (720 mg).

### 2.2. Sugar analysis

Total sugars and uronic acids were determined by the phenol-sulfuric acid [24] and *m*-hydroxydiphenyl [25] assay, respectively. Polysaccharides were hydrolyzed with 2 M trifluoroacetic acid (2 h, 100 °C) for measurement of individual neutral sugar. Released saccharides were reduced, acetylated and analyzed as their alditol acetate by GLC-MS. Sugars in the acid hydrolysate was also analyzed by thin layer chromatography as described [26]. Alternatively, trimethyl silyl (TMS) derivatives of (–)-2-butyl glycosides were analyzed by GLC [27,28].

### 2.3. Sulfation

P1 was sulfated with SO<sub>3</sub>-pyridine complex as described previously [29]. Briefly, a suspension of sample (100 mg) and SO<sub>3</sub>-pyridine complex (75 mg) in 15 ml of dry DMF was sonicated and 37 μl of dry pyridine was added to this. Next, this suspension was heated in an oil bath at 90 °C in nitrogen atmosphere for 2.0 h, cooled, neutralized with NaOH, dialyzed, and lyophilized to give the sulfated polysaccharide P1S (62.8 mg).

### 2.4. Linkage analysis

The P1 (~5 mg) was subjected to two rounds of methylation [30]. The methylated polysaccharide was hydrolyzed, and the liberated glycoses converted into their partially methylated alditol acetates and analysed by GLC and GLC-MS as described [31].

### 2.5. Size exclusion chromatography (SEC)

The water-extracted fraction P1 was chromatographed on a Sephacryl™ S-300 column (2.6 cm × 90 cm; Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) using 0.5 M sodium acetate buffer (pH 5.0) as eluent as described [32].

### 2.6. Spectroscopy

Recording of infrared (FT-IR) spectra were carried out as described previously [32]. The <sup>1</sup>H NMR spectrum was recorded on a Bruker 500 (Bruker Biospin AG, Fallanden, Switzerland) operating at 500 MHz for <sup>1</sup>H. The freeze-dried sample was deuterium-exchanged by lyophilization with D<sub>2</sub>O (Cambridge Isotopes Laboratories, Cambridge, MA, USA) and then examined in D<sub>2</sub>O (99.96 atom% D).

### 2.7. Cells and virus

HEp-2 cells (epithelial cells of human larynx carcinoma, ATCC CCL-23) were grown at 37 °C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) and treated with 100 μg/ml streptomycin (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO), 100 IU/ml of penicillin (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO) and 2.5 μg/ml of fungizone (Bristol Myers-Squibb, São Paulo).

Bovine herpesvirus-1 (BoHV-1) was supplied by DMVP/UEL, PR, Brazil. The virus stock was prepared in HEp-2 cell cultures and maintained at –80 °C. The virus titer was determined by the plaque assay.

### 2.8. Cytotoxicity assay

The evaluation of the test substances for cytotoxicity was carried out using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (MTT-based assay kit, Sigma Chem. Co., St. Louis, MO) according to the manufacturer's instructions. HEp-2 cells were grown in 96-well microplates (Nunc A/S, Roskilde) at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. After cell confluence of 70% monolayer medium was replaced with fresh medium containing different concentrations of polysaccharides (P1 and P1S) (100–1600 μg/ml) and incubated for 72 h at 37 °C and cell viability was then determined. The 50% cytotoxic concentration (CC<sub>50</sub>) was calculated as the concentration of the test substances capable of reducing the optical density of the MTT product by 50% in relation to the controls, by regression analysis.

### 2.9. Time-of-addition assay

The effect of time of addition of the substance on the replication of BoHV-1 was determined according to Yang et al. [33], but with minor modifications. HEp-2 cells were cultivated in 24-well plates (TPP, Trasadingen) and incubated at 37 °C for 48 h in 5% CO<sub>2</sub>. DMEM containing 2-fold serial concentrations of P1 and P1S (25–200 μg/ml) were added at different times: before (–1 and –2 h), during (0 h) and after (1 and 2 h) viral infection at a multiplicity of infection (MOI) of 1. Plaque assay was carried out with DMEM containing 1.5% agarose. After incubation for 48 h, cells were fixed with 10% formaldehyde in phosphate-buffered saline

(PBS), pH 7.3, for 24 h and stained with 0.5% crystal violet in 20% ethanol. The percent viral inhibition (% VI) was calculated by the following formula:  $[1 - (\text{number of plaques with drug} / \text{number of plaques in control})] \times 100$ . The 50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) was determined as the concentration of the test substance capable of reducing the number of plaque forming unit (PFU) by 50%. The selectivity index (S.I.) was expressed as the ratio of  $CC_{50}/IC_{50}$ .

### 2.10. Immunofluorescence assay

HEp-2 cells grown on glass cover slips were infected with BoHV-1 at a MOI of 1; P1 and P1S at the concentrations of 25–200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  were added at 0 h, and the cells were incubated for 24 h. The cover slips were washed and the cells fixed with cold acetone ( $-20^\circ\text{C}$ ) for 20 min, followed by the addition of bovine anti-BoHV-1 antibodies (DMVP/UDEL) and rabbit anti-bovine IgG FITC conjugate (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO). The cells were examined under UV light, and 100 cells/cover slip were scored.

## 3. Results and discussion

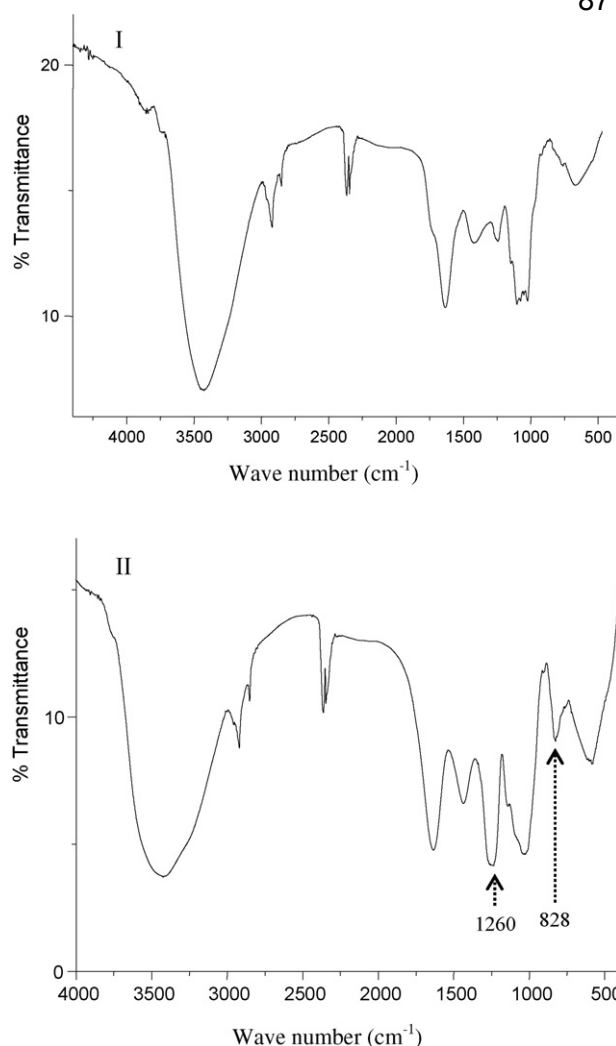
### 3.1. Isolation, purification and molecular mass

The central goal of this study was to investigate the anti-BoHV-1 activity of polysaccharides generated from the medicinal plant *A. indica* and to analyze the structural features of the purified material. In Indian ayurvedic system of medicine a decoction of the leaves of this plant in water is used against a number of diseases, therefore powder of dry leaves of this plant was extracted with water. The use of water as extractant at  $25\text{--}30^\circ\text{C}$ , in principle, excluded the extraction of physiologically inactive starch, present in the leaves. Purification was done by graded precipitation of the water-extracted material with ethanol. The water-extracted polysaccharide (P1) amounted to 0.85% of the starting leaves' dry weight and contained 67% polysaccharide on the basis of fraction dry weight. Sugar compositional analysis revealed the presence of arabinose (47%) and galactose (24%) as the major neutral sugar together glucose (15%), rhamnose (7%), xylose (3%), mannose (3%) and trace amount of fucose (1%) units (mole% of anhydro sugars). The absolute configuration of arabinose, galactose and glucose was determined by g.l.c. of the trimethylsilylated ( $-$ )-2-butyl glycosides, prepared from the polysaccharide are L, D and D, respectively [27,28]. The uronide content of this fraction was 15% on the basis of fraction dry weight. Thin layer chromatographic analysis of the monosaccharides present in the hydrolysate indicates the presence of, *inter alia*, uronic acids with  $R_f$  values similar to those of galacturonic and glucuronic acid. This fraction does not respond to the  $I_2/\text{KI}$  test for starch.

Size exclusion chromatography of P1 fraction showed that this polysaccharide is polydisperse, as generally observed for pectins. Based on calibration with dextrans, P1 showed a broad molecule-mass distribution pattern ( $M_w \sim 10\text{--}250$  kDa) with a dominance of 80 kDa molecule-mass polysaccharide.

### 3.2. Chemical modification and IR spectroscopy

This polysaccharide (P1) was chemically modified to yield the sulfated derivative (P1S) whose sugar composition is similar to that of the native polysaccharide. But the total sugar, uronide and sulfate content of this fraction (P1S) are 41%, 10% and 4% respectively, on the basis of fraction dry weight. IR spectra of the native polysaccharide (P1) and its *O*-sulfated derivative P1S (Fig. 1) strongly suggest the conversion of hydroxyl groups to *O*-sulfate groups. The intensity of the absorbances at  $1260$  and  $800\text{--}850$   $\text{cm}^{-1}$  attributed to the stretching of  $\text{S}=\text{O}$  bond and  $\text{C}-\text{O}-\text{S}$  bonds, respectively, are dramatically increased by *O*-sulfation. Similarly, the intensity of the



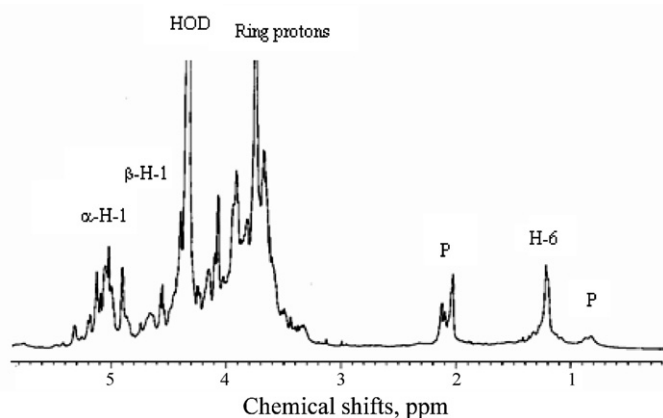
**Fig. 1.** FT-IR spectra of (I) the polysaccharide (P1) from *A. indica* leaves and (II) its sulfated derivative (P1S). Absorption band at  $1260$  and  $828$   $\text{cm}^{-1}$  arise from sulfate groups.

bands at  $2932$ ,  $1424$  and  $1004$   $\text{cm}^{-1}$ , attributed to the stretching and deformation vibration of  $\text{C}-\text{O}-\text{H}$  bonds, are decreased in the spectrum of the *O*-sulfated glycan. Assignments of IR absorption bands at  $1260$   $\text{cm}^{-1}$  were based on the principle originally published by Orr [34], and Lloyd et al. [35]. The band at  $828$   $\text{cm}^{-1}$  was ascribed to  $\text{C}-\text{O}-\text{S}$  stretching of equatorial sulfate groups of sugar residues based on Lloyd et al. [35], and Lloyd and Dodgson [36].

### 3.3. NMR spectroscopy

The native polysaccharide (P1) has a very complex  $^1\text{H}$  NMR spectrum (Fig. 2). At least 13 separate spin systems attributable to anomeric protons of different sugar residues were distinguishable in the spectrum of this polysaccharide. The region between  $4.98$  and  $5.29$  ppm.

showed resonances of the anomeric protons of different  $\alpha$ -L-arabinofuranosyl residues. The signals at  $\delta$   $5.29$  and  $5.09$  were attributed to the resonances of H-1 of 5-linked and terminally linked  $\alpha$ -L-arabinofuranosyl residues [37]. The broad peak at  $4.41$  ppm is due to HOD. This spectrum also contains signals of the anomeric proton of  $\beta$ -D-galactopyranosyl residue in the region  $4.40\text{--}4.58$  ppm. The ring protons appear in the region  $3.5\text{--}4.2$  ppm. It also include resonances characteristic of rhamnose residues such as signals from the methyl protons H-6 appearing between  $1.3$  and



**Fig. 2.**  $^1\text{H}$  NMR spectrum at 500 MHz of the water-extracted polysaccharide from *A. indica* leaves. The spectrum was recorded at 80 °C for sample in  $\text{D}_2\text{O}$  solution.  $\alpha\text{-H-1}$  and  $\beta\text{-H-1}$  refer to the signals of the anomeric protons of  $\alpha\text{-L}$ -arabinofuranosyl and  $\beta\text{-D}$ -galactopyranosyl residues. H-6 and P are signals of the methyl proton of rhamnose residues and protein, respectively. The signal for the deuteriated water was designated as HOD.

1.1 ppm. Broad signal at about 0.8 ppm can be attributed to a small proportion of protein molecule in the sample. The high proportion of galacturonic acid, glucose and other residues must be responsible for some of the signals in the spectrum, but is not possible to assign any particular signals to these residues. It can be safely said that the  $^1\text{H}$  NMR spectrum of this polysaccharide is complex and overlapping and inconclusive for structural information as observed for pectins from other plants.

### 3.4. Glycosidic linkage analysis

Partially methylated alditol acetates (PMAA) derived from P1 fraction of *A. indica* were subjected to GLC–MS analysis for unequivocal structural analysis. Arabinose was found in three main methylated products arising from terminal, (1 → 5)- and (1 → 3,5)-linked arabinofuranosyl residues (Table 1), whereas galactose was found in two main methylated products arising from (1 → 3)- and (1 → 3,6)-linked galactopyranosyl residues. Small amount (1 → 6)-linked galactopyranosyl residue together with traces of terminal galactopyranosyl residue was also found. Terminal, (1 → 2)-, (1 → 3)- and (1 → 2,4)-linked rhamnopyranosyl residues and (1 → 4)-linked glucopyranosyl residue were also found.

**Table 1**

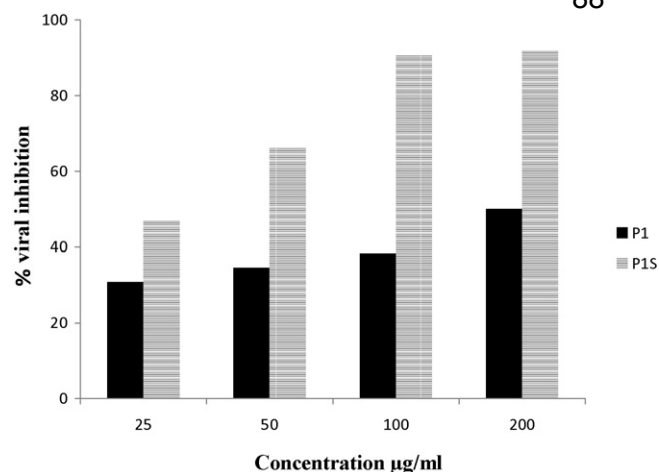
Partially methylated alditol acetates derived from the water-extracted polysaccharide fraction (P1) obtained from *Azadirachta indica* leaves.

Linkages <sup>a</sup>	Peak area <sup>b</sup>
T-Araf	4
1,2-Araf	1
1,5-Araf	28
1,3,5-Araf	17
T-Rhap	1
1,2-Rhap	2
1,3-Rhap	3
1,2,4-Rhap	2
T-Galp	Tr <sup>c</sup>
1,3-Galp	13
1,6-Galp	2
1,3,6-Galp	18
1,4-Glcp	8

<sup>a</sup> T-Araf denotes 1,4-di-O-acetyl-2,3,5-tri-O-methylarabinitol, etc.

<sup>b</sup> Percentage of total area of the identified peaks.

<sup>c</sup> Trace.



**Fig. 3.** Effect of polysaccharides (P1 and P1S) generated from *A. indica* on bovine herpesvirus replication in HEP-2 cells by immunofluorescence assay. The substances were added at 0 h of infection. The percentage of inhibition was calculated with respect to untreated infected cells. The experiments were carried out in duplicate.

### 3.5. Cytotoxic assay

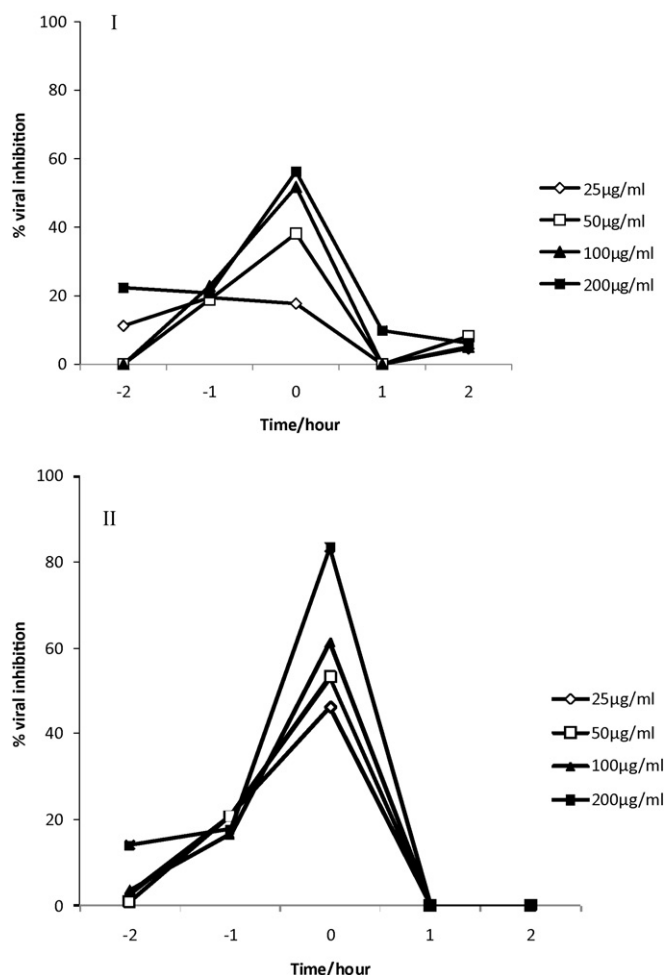
The 50% cytotoxic concentration ( $\text{CC}_{50}$ ) of the anionic polysaccharide extracted from *A. indica* and its' sulfated derivatives on HEP-2 cells was determined by MTT assay. The 50% cytotoxic concentration ( $\text{CC}_{50}$ ) was 1440  $\mu\text{g/ml}$  to P1 and higher than 1600  $\mu\text{g/ml}$  to P1S. No effect on cell viability was detected for the two tested polysaccharides at concentrations up to 1440  $\mu\text{g/ml}$ . Thus a very low or no toxicity can be assumed for these compounds.

### 3.6. Anti-viral activity

The anti-viral effects of each of the anionic polysaccharides from *A. indica* were evaluated against BoHV-1, under time-of-addition protocol, by standard plaque reduction assays. The 50% inhibitory concentrations ( $\text{IC}_{50}$ ) and cytotoxic concentration (50%) of the water-extracted polysaccharide (P1) and its sulfated derivative (P1S) against BoHV-1 are 105.25 and 1440  $\mu\text{g/ml}$ , and 32.12 and >1600  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. Their selectivity indices (S.I.) are 13.6 and >51.4, respectively. The effect of polysaccharide P1 and P1S on BoHV-1 replication evaluated by immunofluorescence assay showed activity in a dose-dependent curve (Fig. 3). This result corroborates with the findings of plaque assay as shown in Fig. 4.

### 3.7. Influence of charge density and the nature of anionic group on anti-BoHV-1 activity

The water-extracted pectic arabinogalactan (P1) showed low anti-viral activity, although this macromolecule contains 0.2 carboxyl group per sugar residue. On the other hand the chemically sulfated polymer (P1S), which contains sulfate group, is about 3.5-fold more active against BoHV-1. Because of the presence of sulfate groups the charge density of the later fraction is higher than that of the former and, therefore, it is normal that later has higher activity. As seen from a structural point of view, a highly charged molecule is more likely to interfere efficiently with electrostatic interactions between the positively charged region of a viral glycoprotein and the negatively charged HS chains of the cell-surface glycoprotein receptor [38]. Notably, this increase in activity after sulfation cannot be explained by charge density alone. Perhaps the anti-viral activity of sulfated polysaccharide of present study depends also upon the nature of anionic groups. Sulfates are important for



**Fig. 4.** Time-of-addition effect of polysaccharides from *A. indica*, P1 (I) and P1S (II) on bovine herpesvirus replication in HEp-2 cells by the plaque assay. The polysaccharides were added at various concentrations before (–2 and –1 h), during (0 h) or after (1 and 2 h) virus infection.

activity, whereas polymer containing carboxyl groups shows less potency. This result is in agreement with data published earlier [38]. Thus, P1S is the most potent and selective inhibitor of BoHV-1 of the two fractions examined.

### 3.8. Mechanism of action

A time-of-addition experiment was performed to investigate the effect of *A. indica* derived polysaccharides on steps of virus replication. Cells were pretreated with anionic polysaccharides before, during and after viral infection and the results demonstrated a concentration-dependent inhibition of viral plaque formation, where the highest inhibitory effect, approximately 85% to P1S and 60% to P1, was observed with cells treated at time 0 h of infection (Fig. 4). When the host cells were pretreated with polysaccharides prior to infection, the tested drug candidates showed no effect on viral infection (Fig. 4). On the other hand, pretreatment of BoHV-1 with both polysaccharides for 1 h prior to infection caused a reduced inhibition in plaque formation (Fig. 4). These data suggested that the anti-BoHV-1 activity of these macromolecules was exerted directly by interfering with structures of viral envelope or masking viral structures which are necessary for adsorption or entry into host cells as had been shown previously for plant derived extracts and isolated compounds [39].

## 4. Concluding remarks

Although a plethora of research has been reported on exotic *A. indica*, this study represents the first account on the *in vitro* anti-BoHV activity and structural features of the water-extracted polysaccharide. It also highlights several novel and important aspects of neem leaves-derived polysaccharides with regard to their anti-viral properties. (i) A water soluble pectic arabinogalactan and its sulfated derivative could be easily generated from neem leaves with high yield, (ii) these substances exerted biological activity which could be analyzed in cell culture-based assay at a low level of cytotoxicity, (iii) inhibitory effect was demonstrated against BoHV-1, (iv) the presence of sulfate group appeared to be an important hallmark of anti-viral activity, and (v) the main mode of action was directed to viral entry. Further studies will be needed to characterize the mode of anti-viral activity in detail and to define the chances of sulfated polysaccharide for its putative use in suitable applications, e.g. topical administration, of anti-viral treatment (for review see [38]). In addition, the biological activity observed in *A. indica* provides a scientific basis for the use of the plant in traditional medicines.

## Acknowledgements

This work was supported by DST (Grant No. SR/S1/OC-50/2007) to B.R. S.S. and S.S.B thank CSIR for the fellowship. The authors wish to thank to CNPq, CAPES, Fundação Araucária and Proppg/Uel for financial support.

## References

- [1] C. Jones, Clin. Microbiol. Rev. 16 (2003) 79–95.
- [2] D.D. Richman, M.A. Fischl, M.H. Grieco, M.S. Gottlieb, P.A. Volberding, O.L. Laskin, J.M. Leedom, J.E. Groopman, D. Mildvan, M.S. Hirsch, The AZT Collaborative Working Group, N. Engl. J. Med. 317 (1987) 192–197.
- [3] B.A. Larder, G. Darby, D.D. Richman, Science 243 (1989) 1731–1734.
- [4] M. Witvrouw, E. De Clercq, Gen. Pharmacol. 29 (1997) 497–511.
- [5] J. Cohen, Science 319 (2008) 1026–1027.
- [6] R.M. Grant, D. Hamer, T. Hope, R. Johnston, J. Lange, M.M. Lederman, J. Lieberman, C.J. Miller, J.P. Moore, D.E. Mosier, D.D. Richman, R.T. Schooley, M.S. Springer, R.S. Veazey, M.A. Wainberg, Science 321 (2008) 532–534.
- [7] P.J. Klasse, R. Shattock, J.P. Moore, Annu. Rev. Med. 59 (2008) 455–471.
- [8] M. Ekblad, B. Adamiak, T. Bergstrom, K.D. Johnstone, T. Karoli, L. Liu, V. Ferro, E. Trybala, Antivir. Res. 86 (2010) 196–203.
- [9] L.J.M. Bollen, B. Kelly, P.H. Kilmarx, C. Supaporn, C. Cathy, W. Punnepon, S. Nucharee, A. Jullapong, W.T. Jordan, M.M. Janet, J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 47 (2008) 253–257.
- [10] P.H. Kilmarx, K. Blanchard, S. Chaikummao, B.A. Friedland, N. Srivirojana, C. Connolly, P. Witwatwongwana, S. Supawitkul, P.A. Mock, T. Chaowanachan, J. Tappero, Sex. Transm. Dis. 35 (2008) 226–232.
- [11] V. Brache, H. Croxatto, R. Sitruk-Ware, R. Maguire, J.C. Montero, N. Kumar, A.M. Salvatierra, A.S. Tejada, L. Cochón, M.L. Forcelledo, P. Lahteenmaki, F. Alvarez, A. Faundes, Contraception 76 (2007) 111–116.
- [12] S. Liu, H. Lu, A.R. Neurath, S. Jiang, Antimicrob. Agents Chemother. 49 (2005) 1830–1833.
- [13] J. Said, E. Trybala, E. Andersson, K. Johnstone, L. Liu, N. Wimmer, V. Ferro, T. Bergström, Antivir. Res. 86 (2010) 286–295.
- [14] R.P. Patel, B.M. Trivedi, Indian J. Med. Res. 5 (1962) 218–222.
- [15] K.S. Murthy, D.K. Rao, L.B.S. Muthy, Indian J. Pharmacol. 10 (1978) 247–250.
- [16] M. Khan, S.W. Wassilew, in: H. Schumuterer, K.R.S. Ascher (Eds.), Natural Pesticides from Neem Tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and other Tropical Plants, GTZ Eschborn, Germany, 1987, pp. 645–650.
- [17] I.J. Udeinya, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 87 (1993) 471.
- [18] W.R. Kusumran, A. Tepsuwan, P. Kuprodinun, Mutat. Res. 402 (1998) 247–258.
- [19] M. SaiRam, G. Ilavazhagan, S.K. Sharma, S.A. Dhanraj, B. Suresh, M.M. Parida, A.M. Jana, W. Kumar Devendra, Selvamurthy, J. Ethnopharmacol. 1 (2000) 367–372.
- [20] A.R. Rao, S.S.V. Kumar, T.R. Paramsivam, S. Kamalakshi, A.R. Parashuraman, B. Shanta, Indian J. Med. Res. 57 (1969) 495–502.
- [21] A.R. Rai, M. Sethi, Indian J. Anim. Sci. 42 (1972) 1066–1070.
- [22] A.B. Reddy, M.S. Sethi, Indian J. Exp. Biol. 12 (1974) 572–579.
- [23] S.S. Gogate, A.R. Marathe, J. Res. Educ. Indian Med. (1989) 1–5.
- [24] M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith, Anal. Chem. 28 (1956) 350–356.
- [25] A. Ahmed, J.M. Labavitch, J. Food Biochem. 1 (1977) 351–355.

- [26] P. Mandal, C.A. Pujol, E.B. Damonte, T. Ghosh, B. Ray, *Int. J. Biol. Macromol.* 46 (2010) 173–178.
- [27] G.J. Gerwig, J.P. Kamerling, J.F.G. Vliegthart, *Carbohydr. Res.* 62 (1978) 349–357.
- [28] G.J. Gerwig, J.P. Kamerling, J.F.G. Vliegthart, *Carbohydr. Res.* 77 (1979) 1–7.
- [29] S. Sinha, A. Astani, T. Ghosh, P. Schnitzler, B. Ray, *Phytochemistry* 71 (2010) 235–242.
- [30] A.B. Blakeney, B.A. Stone, *Carbohydr. Res.* 140 (1985) 319–324.
- [31] B. Ray, M. Lahaye, *Carbohydr. Res.* 283 (1996) 161–173.
- [32] T. Ghosh, C.A. Pujol, E.B. Damonte, S. Sinha, B. Ray, *Antivir. Chem. Chemother.* 19 (2009) 235–242.
- [33] C.M. Yang, H.Y. Cheng, T.C. Lin, L.C. Chiang, C.C. Lin, *Antivir. Res.* 67 (2005) 24–30.
- [34] S.F.D. Orr, *Biochim. Biophys. Acta* 14 (1954) 173–181.
- [35] A.G. Lloyd, K.S. Dodgson, R.B. Price, F.A. Rose, *Biochim. Biophys. Acta* 46 (1961) 108–115.
- [36] A.G. Lloyd, K.S. Dodgson, *Biochim. Biophys. Acta* 46 (1961) 116–120.
- [37] F.M. Nunes, A. Reis, A.M.S. Silva, M. Rosario, M. Domingues, M.A. Coimbra, *Phytochemistry* 69 (2008) 1573–1585.
- [38] T. Ghosh, K. Chattopadhyay, M. Marschall, P. Karmakar, P. Mandal, B. Ray, *Glycobiology* 19 (2009) 2–15.
- [39] A. Astani, J. Reichling, P. Schnitzler, *Phytother. Res.* 24 (2009) 673–679.

**ANEXO B**

The *in vitro* antiviral property of *Azadirachta indica* polysaccharides for poliovirus.



## The *in vitro* antiviral property of *Azadirachta indica* polysaccharides for poliovirus

Ligia Carla Faccin-Galhardi<sup>a</sup>, Kristie Aimi Yamamoto<sup>a</sup>, Sayani Ray<sup>b</sup>, Bimalendu Ray<sup>b</sup>, Rosa Elisa Carvalho Linhares<sup>a</sup>, Carlos Nozawa<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Microbiologia, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, 86051-990 Londrina, PR, Brazil

<sup>b</sup> Natural Products Laboratory, Department of Chemistry, The University of Burdwan, Golapag, Burdwan, WB 713 104, India

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 September 2011

Received in revised form

23 March 2012

Accepted 10 April 2012

Available online 19 April 2012

#### Keywords:

Antiviral activity

*Azadirachta indica*

Polysaccharides

Poliovirus

### ABSTRACT

**Ethnopharmacological relevance:** *Azadirachta indica* A. Juss, popularly known as neem, has been extensively used in Ayurvedic medicine by Indian population for over 2000 years. It is used traditionally for the healing of various diseases. Natural products and their derivatives provide an excellent source for new anti-viral drugs.

**Aim of the study:** The present study aims at evaluating the activity of two polysaccharides (P1 and P2) isolated from the leaves of *Azadirachta indica* and their chemical sulfated derivatives (P1S and P2S) against poliovirus type 1 (PV-1).

**Materials and methods:** The cytotoxicity of the compounds was analyzed by MTT and the antiviral effect was determined by plaque reduction assay in different protocols.

**Results:** The polysaccharides did not show any cytotoxic effects on HEp-2 cells at the highest tested concentration (200 µg/ml) and exhibited significant antiviral activity with inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) of 80 µg/ml, 37.5 µg/ml, 77.5 µg/ml, and 12.1 µg/ml for P1, P1S, P2 and P2S, respectively, and the selectivity indexes (SI) ranged from 18 to 131.9. The compounds demonstrated better inhibitory effect when added concomitantly with the virus infection with a dose-dependent curve inhibition. Lesser effect was observed when the compounds were added after viral infection and the least effect at pre-treatment.

**Conclusions:** We suggested that the polysaccharides obtained from *Azadirachta indica* act against PV-1 by inhibiting the initial stage of viral replication. Importantly, original polysaccharides showed better virucidal effect than their sulfated derivatives at all tested concentrations. This study provides a scientific basis for the past and present ethnomedical uses of this plant.

© 2012 Published by Elsevier Ireland Ltd.

### 1. Introduction

It has been shown that many natural products have demonstrated potent antiviral activity. For many reasons the search for these substances has been encouraged, amongst them, their low toxicity and possible multistep mechanism, which means, lesser selective pressure for the emergence of resistant strains. Moreover, most of the compounds used for clinical purpose are targeted for a small number of viruses (De Clercq, 2004).

Ethnopharmacological screenings of the medicinal plants have shown that a vast number of phytochemicals such as like alkaloids, anthraquinones, coumarins, flavonoids, polyphenols, tannins, terpenoids, among others, are active against virus (Hupfeld and Efferth,

**Abbreviations:** CC<sub>50</sub>, 50% cytotoxic concentration; IC<sub>50</sub>, 50% inhibitory concentration; SI, selectivity index

\* Corresponding author. Tel.: +55 43 33714617; fax: +55 43 33715828.

E-mail address: [relin@uel.br](mailto:relin@uel.br) (C. Nozawa).

2009). The antiviral activity of the natural compounds may occur by inhibition of one or more steps of viral replication. They can prevent infection by direct interaction with the viral particle; alteration of the adsorption step by binding to cell receptors; inhibition of virus penetration into the host cell, by competing for pathways of activation of intracellular signals, and more commonly, interfering with different stages of viral replication (Ghosh et al., 2009). High-molecular-weight compounds such as sulfated polysaccharides also contained antiviral activity (Ginsberg et al., 1947).

In recent years, a number of sulfated carbohydrate compounds from marine algae, cyanobacteria, and animal sources were described showing potent inhibitory effects against several human and animal viruses (Ghosh et al., 2009). Ono et al. (2003) demonstrated the antiviral property of *Scabrella mimosa* and *Leucaena leucocephala* galactomannans and the sulfated derivatives against yellow fever virus and dengue virus type 1. Mandal et al. (2008) evaluated the activity of the sulfated polysaccharide isolated from *Scinaia hatei* against HSV-1 and

2 and reported that this compound is active against acyclovir resistant strain of HSV-1 (B2006 and Field strains). Sinha et al. (2010) reported that the sulfation of polysaccharides obtained from *Sargassum tenerrimum* increased their anti-HSV activity, and the nature of anionic group, constituent sugars and molecular mass also influence the anti-viral activity. The biological properties of these sulfated polysaccharides strongly depend on the degree of sulfation and the specific position of the sulfate ester group. The greater the degree of sulfation the better biological activity is expected (Ghosh et al., 2009). Specific position of the sulfate group is also important (Copeland et al., 2008; Ghosh et al., 2009). The sulfation of native polysaccharide may improve their biological activities and produce drug candidate with higher potency and less cytotoxicity (Sinha et al., 2010).

Poliovirus, the etiologic agent of poliomyelitis, is a member of the genus *Enterovirus* of the *Picornaviridae* family, a small, non-enveloped and positive single-stranded RNA virus (Racaniello, 2007). Currently, poliovirus is under control in most part of the world, but, despite extensive efforts to eradicate the virus, the disease remains endemic in some countries in Africa and Asia, with 1294 cases reported in 2010 (Global Polio Eradication Initiative, 2011). Due to the epidemiological importance, poliovirus is one of the best understood models of virus and, therefore, much used in tests for new antiviral drugs.

*Azadirachta indica* A. Juss, popularly known as neem, has been extensively used in Ayurvedic medicine by Indian population for over 2000 years for the healing of various diseases (Subapriya and Nagini, 2005). The traditional use as antiviral is described for the treatment of animals suffering from bovine and avian poxvirus infections by applying a paste of neem leaves directly on the infected skin (Biswas et al., 2002). Badam et al. (1999) demonstrated that the methanol extract of neem leaves inhibited plaque formation of several serotypes of coxsackievirus B. According to Sairam et al. (2000), neem oil can suppress the replication of poliovirus. Parida et al. (2002) showed the inhibitory effect of neem leaves aqueous extract on dengue virus type 2 both *in vivo* and *in vitro*. Vaibhav et al. (2010) suggested a direct anti-HSV-1 property of neem bark aqueous extract, besides, the inhibition of virion glycoprotein mediated cell-cell fusion and polykaryocytes formation in cell culture. Saha et al. (2010) found a high antiviral activity of isolated polysaccharides from neem leaves against BoHV-1 replication in HEp-2 cells.

In this work we evaluated the antiviral activity of two native *Azadirachta indica* leaves polysaccharides, P1 and P2, and their respective chemically sulfated derivatives, P1S and P2S, in the replication of poliovirus type 1 in HEp-2 cell cultures.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cells and virus

HEp-2 cells (epithelial cells of human larynx carcinoma, ATCC CCL-23) were grown at 37 °C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) and treated with 100 µg/ml streptomycin (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), 100 IU/ml of penicillin (Novafarma Indústria Farmacêutica, Anápolis, GO, BR) and 2.5 µg/ml of fungizone (Meizler Biopharma S/A, São Paulo, SP, BR).

Poliovirus type 1 (PV-1), ATCC, VR-58, was propagated in HEp-2 cell cultures and stored at –20 °C with 10% glycerol. The virus titer was determined by plaque assay.

### 2.2. Compounds

The leaves of *Azadirachta indica* A. Juss were collected from the Garden of Medicinal Plants, Golapbag Campus, The University of

Burdwan, India in February 2009, and plant taxonomy was confirmed by Prof. P.K. Bhattacharya, Department of Botany, The University of Burdwan. The polysaccharides obtained from leaves of *Azadirachta indica*, as previously described (Saha et al., 2010), were extracted by Natural Products Laboratory, Department of Chemistry, University of Burdwan, India. Briefly, the leaves of neem were extracted with distilled water at 25–30 °C for 6 h under constant stirring (thrice). The combined extract was dialyzed extensively against water and lyophilized. The recovered material was dissolved in water and diluted with ethanol (4 volumes). The precipitate was removed by centrifugation to yield P1 fraction, whereas the soluble fraction has been designated as P2. In separate experiments these fractions (P1 and P2) were sulfated using SO<sub>3</sub>-pyridine complex under conditions as described previously (Saha et al., 2010) to yield derivatives P1S and P2S. These sulfated polysaccharides were purified by size elution chromatography on a Superdex™ 30 prep grade column. Fractions eluted at *K<sub>av</sub>* values 0.3–0.6 were pooled and lyophilized. The compounds, P1 and P2, and their respective sulfated forms, P1S and P2S, were dissolved in DMEM, treated with antimicrobials, and stored in aliquot at –20 °C.

### 2.3. Cytotoxicity assay

The cytotoxicity of the compounds in HEp-2 cell grown in 96-well microplates, was determined by MTT (dimethylthiazolyl-diphenyltetrazolium bromide) kit assay (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA), according to the manufacturer's instructions. The test substances were tested at the concentrations of 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, 800 µg/ml and 1600 µg/ml, and cell viability percentage calculated by the formula  $[100 - (At/Ac) \times 100]$ , where *At* and *Ac* refer to the absorbances of test substance and control (untreated cells), respectively. The concentration of the test substance capable of reducing cell viability by 50% in comparison to cell control (CC<sub>50</sub>), was calculated by regression analysis.

### 2.4. Antiviral activity

*Plaque reduction assay (PRA)*—antiviral activity was determined by plaque reduction assay. Briefly, cell cultures grown at 95–100% confluence in 24-well plates (TPP, Trasadingen, CH) were inoculated with PV-1 (50 to 100 PFU) and incubated at 37 °C for 1 h. The infected cell cultures were washed and overlaid with DMEM containing serial concentrations of P1, P2, P1S and P2S (25, 50, 100 and 200 µg/ml), added at different times (time-of-addition assay), before (–1 h and –2 h), during (0 h) and after (+1 h and +2 h) the infection (Yang et al., 2005). Cultures were overlaid with nutrient agarose (DMEM 2x/1.8% agarose [v/v]) containing 25 mM MgCl<sub>2</sub>. After 40 h incubation, cells were fixed with 10% formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.3, for 24 h and stained with 0.5% crystal violet in 20% ethanol. Plaques were counted and the percentage of viral inhibition (%VI) was calculated as  $[1 - (Vd/Vc)] \times 100$ , where *Vd* and *Vc* refer to the number of plaques in the presence and absence of the compounds, respectively (Nishimura et al., 1977). The minimal concentration of the compounds required to reduce 50% of plaque numbers (IC<sub>50</sub>) was calculated by regression analysis of the curve generated by plaque assay. The selectivity index (SI) was expressed by the ratio CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>.

*Virucidal assay*—the direct effect of P1, P2, P1S and P2S on PV-1 was determined by the incubation for 1 h at 37 °C of virus suspension (10<sup>5</sup> PFU/ml) and DMEM containing the same concentrations of the test substances, as before, followed by cell inoculation and viral titer determination by PRA.

*Adsorption inhibition assay*—P1, P2, P1S and P2S were examined for their inhibitory effect in the viral adsorption on HEp-2 cells, according to Zhu et al. (2004) with minor modifications.

Briefly, cell monolayers were previously maintained at 4 °C for 1 h and infected afterwards with and without the test substances at the same concentrations used before. After 80 min of adsorption at 4 °C, the cells were washed three times with cold PBS to remove the non-adsorbed virus followed by PRA.

Human alfa-2B interferon (Meizler Biopharma S/A, SP, BR), at the concentration of 10,000 U/ml, was used as positive control.

**Immunofluorescence assay (IFA)**—the immunofluorescence assay was performed according to Faccin et al. (2007). HEp-2 cells grown in 24-well plates with cover slips were inoculated with 500  $\mu$ l of PV-1 (MOI=1) and treated with test substances at the concentrations of 25–200  $\mu$ g/ml, at the time zero of infection (0 h). Appropriate controls were used. Twenty-four hours post-infection, the cells were washed with 0.05% Tween 20 PBS, fixed with cold acetone (–20 °C) for 20 min and blocked with 2% powdered skim milk PBS during 30 min. The cells were incubated for 30 min at 37 °C with rabbit anti-PV-1 (supplied by INCQSΔ Fiocruz, RJ, BR), further washed three times with Tween 20/PBS and incubated for an additional 30 min at 37 °C with sheep anti-rabbit IgG FITC conjugate (Sigma Chem. Co., MO, USA). The cells were examined in a Zeiss fluorescence microscope (Zeiss Axio Imager.A1) and 100 cells/cover slips were scored and the percentage of fluorescent cells inhibition calculated. The experiments were carried out in triplicate.

### 2.5. Statistical analysis

Anova followed by Tukey's test (BioEstat 5.0 for Windows XP, 2007) were applied to determine the difference among polysaccharides experiments and control groups. Values of  $p < 0.05$  were considered significant.

## 3. Results

### 3.1. Isolation, purification and structural features of polysaccharide containing fractions

The native polysaccharide containing fractions were obtained by water extraction of the leaves of the plant, followed by dialysis, ethanol precipitation and freeze-drying. The ethanol precipitated material has been named as P1 whereas the soluble fraction designated as P2. To investigate the specific effect of sulfate content, we sulfated P1 and P2 fractions to yield sulfated derivatives P1S and P2S, respectively.

Sugar compositional analysis of P1 fraction revealed the presence of arabinose (47%) and galactose (24%) as the major neutral sugar together glucose (15%), rhamnose (7%), xylose (3%), mannose (3%) and trace amount of fucose (1%) units (mole% of anhydro sugars). The galacturonic acid content of this fraction was 15% on the basis of fraction dry weight. This native polysaccharide (P1) had an apparent molecular mass of 80 kDa and is made up of (1→5)-/(1→3,5)-linked  $\alpha$ -L-arabinosyl, (1→3)-/(1→6)-/(1→3,6)-linked  $\beta$ -D-galactosyl, and terminal-rhamnosyl and  $\alpha$ -L-arabinosyl residues. Its sulfated derivative (P1S) contained 10% uronide and 4% sulfate on the basis of fraction dry weight. In addition, the water extracted material (P2) consisting, inter alia, of 51% arabinose, and 26% galactose and its sulfated derivative (P2S) with 8% uronide and 4% sulfate on the basis of fraction dry weight were included.

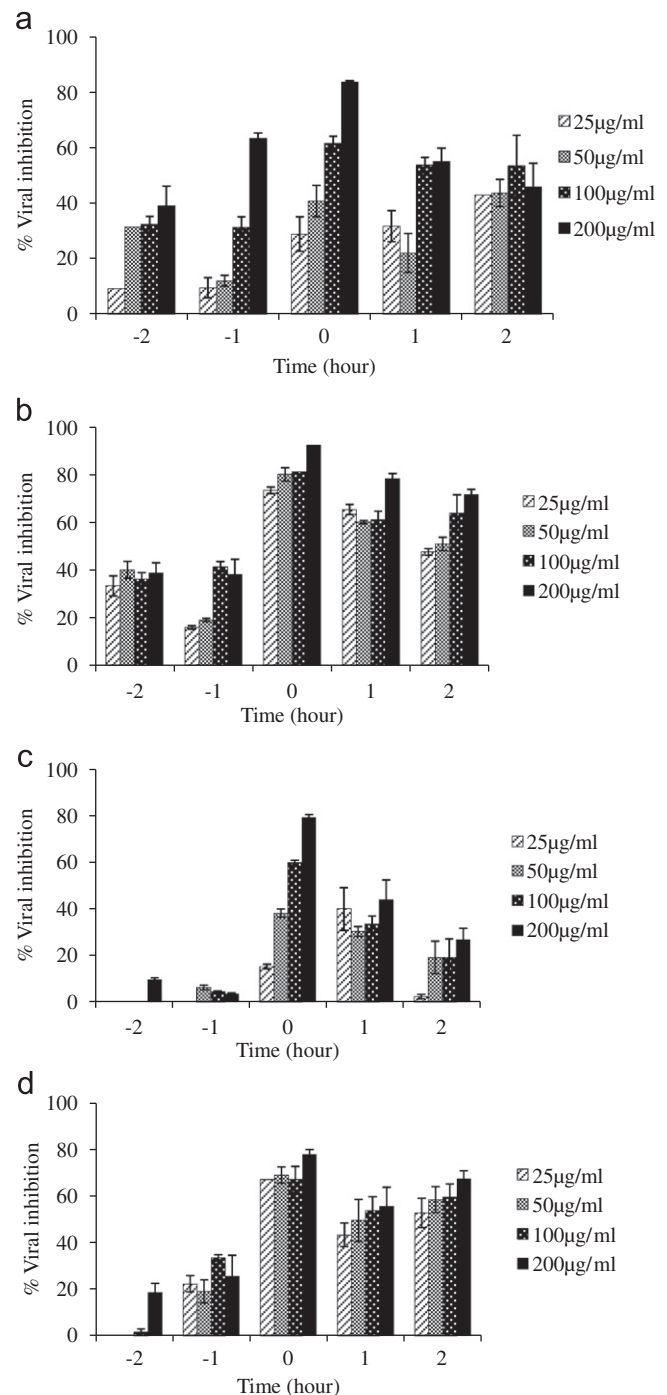
### 3.2. Cytotoxicity assay

The CC<sub>50</sub> values for the polysaccharides and their sulfated derivatives, determined by MTT assay, were greater than 1600  $\mu$ g/ml for P1S, P2, P2S, and 1440  $\mu$ g/ml for P1.

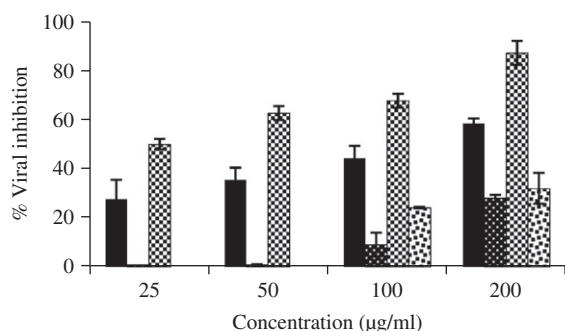
### 3.3. Antiviral activity

The compounds exhibited significant antiviral activity with inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) of 80  $\mu$ g/ml, 37.5  $\mu$ g/ml, 77.5  $\mu$ g/ml and 12.1  $\mu$ g/ml to P1, P1S, P2 and P2S, respectively. The selectivity index (SI) for P1, P1S, P2 and P2S was of 18, > 42.6, > 20.6 and > 131.9, respectively.

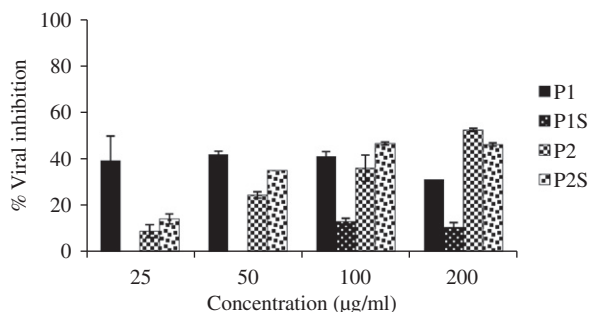
The P1 (Fig. 1a) and P1S (Fig. 1b) demonstrated better inhibitory effect when added concomitantly with the virus infection (time 0 h) and exhibited a concentration-dependent plaque



**Fig. 1.** Effect of the time-of-addition of polysaccharides P1 (a), P1S (b), P2 (c) and P2S (d) from *Azadirachta indica* in the replication of poliovirus type 1 (PV-1), in HEp-2 cells by plaque reduction assay. The percentage of viral inhibition (%VI) was determined in comparison to the controls and the results are expressed as mean  $\pm$  SD of triplicate independent experiments.



**Fig. 2.** Virucidal activity of the *Azadirachta indica* P1, P1S, P2 and P2S polysaccharides in the replication of poliovirus type 1 (PV-1) in HEp-2 cells by plaque reduction assay. The percentage of viral inhibition (%VI) was determined in comparison to controls and the results are expressed as mean  $\pm$  SD of triplicate independent experiments.



**Fig. 3.** The effect of the *Azadirachta indica* polysaccharides P1, P1S, P2 and P2S in the adsorption of poliovirus type 1 (PV-1) on to HEp-2 cells by plaque reduction assay. The percentage of viral inhibition (%VI) was determined in comparison to controls and the results are expressed as the mean  $\pm$  SD of triplicate independent experiments.

reduction, compared with the control. The %VI was 83.6% and 92.2% at the greatest concentrations of P1 and P1S, respectively. The compounds had a lesser effect when added 1 h and 2 h after viral infection with inhibition of 54.9% and 45.9% by P1 and 78.1% and 71.5% by P1S, respectively. An even lesser effect was observed at pre-treatment (–2 h and –1 h).

P2 showed no significant inhibition at all tested concentrations, when added before viral infection. However, when added during the infection and 1 h and 2 h after the infection the inhibition was 79.4, 44 and 26.9%, respectively, for the greatest concentration (Fig. 1c), and also, a concentration-dependent inhibition was shown. P2S was more effective, acting in all times of viral infection with the highest inhibition at time 0 h (Fig. 1d).

The direct inactivating effect of P1, P1S, P2 and P2S on PV-1 (virucidal activity) resulted in %VI of 58.4%, 27.8%, 87.2% and 31.9%, respectively (Fig 2).

The adsorption inhibition assay was performed in the presence of varying concentrations of P1, P2, P1S and P2S, and the infectivity of the PV-1 was inhibited at percentages ranged from 10.3% up to 52.4%, at the greatest concentration, as shown in Fig. 3.

Interferon inhibited 100% of PV-1 at the concentration of 10,000 U/ml.

The IFA was performed at the time 0 h of infection. All the compounds, at the concentrations from 25  $\mu$ g/ml to 200  $\mu$ g/ml, demonstrated high percentages of the inhibition of fluorescent cells, varying from 49.8–83.2% for P1; 54.7–95.5% for P1S; 15.3–100% for P2 and 74–89.1% for P2S.

#### 4. Discussion

In this study we demonstrated the antiviral action of polysaccharides obtained from the leaves of *Azadirachta indica* and

their sulfated derivatives against poliovirus type 1, a naked virus. The structures of the polysaccharides applied have been investigated in detail prior studies on the antiviral activity. The detailed structural characterization has been published recently (Saha et al., 2010).

The preparations of polysaccharides were analyzed for antiviral activity. For this purpose, an established cell culture-based assay for quantifying the replication of PV-1 was applied, which has proved to be highly reliable for the screening of novel antiviral substances. Amongst all substances analyzed, P1S and P2S exerted a particularly strong inhibitory activity towards PV-1 replication (Fig. 1B and D). No sign of cytotoxicity was observed for these substances in the analyzed range of concentrations. The lowest 50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of anti-PV-1 activity was determined for P2S. Importantly, the sulfated derivatives (P1S and P2S) showed clear PV-1 potential, whereas the non-sulfated parental substances (P1 and P2) were less active. Thus, these data support the previously stated notion that the degree of sulfation is one of the determinants conferring high antiviral activity to polysaccharides (Ghosh et al., 2009).

The tested compounds, P1, P1S, P2 and P2S were highly effective inhibiting the PV-1 above 77%. The maximum antiviral effect was observed when the polysaccharides were added simultaneously to viral infection (Fig. 1) and when added after the infection a reduction in the activity was observed. The original polysaccharides showed better virucidal effect than sulfated forms.

Some studies have reported the antiviral effect of sulfated polysaccharides after virus internalization into the cell. These compounds could interfere in the synthesis of viral proteins or at viral expression in the regulation of the intracellular or transmembrane signaling pathway (Gonzalez et al., 1987; Biesert et al., 1990). Our results showed that the tested polysaccharides maintained the antiviral effect even when added 1 and 2 h after infection, although with a lower percentage of viral inhibition compared to time 0 h. This also suggests an effect during viral replication, for example, in the synthesis of proteins of PV-1. The results of IFA demonstrated a high percentage of inhibition in the number of fluorescent cells by *Azadirachta indica* polysaccharides tested, confirming the results by plaque reduction assay.

#### 5. Conclusion

The evaluation of antiviral activity of polysaccharides isolated from leaves of *Azadirachta indica* and their chemically sulfated derivatives demonstrated that the compounds were effective to inhibit the replication of PV-1 and the sulfation improved these activities. We suggested that the antiviral activity of these compounds takes place in the initial stage of viral replication, such as, adsorption and/or penetration, however, virucidal activity and the inhibition of viral protein synthesis cannot be ruled out. In conclusion, these polysaccharides present a potential activity as natural antiviral and further studies should be encouraged in preclinical trials.

#### Acknowledgments

The authors wish to thank to CNPq, CAPES, DST (R/S1/OC-50/2007) and Fundação Araucária for financial aid.

#### References

- Badam, L., Joshi, S.P., Bedekar, S.S., 1999. 'In vitro' antiviral activity of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaf extract against group B coxsackieviruses. *Journal of Communicable Diseases* 31, 79–90.

- Biesert, L., Adamski, M., Zimmer, G., Suhartono, H., Fuchs, J., Unkelbach, U., Mehlhorn, R., Hideg, K., Milbradt, R., Rubsamen-Waigmann, H., 1990. Anti-human immunodeficiency virus (HIV) drug HOE/BAY 946 increases membrane hydrophobicity of human lymphocytes and specifically suppresses HIV-protein synthesis. *Medical Microbiology and Immunology* 179, 307–321.
- Biswas, K., Chattopadhyay, I., Banerjee, R.K., Bandyopadhyay, U., 2002. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Current Science* 82, 1336–1345.
- Copeland, R., Balasubramaniam, A., Tiwari, V., Zhang, F., Bridges, A., Linhardt, R.J., 2008. Using a 3-O-sulfated heparin octasaccharide to inhibit the entry of herpes simplex virus type 1. *Biochemistry* 47, 5774–5783.
- De Clercq, E., 2004. Antiviral drugs in current clinical use. *Journal Clinical Virology* 30, 115–133.
- Faccin, L.C., Benati, F., Rincão, V.P., Mantovani, M.S., Soares, S.A., Gonzaga, M.L., Nozawa, C., Linhares, R.E.C., 2007. Antiviral activity of aqueous and ethanol extracts and of an isolated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* against poliovirus type 1. *Letters in Applied Microbiology* 45, 24–28.
- Ghosh, T., Chattopadhyay, K., Marschall, M., Karmakar, P., Mandal, P., Ray, B., 2009. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: from structure–activity analysis to clinical evaluation. *Glycobiology* 19, 2–15.
- Ginsberg, R.H., Goebel, W.F., Horsfall, F.L., 1947. Inhibition of mumps virus multiplication by a polysaccharide. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 66, 99–100.
- Global Polio Eradication Initiative, 2011. Annual Report 2010. WHO Press, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Gonzalez, M., Alarcon, B., Carrasco, L., 1987. Polysaccharides as antiviral agents: antiviral activity of carrageenan. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 31, 1388–1393.
- Hupfeld, J., Efferth, T., 2009. Drug resistance of human immunodeficiency virus and overcoming it by natural products. *In vivo* 23, 1–6.
- Mandal, P., Pujol, C.A., Carlucci, M.J., Chattopadhyay, K., Damonte, E.B., Ray, B., 2008. Anti-herpetic activity of a sulfated xylomannan from *Scinaia hatei*. *Phytochemistry* 69, 2193–2199.
- Nishimura, T., Toku, H., Fukuyasu, H., 1977. Antiviral compounds. XII Antiviral activity of amidinohydrazones of alkoxyphenyl-substituted carbonyl compounds against influenza virus in eggs and in mice. *The Kitasato Archives of Experimental Medicine* 50, 39–46.
- Ono, L., Wollinger, W., Rocco, I.M., Coimbra, T.L.M., Gorin, P.A.J., Sierakowski, M.R., 2003. In vitro and in vivo antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). *Antiviral Research* 60, 201–208.
- Parida, M.M., Upadhyay, C., Pandya, G., Jana, A.M., 2002. Inhibitory potential of neem (*Azadirachta indica* Juss) leaves on Dengue virus type-2 replication. *Journal of Ethnopharmacology* 79, 273–278.
- Racaniello, V.R., 2007. Picornaviridae: the viruses and their replication. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, fifth edition Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 796–837.
- Saha, S., Galhardi, L.C.F., Yamamoto, K.A., Linhares, R.E.C., Bandyopadhyay, S.S., Sinha, S., Nozawa, C., Ray, B., 2010. Water-extracted polysaccharides from *Azadirachta indica* leaves: structural features, chemical modification and anti-bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) activity. *International Journal of Biological Macromolecules* 47, 640–645.
- Sairam, M., Ilavazhagan, G., Sharma, S.K., Dhanraj, S.A., Suresh, B., Parida, M.M., Jana, A.M., Devendra, K., Selvamurthy, W., 2000. Anti-microbial activity of a new vaginal contraceptive NIM-76 from neem oil (*Azadirachta indica*). *Journal of Ethnopharmacology* 71, 377–382.
- Sinha, S., Astani, A., Ghosh, T., Schnitzler, P., Ray, B., 2010. Polysaccharides from *Sargassum tenerrimum*: structural features, chemical modification and antiviral activity. *Phytochemistry* 71, 235–242.
- Subapriya, R., Nagini, S., 2005. Medicinal properties of neem leaves: a review. *Current Medicinal Chemistry—Anticancer Agents* 5, 146–149.
- Vaibhav, T., Nissar, D.A., Beatrice, Y.J.T., Deepak, S., 2010. In vitro antiviral activity of neem (*Azadirachta indica* L.) bark extract against herpes simplex virus type-1 infection. *Phytotherapy Research* 24, 1132–1140.
- Yang, C.-M., Cheng, H.-Y., Lin, T.-C., Chiang, L.-C., Lin, C.-C., 2005. Acetone, ethanol and methanol extracts of *Phyllanthus urinaria* inhibit HSV-2 infection in vitro. *Antiviral Research* 67, 24–30.
- Zhu, W., Chiu, L.C., Ooi, V.E., Ang Jr., P.O., 2004. Antiviral property and mode of action of a sulphated polysaccharide from *Sargassum patens* against herpes simplex virus type 2. *International Journal of Antimicrobial Agents* 24, 81–85.

**ANEXO C**

Antiherpetic activity of the *Azadirachta indica* sulfated polysaccharides

**Original research articles:** Antiherpetic activity of the native polysaccharides and sulfated derivatives from *Azadirachta indica*.

Ligia Carla Faccin-Galhardi<sup>a</sup>, Nayara Lopes<sup>a</sup>, Samantha Fernandes Espada<sup>a</sup>, Jussevania Pereira dos Santos<sup>a</sup>, Bimalendu Ray<sup>b</sup>, Rosa Elisa Carvalho Linhares<sup>a</sup>, Carlos Nozawa<sup>a,c</sup>.

<sup>a</sup> Departamento de Microbiologia, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, 86051-990, Londrina, PR, Brazil.

<sup>b</sup> Natural Products Laboratory, Department of Chemistry, The University of Burdwan, Golapag, Burdwan, WB 713 104, India.

<sup>c</sup> Corresponding author. Phone: +55 43 33714617; fax: +55 43 33715828

*E-mail:* cnoz@uel.br

### Abstract

Herpes simplex virus-1 (HSV-1) infections are common and widespread, nevertheless, their outcome can be of unpredictable prognosis in neonates and in immunocompromised individuals. Drugs currently used to control cutaneous or genital infections are effective, but, the emergence of drug resistant strains, particularly, in immunosuppressed patients or after prolonged drug use is of great concern. Therefore, a succedaneum has to be sought and the search for new antiherpetic compounds should be encouraged. Natural products, including plant polysaccharides, and their derivatives have been shown to interact as biological modulators and can be the source for the development of new antiviral drugs. *Azadirachta indica* (neem) is traditionally used by Indian population for the healing of various diseases and considering this ethnopharmacological background, the present study aims at evaluating the antiviral activity of this plant against HSV-1. Two polysaccharides (P1 and P2) from the leaves of *A. indica* and their chemically sulfated derivatives (P1S and P2S) were tested against HSV-1, by plaque reduction assay, immunofluorescence (IF) and polymerase chain reaction (PCR). The polysaccharides did not show any cytotoxic effect, by MTT, in HEp-2 cells, up to 1000 µg/ml, however, P1S and P2S exhibited antiviral activity when used simultaneously to HSV-1 infection with 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>)/selectivity index (SI), respectively, of 31.1 µgml<sup>-1</sup>/ >51.4 and 80.5 µgml<sup>-1</sup>/ >19.8. The compounds presented

low prophylactic effect. P1S showed better inhibitory effect (%VI) of 91.8%, at 200 µg/ml, compared to P1 (50%), P2 (71.1%) and P2S (70%). The acid nucleic synthesis also was inhibited by P1 and P1S up to 25 µg/ml and by P2 and P2S up to 50 µg/ml. Synthesis of viral protein showed a dose-dependent response. Our results demonstrated the potential activity of *A. indica* polysaccharides and we suggested that they act by different mechanisms. In conclusion, the effect is probably due to the interference of the substances at the early stages of HSV-1 replication, such as, adsorption, moreover, virucidal effect was also shown. Further studies are under way to get insight into the mechanism of action of the substances and to encourage preliminary preclinical trials.

**Keywords:** Antiviral activity, herpes simplex virus-1, *Azadirachta indica*, polysaccharides.

**Abbreviations:** CC<sub>50</sub>, 50% cytotoxic concentration; IC<sub>50</sub>, 50% inhibitory concentration; SI, selectivity index.

## 1. Introduction

The incidence of diseases caused by herpes simplex virus-1 (HSV-1) has increased in recent years (Azwa and Barton, 2009). Herpesvirus is a prevalent human pathogens, normally associated with benign orofacial and genital infections. However, encephalitis, meningitis and meningoencephalitis are shown in neonates and adults (Steiner et al., 2007; Whitley and Roizman, 2001). The herpesvirus replicate by three rounds of transcription resulting in  $\alpha$  (immediate early) proteins that mainly regulate viral replication, such as, ICP4;  $\beta$  (early) proteins that synthesize and package DNA; and  $\gamma$  (late) proteins, most of which are virion proteins, like gB and gD. Inhibition of any of the former stages blocks HSV replication and, therefore, potential targets for antiviral therapy (Roizman et al., 2007). The standard therapy for HSV infections includes acyclovir (ACV) and penciclovir (PCV) with their respective prodrugs valaciclovir and famciclovir. These compounds are phosphorylated by the viral tk and then by cellular kinases. The triphosphate forms selectively inhibit the viral DNA polymerase (DNA pol) activity. HSV develops resistance to ACV, predominantly as a result of alterations in viral tk and, less frequently, from mutations in the viral DNA pol (Field, 2001; Morfin and Thouvenot, 2003; Shin et al., 2001).

Drug-resistant HSV isolates are frequently recovered from immunocompromised patients but rarely found in immunocompetent subjects (Piret and Boivin, 2011). The management of ACV- or PCV-resistant HSV infections includes the use of the pyrophosphate analog foscarnet (FOS) and the nucleoside analog cidofovir. FOS directly inhibits the viral DNA pol and does not require phosphorylation by viral tk. Resistance to FOS arises via mutations in the viral DNA pol (Chilukuri and Rosen, 2003; Morfin and Thouvenot, 2003). Since most of the drugs used to target HSV infections are also nucleoside analogs, it is necessary to develop new antiherpetic compounds with different mechanisms of action.

It has been shown that many natural products have demonstrated potent antiviral activity. The search for these substances has been encouraged, amongst them, by their low toxicity and possible multistep mechanism, which means, lesser selective pressure for the emergence of resistant strains. Moreover, most of the compounds used for clinical purpose are targeted for a small number of viruses (De Clercq, 2004). High-molecular-weight compounds such as sulfated polysaccharides are known by antiviral activity (Ginsberg et al., 1947). In recent years, a number of sulfated carbohydrate compounds from marine algae, cyanobacteria and animal sources were described showing potent inhibitory effects against several human and animal viruses (Ghosh et al., 2009). Ono et al. (2003) demonstrated the antiviral property of *Scabrella mimosa* and *Leucaena leucocephala* galactomannans and the sulfated derivatives against yellow fever virus and dengue virus type 1. Mandal et al. (2008) evaluated the activity of the sulfated polysaccharide isolated from *Scinaia hatei* against HSV-1 and -2 and reported that this compound is active against acyclovir resistant strain. Sinha et al. (2010) reported that the sulfation of polysaccharides obtained from *Sargassum tenerrimum* increased their anti-HSV activity, and the nature of anionic group, constituent sugars and molecular mass also influence the antiviral activity. The biological properties of these sulfated polysaccharides strongly depend on the degree of sulfatation and the specific position of the sulfate ester group. The greater the degree of sulfatation the better biological activity is expected (Ghosh et al., 2009). Specific position of the sulfate group is also important (Copeland et al., 2008; Ghosh et al., 2009). The sulfatation of native polysaccharide may improve their biological activities and produce drug candidate with higher potency and less cytotoxicity (Sinha et al., 2010).

*Azadirachta indica* A. Juss, popularly known as neem, has been extensively used in Ayurvedic medicine by Indian population for over 2000 years for the healing of various diseases (Subapriya and Nagini, 2005). The traditional use as antiviral is described for the treatment of animals suffering from bovine and avian poxvirus infections by applying a paste of leaves directly on the infected skin (Biswas et al., 2002). Badam et al. (1999) demonstrated that methanol extract of leaves inhibited plaque formation of several serotypes of coxsackievirus B. According to Sairam et al. (2000), neem oil can suppress the replication of poliovirus. Parida et al. (2002) showed the inhibitory effect of leaves aqueous extract on dengue virus 2. Vaibhav et al. (2010) suggested a direct anti-HSV-1 property of bark aqueous extract, besides, the inhibition of virion glycoprotein mediated cell–cell fusion and polykaryocytes formation in cell culture. The hydroacetone leaves extract blocked HIV-1 envelope-mediated membrane fusion and inhibited HIV-1 replication in C8166 CD4+ cells in vitro by inhibiting the activity of HIV-1 reverse transcriptase and decrease of p24 antigen concentration (Awah et al., 2011). Saha et al. (2010) found a great antiviral activity of isolated polysaccharides from neem leaves against BoHV-1 replication in HEp-2 cells, and Faccin-Galhardi et al. (2012) demonstrated the inhibition of poliovirus replication by these compounds, in similar conditions. In this work we evaluated the antiviral activity of two native neem leaves polysaccharides, P1 and P2, and their respective chemically sulfated derivatives, P1S and P2S, in the replication of HSV-1 in HEp-2 cell cultures.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Cells and virus

HEp-2 cells (epithelial cells of human larynx carcinoma, ATCC CCL-23) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco BRL, Gaithersburg, USA\*), supplemented with 10% fetal bovine serum (\*) and treated with 100 µg/ml streptomycin (\*), 100 IU/ml of penicillin (Novafarma, Anápolis, BR) and 2.5 µg/ml of fungizone (Meizler Biopharma, São Paulo, BR) and used throughout. The standard HSV-1 strain used was isolated from oral lesion (Department of Virology/IMPPG/UFRJ, RJ, Brazil). The virus stock was propagated in HEp-2 cell and stored at –20°C with 10% glycerol. The virus titer was determined by plaque assay.

## 2.2. Compounds

*A. indica* A. Juss was collected from Garden of Medicinal plants, Golapbag Campus, The University of Burdwan, Burdwan, India in February 2009. The characterization of the species was performed by Prof. P. K. Bhattacharya, Department of Botany, Burdwan University. The native polysaccharides (P1 and P2) obtained from leaves of *A. indica* and the sulfated forms (P1S and P2S) were previously described by Saha et al., 2010. Briefly, neem leaves were submitted to extraction thrice with distilled water, at 25–30 °C for 6 h, under constant stirring. The combined extracted was dialyzed against water and lyophilized. The recovered material was dissolved in water and diluted with 4 vol. ethanol. The precipitate was removed by centrifugation to yield P1 fraction, whereas the soluble fraction has been designated as P2. In separate experiments these fractions (P1 and P2) were sulfated using SO<sub>3</sub>-pyridine complex under conditions, as described previously (Saha et al., 2010) to yield derivatives P1S and P2S. These sulfated polysaccharides were purified by size elution chromatography on a Superdex™ 30 prep grade column. Fractions eluted at Kav values 0.3–0.6 were pooled and lyophilized. The compounds were dissolved in DMEM, treated with antimicrobials, and stored in aliquot at -20°C.

## 2.3. Cytotoxicity assay

The cytotoxicity of the compounds in cell cultures, grown in 96-well microplates (1x10<sup>3</sup> cells/well) (TPP, Trasadingen, CH\*\*), was determined by MTT (dimethylthiazolyldiphenyltetrazolium bromide) kit assay (Sigma Chem. Co., St. Louis, USA\*\*\*), according to the manufacturer's instructions. The concentrations from 100 µg/ml to 1600 µg/ml were tested, and cell viability percentage calculated by the formula,  $[100 - (At/Ac) \times 100]$ , where *At* and *Ac* refer to the absorbance of test substance and control (untreated cells), respectively. The concentration of the test substance capable of reducing cell viability by 50% in comparison to cell control (CC<sub>50</sub>), was calculated by regression analysis.

## 2.4. Plaque reduction assay

The potential antiherpetic activity was evaluated by plaque reduction assay (PRA), as previously described (Melo et al., 2008). Briefly, cells monolayer, grown in 24-well plates (2.5x10<sup>6</sup> cells/well) (\*\*) were infected with HSV-1 (10<sup>5</sup> PFU/ml) and incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for 1 h. The infected cells were then washed once with DMEM

and overlaid with nutrient agarose (1.8% agarose in 2x DMEM), 25 mM of MgCl<sub>2</sub> and varying concentrations (25, 50, 100 and 200 µg/ml) of P1, P2, P1S and P2S. Cells infected and not treated (virus control) and cells not infected and not treated (cell control) were used as control. After 40 h of incubation at 37°C, cells monolayer was fixed with formaldehyde in PBS (0.1M), pH 7.3 and stained with 0.5% crystal violet. Plaques were counted and the percentage of viral inhibition (%VI) was calculated as  $[1 - (PFU_t/PFU_c)] \times 100$ , where PFU<sub>t</sub> and PFU<sub>c</sub> refer to the number of plaques in the presence and absence of the compounds, respectively (Nishimura et al., 1977). The minimal concentration of the compounds required to reduce 50% of plaque numbers (IC<sub>50</sub>) was calculated by regression analysis of the curve generated. The selectivity index (SI) was expressed by the ratio CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>.

#### *2.5. Evaluation of anti-HSV action:*

*Time-of-addition assay:* DMEM containing serial concentrations (25, 50, 100 and 200 µg/ml) of P1, P2, P1S and P2S were added into cell monolayer at 0 hour infection (simultaneous treatment), and 1h, and 2 h after the infection (post-treatment), followed by PRA (Yamamoto et al., 2013).

*Pretreatment assay* – The pretreatment protocol was conducted by similar method to the time-of-addition assay, except that the tested polysaccharides were incubated with the cell monolayer prior to infection (Faccin et al., 2007). DMEM from cell monolayer was replaced by DMEM containing serial concentrations (25, 50, 100 and 200 µg/ml) of P1, P2, P1S and P2S, and incubated by 1h (-1h) and 2h (-2h) at 37°C. Cells were washed twice, inoculated with HSV-1 (10<sup>5</sup> PFU/ml) and incubated for 1h at 37°C for adsorption, followed by PRA.

*Virucidal assay* – The direct effect of P1, P2, P1S and P2S on HSV-1 was determined by the incubation, for 1 h at 37°C, of virus suspension (10<sup>5</sup> PFU/ml) and DMEM containing the same concentrations of the test substances, as before, followed by cell inoculation (1 h at 37°C) and viral titer determination by PRA (Faccin-Galhardi et al., 2012).

*Adsorption inhibition assay* – The compounds were examined according to Rincão et al. (2012). Briefly, cell monolayers were previously maintained at 4°C for 1 h and infected with HSV-1 (10<sup>5</sup> PFU/ml) with and without the test polysaccharides, at the same concentrations used before. After 80 min of adsorption at 4°C, the cells were

washed thrice with cold PBS (0.1M) pH 7.3, to remove the non-adsorbed virus, followed by PRA.

*Inhibition of penetration assay* – Performed according to Cheng et al. (2004) with some modifications. Cells were pre-chilled at 4°C for 1h, then the virus ( $10^5$  PFU/ml) was added and incubated at 4°C for 2h to allow attachment. DMEM containing varying concentrations of the substances, as before, was added and the cultures incubated at 37 °C for 10 min to maximize penetration of virus. Infected cell monolayer was treated with acidic PBS (pH 3) for 1 min to inactivate particles that did not enter and immediately, PBS (pH 11) was added to balance medium pH, removed and PRA performed.

*Cell-to-cell spread assay:* Assay carried out as described by Ekblad et al. (2010). The concentrations (25 - 200 µg/ml) of P1, P2, P1S and P2S were added to cells 2h after the infection (50 – 100 PFU/well). The cells were incubated accordingly for PRA. Results were obtained by analyses of 20 plaques images digitalized and the areas determined by Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

*Positive controls:* Sodium dodecyl sulfate (SDS) (25 and 50 µg/ml) (LabSynth, Diadema, BR) (Su et al., 2008), sodium heparin (25 - 200 µg/ml) (Eurofarma, São Paulo, BR) (WuDunn et al., 1989), ACV (2500 µg/ml) (Zynvir, Novafarma, Anápolis, BR) and foscarnet (PFA) (300 µg/ml ) (Hospira, USA - donated by Trade Farma, BR) were used as positive controls for viral inhibition.

## 2.6. Immunofluorescence assay

The immunofluorescence assay (IFA) was performed according to Faccin et al. (2007), and, briefly, was performed in cells grown in 24-well plates with cover slips ( $1 \times 10^6$  cells/well), and inoculated with 500 µl of HSV-1 (MOI = 1). This was followed by treatment with test substances at 25 – 200 µg/ml, at the time 0 h of infection. Twenty-four hours post-infection, the cells were washed with 0.05% Tween 20/PBS (0.1M, pH 7.3), fixed with cold acetone (-20°C) and blocked with 2% powdered skim milk PBS. The cells were incubated with mouse monoclonal antibody anti-HSV-1 ICP4 (SC-69809, Santa Cruz Biotechnology, USA), diluted to 1:100, further washed with Tween/PBS and incubated with goat anti-mouse IgG FITC conjugate (\*\*\*) diluted to 1:400. The cells were examined in a Zeiss fluorescence microscope (Zeiss Axio Imager A1 with Axio Cam MRc5) and 100 cells/cover slips were scored and the

percentage of fluorescent cells inhibition calculated in comparison to control (infected and nontreated cells). The experiments were carried out in triplicate.

### 2.7. Polymerase chain reaction (PCR)

Cells cultivated in 24-well plates ( $2 \times 10^6$  cells/well) were infected with HSV-1 (MOI 1), treated simultaneously with P1, P2, P1S and P2S (25 – 200  $\mu\text{g/ml}$ ) and incubated at  $37^\circ\text{C}$  with 5%  $\text{CO}_2$  for 24h. Cells infected and not treated; cells not infected and not treated; and cells infected and treated with 3 mg/ml of Acyclovir were used as control. Total DNA was then extracted using commercial kits (QIAamp® DNA Mini and Blood Mini). The PCR primer pairs for viral gene  $\alpha 4/ICP4$  were ICP4F (5' GGC GGG AAG TTG TGG ACT GG 3') – sequence location (bp): 127308 -127289 and ICP4R (5' CAG GTT GTT GCC GTT TATT GCG 3') – sequence location (bp): 127171 – 127192, with 138 bp of size expected of PCR product (Devi-Rao et al., 1994; Tal-Singer et al., 1997). The PCR reactions were carried out in a final volume of 25  $\mu\text{l}$  containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM of each dNTP (Invitrogen, BR), 20 pmol of each specific primer (Integrated DNA Technologies Products – IDT), 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, BR), and 5  $\mu\text{l}$  of extracted DNA. The PCR program consisted of denaturation at  $94^\circ\text{C}$  for 4 min and 40 cycles of denaturation at  $94^\circ\text{C}$  for 1 min, annealing at  $60^\circ\text{C}$  for 1 min, and polymerization at  $72^\circ\text{C}$  for 1 min, followed by a final extension at  $72^\circ\text{C}$  for 7 min. Ten microliter of the PCR products were resolved in a 12% polyacrylamide gel electrophoresis.

### 2.8. Statistical analysis

Anova followed by Tukey's test (BioEstat 5.0 for Windows XP, 2007) were applied to determine the difference among polysaccharides experiments and control groups. Values of  $p < 0.05$  were considered significant.

## 3. Results

### 3.1. Cytotoxicity and anti-HSV activity of polysaccharides from *A.indica*

The effects of polysaccharides P1, P2, P1S and P2S from *A. indica* on HSV-1 replication and cell viability were first examined. P1, P1S and P2S inhibited the HSV-1 infection, in cell, with  $\text{IC}_{50}$  of 105.2  $\mu\text{g/ml}$ , 31.1  $\mu\text{g/ml}$  and 80.5  $\mu\text{g/ml}$ , respectively,

as shown in Table 1. P2 inhibited only about 20% of HSV-1 replication. The  $CC_{50}$  values for the polysaccharides and their sulfated derivatives, determined by MTT assay, were greater than 1600  $\mu\text{g/ml}$  for P1S, P2, P2S, and 1440  $\mu\text{g/ml}$  for P1. The selective index (SI) for P1, P1S and P2S was of 13.6, >51.4 and >19.8, respectively. The ACV and PFA, used as controls, inhibited the HSV-1 replication with  $IC_{50}/SI$  of  $2100 \mu\text{gml}^{-1}/>4.76$  and  $570 \mu\text{gml}^{-1}/6.05$ , respectively.

The test compounds time-of-addition results are shown in fig. 1. It was demonstrated that the sulfated forms (P1S and P2S) presented higher percentage of viral inhibition (%VI) in comparison to the native polysaccharides forms (P1 and P2). The maximum antiviral effect was obtained when the polysaccharides were used concomitantly to the infection (time 0h), with decreased effect next. Since the simultaneous treatment was more efficient than the post-treatment (1 and 2h), the following experiments were carried out. Pretreatment of cells and virus with compounds, showed that, when cells were treated with P1, P2, P1S and P2S the %VI, at the time -1h, was about 20% for P1, P2 and P1S, and, 41.5% for P2S, at higher concentration (200  $\mu\text{g/ml}$ ) (Fig. 2A). P1 presented constant inhibition (about 20%) at all tested concentrations (25 - 200  $\mu\text{g/ml}$ ) and P2S showed a dose-dependent curve. At time -2h, only P1 and P1S showed some %VI, 15.6% and 29.1%, respectively (data no shown). Similar results were found when SDS was used. In addition, pre-incubation of HSV-1 with the polysaccharides (virucidal assay) showed a low inhibition of HSV-1 replication, 24%, 36.4%, 28.7% and 18.5% for P1, P2, P1S and P2S, respectively, at 200  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 2B). The inhibition was smaller than when SDS was used with its known virucidal effect. Next, the effects of these compounds in the viral attachment and penetration are shown in Fig. 2C. The adsorption of HSV-1 in HEp-2 cell was better demonstrated by P1 and P2S, similarly in the pretreatment assay, with viral inhibition of 49.4%, 19.4%, 28.2%, 41%, respectively for P1, P1S, P2 and P2S, at 200  $\mu\text{g/ml}$ . Only P1 had a similar inhibition to sodium heparin (53.2%), used as control to prevent the HSV adsorption. The Polysaccharides did not reduce significantly ( $p>0.05$ ) HSV-1 plaque size (data not shown). Reduction in the synthesis of HSV-1 protein was demonstrated in a dose-dependent response curve of fluorescent cells, when Polysaccharides were used at the time 0 h of the infection (Table 2). P1S showed better inhibitory effect on protein synthesis compared to the native form (P1) in agreement to the time-of-addition assay (time 0h). However, for P2S it was similar to that of P2. PCR reaction was conducted to amplify HSV-1  $\alpha 4/ICP4$  gene (immediate-

early) in the presence of the compounds. As shown in Fig. 3, the viral genomic DNA was inhibited in a dose-dependent response curve, as follows, P1 and P1S inhibited up to 25 µg/ml (Fig. 3A and 3B), and, P2 and P2S up to 50 µg/ml (Fig. 3C and 3D).

#### 4. Discussion

*A. indica* polysaccharides were tested as anti-HSV drugs. The lowest IC<sub>50</sub> were obtained for P1S followed by P2S with better antiviral effect compared to native forms, indicating that sulfatation was useful for better antiviral activity. P1, P1S and P2S were more effective when treatment were done simultaneously to infection, than that of post-infection (Fig. 1), suggesting the action of these compounds at early stages of HSV-1 infection. Similar result was found by the same polysaccharides from the same *A. indica*, when tested against bovine herpesvirus (BoHV-1) and poliovirus (PV-1) (Faccin-Galhardi et al., 2012; Saha et al., 2010). Other sulfated polysaccharides presented a strong inhibition of HSV replication, in simultaneous treatment, such as carrageenans (Carlucci et al., 1999), fucoidans (Karmakar et al., 2010) and sulfated β-glucans (Yamamoto et al., 2013; Zhang et al., 2004). Faccin-Galhardi et al. (2012) showed that the greater molecular weight of P1/P1S than that of P2/P2S could be one of the reasons for better antiviral effect of the former, nevertheless, in general, the sulfated derivatives have been shown more active. Harden et al. (2009) showed that unhydrolyzed polysaccharide (670 kDa) was more active against HSV-1 and HSV-2 when compared with the hydrolyzed form (44 kDa). These results are in agreement that antiherpetic property of the polysaccharides depends upon the sulfatation, however, a combination of structural features, such as, molecular weight, the branching degree, charge density and molecular composition of uncharged portions, has to be considered (Damonte et al., 2004; Duarte et al., 2001; Ghosh et al., 2009; Witvrouw and De Clercq, 1997). Some compounds exert their antiviral activities before viral attachment by interfering directly with the virus or membrane components of target cells (Cheng et al., 2004; Kawamoto et al., 2003). *A. indica* P1 and P1S showed activity in both ways with similar inhibition pattern (Fig. 2A and 2B), moreover, P1S showed a little increase in inhibition for virucidal protocol. It is known that negatively charged sulfated polysaccharides present improvement in their antiviral activity by the interaction with the virus positive charges, thereby, preventing the penetration into the host cells

(Ehresmann et al., 1979; Hatch et al., 1977). However, our results showed that sulfation of native P2 did not increase its virucidal effect, as similarly demonstrated, elsewhere (Adhikari et al., 2006; Chattopadhyay et al., 2007, 2008; Karmakar et al., 2010; Matsuhira et al., 2005; Zhu et al., 2006). In contrast, Carlucci et al. (1999), Mazumder et al. (2002) and Zhu et al. (2004) showed virucidal action, albeit, at concentrations much higher than the  $IC_{50}$ . In the latter cases, the virucidal effect could be due to solubilization of the virus envelope or chemical modification, degradation, or masking of some of the essential envelope proteins (Zhu et al., 2004), without influence of the sulfation. The compounds demonstrated lower virucidal activity compared to SDS, which disrupt viral protein and envelope structures (Howett et al., 1999). On the other hand, P2S showed a better prophylactic effect (41.5%) compared to other tested polysaccharides, when added 1h before infection. These results suggested that the sulfated forms of polysaccharides are important for the improvement of P1S virucidal activity, otherwise, prophylactic effect for P2S. Prophylactic effect of polysaccharides and other natural or synthetic polyanions has been shown and attributed to the induction of interferon, leading to an antiviral state in cells, *in vitro* and *in vivo* (De Clercq and Luczak, 1976; Merigan and Finkelstein, 1968; Moelling et al., 1989;). Therefore, in our results *A.indica* polysaccharides could also be inducing low activity through interferon. The immunomodulatory properties by gamma interferon have been demonstrated *in vivo* by Upadhyay et al. (1992) with the use of neem oil seed extract. Our results also showed that neem polysaccharides inhibited adsorption weakly, but not viral penetration, suggesting that the polysaccharides have to be present before or during the virus adsorption, and after the penetration stage, to exhibit activity. Harden et al. (2009) showed the effect of several sulfated polysaccharides (sulfated galactofucan, sulfated fucan, depolymerized galactofucan sulfate, kappa-2 type carrageenan and complex sulfated galactan) from algal extracts in infection. All tested sulfated compounds inhibited virus adsorption, however none of them inhibited HSV-1 penetration. The inhibition of virus adsorption could be due to the interference of the compounds on the virus surface itself or in virus receptor on cell membrane. In addition, studies have demonstrated that sulfated polysaccharides and other polysulfonated compounds may mimic receptors of cell surface, like heparan sulfate (HS) preventing adsorption of virus to cells (McCarthy et al., 2005; Vaheiri, 1964; Witvrouw and De Clercq, 1997; WuDunn and Spear, 1989). Heparin, a sulfated

polysaccharide structurally related to HS is known to inhibit attachment of HSV and other virus to cells, and has no virucidal effect (Vaheiri, 1964). None of the polysaccharides interfered with cell-to-cell virus spreading. Our findings of the inhibition of viral protein synthesis demonstrated that sulfatation did not improve the inhibitory effect. The inhibition of HSV-1 protein by sulfated polysaccharides is poorly understood, however, is has been attributed to the virus replication shutdown or by regulation of the intracellular or trans-membrane signaling pathway (Biesert et al., 1990; Cardoso et al., 2011; Gonzalez et al., 1987). Moreover, we also found inhibition of HSV-1 DNA that could also be by indirect effect of *A.indica* polysaccharides. However, no difference was found between the effect of PS native and their sulfated forms.

## 5. Conclusion

The *A.indica* leaves polysaccharides in their native and sulfated derivate demonstrated that the compounds were effective to inhibit the replication of HSV-1. Our results suggested that *A. indica* polysaccharides act by at least three different mechanisms and these features is an advantage, comparatively, to single-step drugs, being much less prone to select drug resistant mutants. Nevertheless, further studies should be encouraged to get insight into the mechanism(s) of action and to better understanding of the neem compounds antiviral potentiality.

**Table 1.**

Antiviral activity of *Azadirachta indica* polysaccharides (P1 and P2) and their respective sulfated derivatives (P1S and P2S) against herpes simplex virus-1 (HSV-1) by the plaque reduction assay, in HEp-2 cells. Cell cultures were treated with the compounds (25 – 200 µg/ml) simultaneously with the infection (time 0 h). Acyclovir (ACV) and foscarnet (PFA) were used as positive control.

	<b>P1</b>	<b>P1S</b>	<b>P2</b>	<b>P2S</b>	<b>ACV</b>	<b>PFA</b>
<b>CC<sub>50</sub><sup>a</sup></b>	1440	>1600	>1600	>1600	>10000	3450
<b>IC<sub>50</sub><sup>b</sup></b>	105.2	31.12	-----	80.5	2100	570
<b>SI<sup>c</sup></b>	13.6	>51.4	-----	>19.8	>4.76	6.05

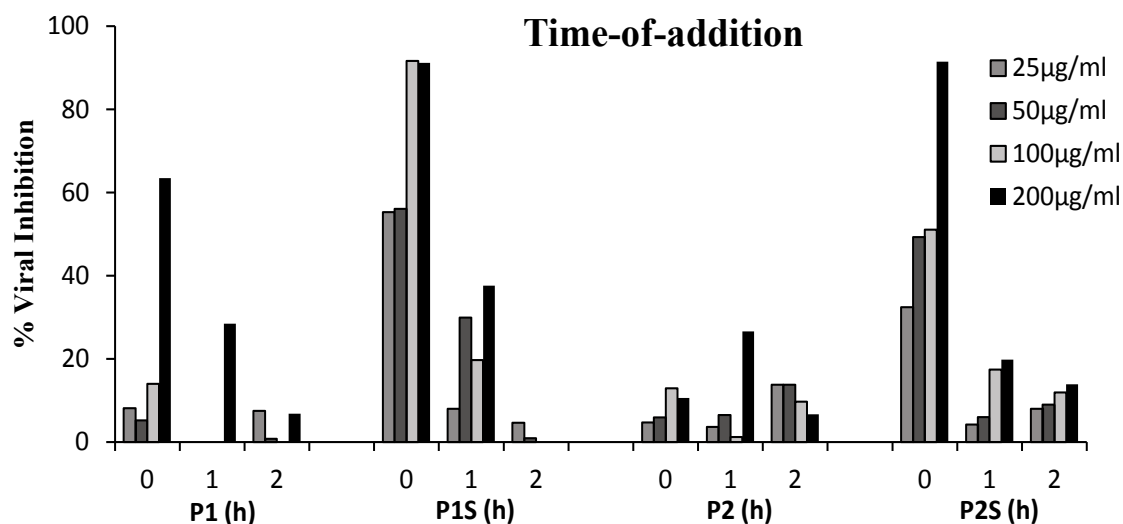
<sup>a</sup> – Fifty percent cytotoxic concentration (CC<sub>50</sub>) in HEp-2 cells (µg/ml).

<sup>b</sup> - Fifty percent inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) (µg/ml).

<sup>c</sup> - Selectivity Index = CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>.

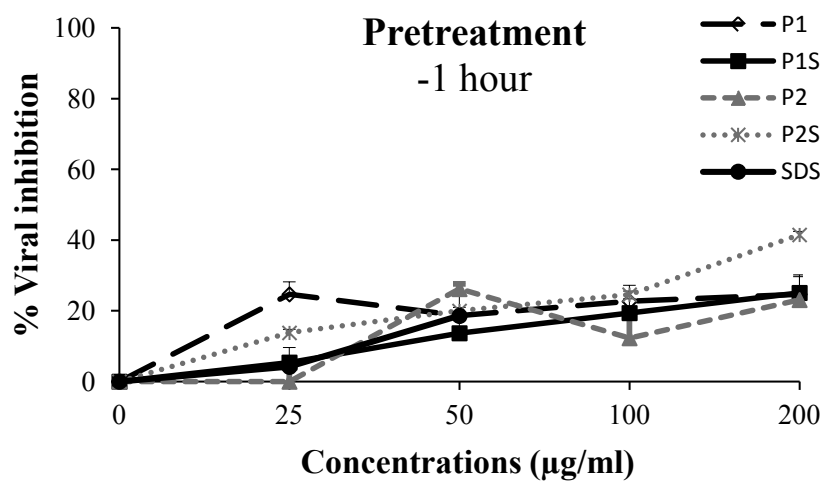
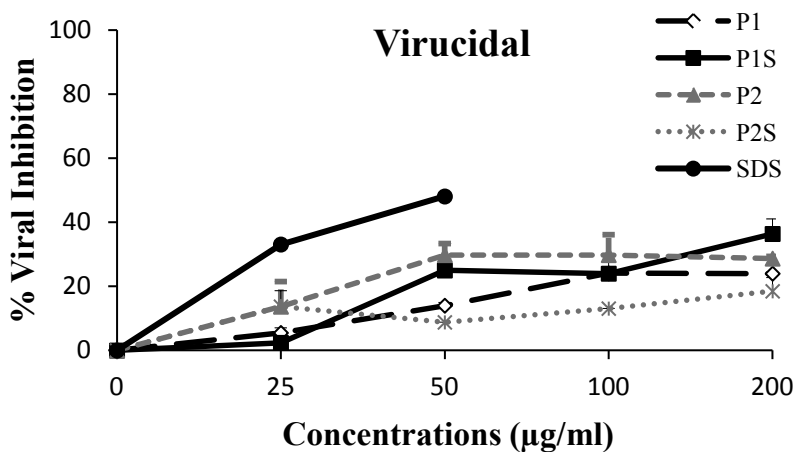
**Fig.1**

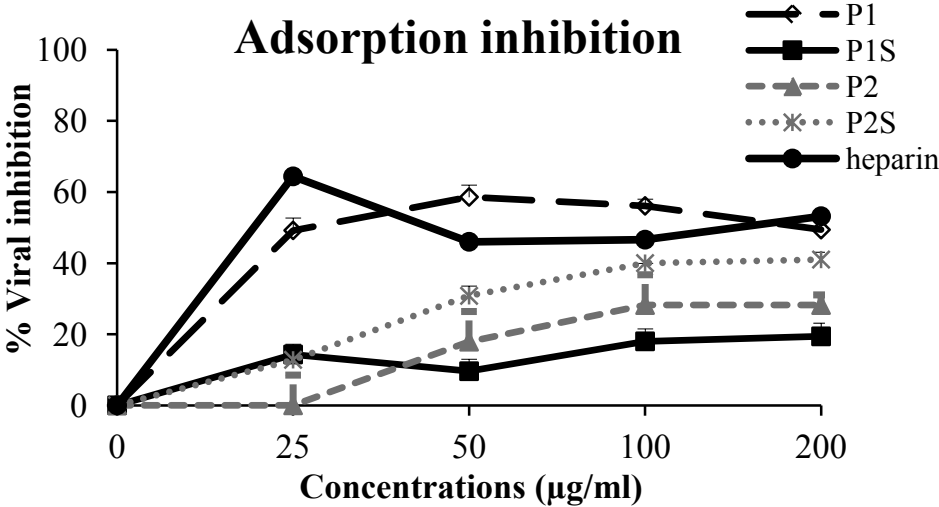
The effect of *Azadirachta indica* polysaccharides P1, P1S, P2, and P2S in the replication of herpes simplex virus-1 (HSV-1), in HEp-2 cells. The compounds were added at varying concentrations (25 –200 µg/ml) simultaneously (0 h) and 1 and 2h after viral infection (post-treatment). The percentage of viral inhibition (%VI) was determined in comparison to the controls by plaque reduction assay.



**Fig.2**

Effect of polysaccharides (P1, P1S, P2 and P2S) from *Azadirachta indica* in pretreatment (A), virucidal (B) and adsorption inhibition (C) protocols in HSV-1 infection. The percentage of viral inhibition (%VI) was determined in comparison to controls by plaque reduction assay. Sodium dodecyl sulfate (SDS) and sodium heparin were used as positive controls.

**(A)****(B)****(C)**



**Table 2.**

The effect of the *Azadirachta indica* native and their sulfated derivatives polysaccharides in the synthesis of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) protein, monitored by immunofluorescence assay, represented by the percentage of fluorescent cell inhibition. The compounds were added at the time zero of the infection, at the indicated concentrations.

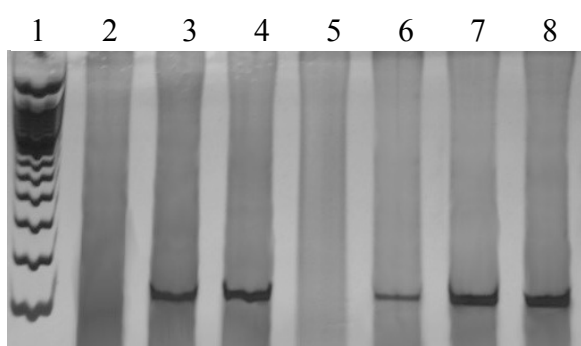
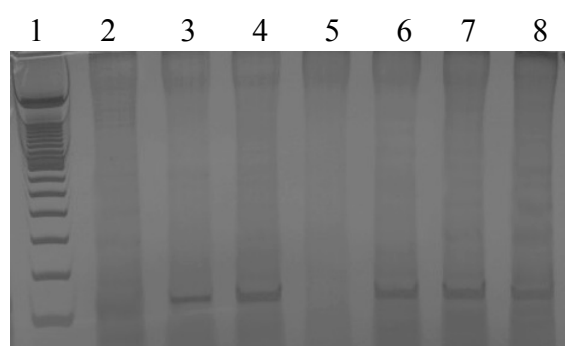
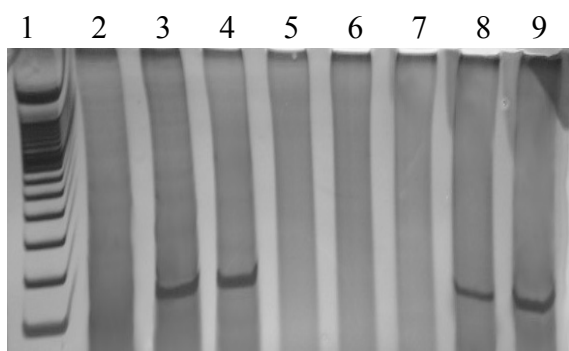
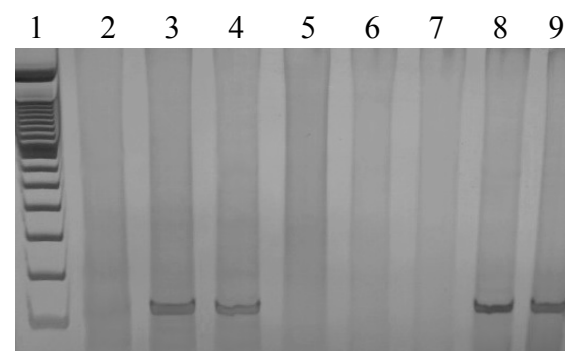
	HSV-1			
	P1	P1S	P2	P2S
25 <sup>a</sup>	30.8 <sup>b</sup>	46.5	35.8	24.5
50	34.6	66.2	49.4	33.4
100	38.4	90.6	55.1	61.4
200	50	91.8	71.1	70

<sup>a</sup> µg/ml.

<sup>b</sup> Percent of fluorescent cells reduction in comparison to infected non-treated cells.

**Fig.3**

The inhibition of *Azadirachta indica* polysaccharides P1 (**A**), P1S (**B**), P2 (**C**) and P2S (**D**) in the synthesis of herpes simplex virus-1 (HSV-1) nucleic acid. Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR amplicons for gene ICP4: Lanes 1-Molecular-weight marker; 2-cell control (CC); 3-Virus control (VC); 4-HSV-1 treated with Acyclovir (ACV) (3 mg/ml); lanes 5, 6, 7, 8 and 9 – HSV-1 treated with 25, 10, 5, and 1 µg/ml for P1 and P1S, and 200, 100, 50, 25 and 10 µg/ml for P2 and P2S.

**(A) P1****(B) P1S****(C) P2****(D) P2S**

**REFERÊNCIAS:**

Adhikari, U., Mateu, C.G., Chattopadhyay, K., Pujol, C.A., Damonte, E.B., Ray, B., 2006. Structure and antiviral activity of sulfated fucans from *Stoechospermum marginatum*. *Phytochemistry*. 67, 2474–2482.

Awah, F.M., Uzoegwu, P.N., Ifeonu, P., 2011. *In vitro* anti-HIV and immunomodulatory potentials of *Azadirachta indica* (Meliaceae) leaf extract. *Af. J. Pharm. Pharmacol.* 5, 1353-1359.

Azwa, A., Barton, S., 2009. Aspects of herpes simplex virus: a clinical review. *J. Fam. Plann. Reprod. Health Care* 35, 237–242.

Badam, L., Joshi, S.P., Bedekar, S.S., 1999. 'Invitro' antiviral activity of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaf extract against group B coxsackie viruses. *J. Commun. dis.* 31, 79–90.

Biesert, L., Adamski, M., Zimmer, G., Suhartono, H., Fuchs, J., Unkelbach, U., Mehlhorn, R., Hideg, K., Milbradt, R., Rubsamen-Waigmann, H., 1990. Anti- human immunodeficiency virus (HIV) drug HOE/BAY 946 increases membrane hydrophobicity of human lymphocytes and specifically suppresses HIV-protein synthesis. *Med. Microbiol. Immunol.* 179, 307–321.

Biswas, K., Chattopadhyay, I., Banerjee, R.K., Bandyopadhyay, U., 2002. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Curr. Sci.* 82, 1336–1345.

Cardozo, F.T.G.S., Camelini, C.M., Mascarello, A., Rossi, M.J., Nunes, R.J., Barardi, C.R.M., Mendonça, M.M., Simões, C.M.O., 2011. Antitherpetic activity of a sulfated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* mycelia. *Antiviral Res.* 92, 108-114.

- Carlucci, M.J., Ciancia, M., Matulewicz, M.C., Cerezo, A.S., Damonte, E.B., 1999. Antiherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types. *Antiviral Res.* 43, 93–102.
- Chattopadhyay, K., Mateu, C.G., Mandal, P., Pujol, C.A., Damonte, E.B., Ray, B., 2007. Galactan sulfate of *Grateloupia indica*: isolation, structural features and antiviral activity. *Phytochem.* 68, 1428–1435.
- Chattopadhyay, K., Ghosh, T., Pujol, C.A., Carlucci, M.J., Damonte, E.B., Ray, B., 2008. Polysaccharides from *Gracilaria corticata*: Sulfation, chemical characterization and anti-HSV activities. *Int. J. Biol. Macromol.* 43, 346–351.
- Cheng, H.Y., Lin, T.C., Yang, C.M., Wang, K.C., Lin, L.T., Lin, C.C., 2004. Putranjivain A from *Euphorbia jolkini* inhibits both virus entry and late stage replication of herpes simplex virus type 2 *in vitro*. *J. Antimicrob. Chemother.* 53, 577–583.
- Chilukuri, S., Rosen, T., 2003. Management of acyclovir-resistant herpes simplex virus. *Dermatol. Clin.* 21, 311–320.
- Copeland, R., Balasubramaniam, A., Tiwari, V., Zhang, F., Bridges, A., Linhardt, R.J., 2008. Using a 3-O-sulfated heparin octasaccharide to inhibit the entry of herpes simplex virus type 1. *Biochemistry* 47, 5774–5783.
- Damonte, E.B., Matulewicz, M.C., Cerezo, A.S., 2004. Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. *Curr. Med. Chem.* 11, 2399–2419.
- De Clercq, E., 2004. Antiviral drugs in current clinical use. *J. Clin. Virol.* 30, 115–133.
- De Clercq, E., M. Luczak., 1976. Antiviral activity of carbopol, a cross-linked polycarboxylate. *Arch. Virol.* 52, 151–158.

Devi-Rao, G.B., Bloom, D.C., Stevens, J.G., Wagner, E.K., 1994. Herpes Simplex Virus Type 1 DNA Replication and Gene Expression during Explant-Induced Reactivation of Latently Infected Murine Sensory Ganglia. *J. Virol.* 68, 1271-1282.

Duarte, M.E., Nosedá, D.G., Nosedá, M.D., Tulio, S., Pujol, C.A., Damonte, E.B., 2001. Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication in vitro. *Phytomedicine.* 8, 53–58.

Ehresmann, D.W., Deig, E.F., Hatch, M.T., 1979. Marine algae in pharmaceutical science. Berlin: Gruyter.

Ekblad, M., Adamiak, B., Bergstrom, T., Johnstone, K.D., Karoli, T., Liu, L., Ferro, V., Trybala, E., 2010. A highly lipophilic sulfated tetrasaccharide glycoside related to muparfostat (PI-88) exhibits virucidal activity against herpes simplex virus. *Antiviral Res.* 86, 196–203.

Faccin, L.C., Benati, F., Rincão, V.P., Mantovani, M.S., Soares, S.A., Gonzaga, M.L., Nozawa, C., Linhares, R.E.C., 2007. Antiviral activity of aqueous and ethanol extracts and of an isolated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* against poliovirus type 1. *Letts. App. Microbiol.* 45, 24-28.

Faccin-Galhardi, L.C., Yamamoto, K.I., Ray, S., Ray, B., Linhares, R.E.C., Nozawa, C., 2012. The *in vitro* antiviral property of *Azadirachta indica* polysaccharides for poliovirus. *J. Ethnopharmacol.* 142, 86-90.

Field, H., 2001. Herpes simplex virus antiviral drug resistance-current trends and future prospects. *J. Clin. Virol.* 21, 261–269.

Ghosh, T., Chattopadhyay, K., Marschall, M., Karmakar, P., Mandal, P., Ray, B., 2009. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: from structure–activity analysis to clinical evaluation. *Glycobiology.* 19, 2–15.

Ginsberg, R.H., Goebel, W.F., Horsfall, F.L., 1947. Inhibition of mumps virus multiplication by a polysaccharide. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 66, 99–100.

Gonzalez, M., Alarcon, B., Carrasco, L., 1987. Polysaccharides as antiviral agents: antiviral activity of carrageenan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31, 1388–1393.

Harden, E.A., Falshaw, R., Carnachan, S.M., Kern, E.R., Prichard, M.N., 2009. Virucidal activity of polysaccharide extracts from four algal species against herpes simplex virus. *Antiviral Res.* 83, 282–289.

Hatch, M., Ehresmann, D., Deig, E., Wedros, N., 1977. Further studies on the chemical composition and an initial *in vivo* evaluation of antiviral material in extracts of macroscopic algae. *J. Phycol.* 13, 28–35.

Howett, M. K., Neely, E.B., Christensen, N.D., Wigdah, B., Krebs, F.C., Malamud, D., Patrick, S.D., Pickel, M.D., Welsh, P.A., Reed, C.A., Ward, M.G., Budgeon, L.R., Kreider, J.W., 1999. A Broad-Spectrum Microbicide with Virucidal Activity against Sexually Transmitted Viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 314–321.

Karmakar, P., Pujol, C.A., Damonte, E.B., Ghosh, T., Ray, B., 2010. Polysaccharides from *Padina tetrastromatica*: Structural features, chemical modification and antiviral activity. *Carbohydr. Polym.* 80, 513–520.

Kawamoto, S., Oritani, K., Asada, H., Takahashi, I., Ishikawa, J., Yoshida, H., Yamada, M., Ishida, N., Ujiie, H., Masaie, H., Tomiyama, Y., Matsuzawa, Y., 2003. Antiviral activity of limitin against encephalomyocarditis virus, herpes simplex virus, and mouse hepatitis virus: diverse requirements by limitin and alpha interferon for interferon regulatory factor 1. *J. Virol.* 77, 9622–9631.

Mandal, P., Pujol, C.A., Carlucci, M.J., Chattopadhyay, K., Damonte, E.B., Ray, B., 2008. Anti-herpetic activity of a sulfated xylomannan from *Scinaia hatei*. *Phytochemistry.* 69, 2193–2199.

- Matsuhiro, B., Conte, A.F., Damonte, E.B., Kolender, A.A., Matulewicz, M.C., Mejias, E.G., Pujol, C.A., Zúñiga, E.A., 2005. Structural analysis and antiviral activity of a sulfated galactan from the red seaweed *Schizymenia binderi* (Gigartinales, Rhodophyta). *Carbohydr. Res.* 340, 2392–2402
- Mazumder, S., Ghosal, P.K., Pujol, C.A., Carlucci, M.J., Damonte, E.B., Ray, B., 2002. Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Int. J. Biol. Macromol.* 31, 87–95.
- McCarthy, T.D., Karellas, P., Henderson, S.A., Giannis, M., O’Keefe, D.F., Heery, G., Paull, J.R., Matthews, B.R., Holan, G., 2005. Dendrimers as drugs: discovery and preclinical and clinical development of dendrimer-based microbicides for HIV and STI prevention. *Mol. Pharm.* 2, 312–318.
- Melo, F.L., Benati, F.J., Roman-Junior, W.A., Mello, J.C.P., Nozawa, C., Linhares, R.E.C., 2008. The *in vitro* antiviral activity of an aliphatic nitro compound from *Heteropteris aphrodisiaca*. *Microbiol. Res.* 163, 136-139.
- Merigan, T.C., Finkelstein, M.S., 1968. Interferon stimulating and *in vivo* antiviral effects of various synthetic anionic polymers. *Virology.* 35, 363-374.
- Moelling, K., Schulze, T., Dvinger, H., 1989. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 RNase H by sulfated polyanions. *J. Virol.* 63, 5489-5491.
- Morfin, F., Thouvenot, D., 2003. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. *J. Clin. Virol.* 26, 29–37.
- Nishimura, T., Toku, H., Fukuyasu, H., 1977. Antiviral compounds. XII Antiviral activity of amidinohydrazones of alkoxyphenyl-substituted carbonyl compounds against influenza virus in eggs and in mice. *Kitasato Arch. Exp. Med.* 50, 39–46.
- Ono, L., Wollinger, W., Rocco, I.M., Coimbra, T.L.M., Gorin, P.A.J., Sierakowski, M.R., 2003. *In vitro* and *in vivo* antiviral properties of sulfated galactomannans

against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). *Antiviral Res.* 60, 201–208.

Parida, M.M., Upadhyay, C., Pandya, G., Jana, A.M., 2002. Inhibitory potential of neem (*Azadirachta indica* Juss) leaves on Dengue virus type-2 replication. *J. Ethnopharmacol.* 79, 273–278.

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

Rincão, V.P., Yamamoto, K.A., Ricardo, N.M.P.S., Soares, S.A., Meirelles, L.D.P., Nozawa, C., Linhares, R.E.C., 2012. Polysaccharide and extracts from *Lentinula edodes*: structural features and antiviral activity. *Viol. J.* 9, 1-6.

Roizman, B., Knipe, D., Whitley, R., 2007. Herpes simplex viruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D., Lamb, R., Martin, M., Roizman, B., Straus, S.E. (Eds.), *Fields Virology*, 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 2502– 2601.

Saha, S., Galhardi, L.C.F., Yamamoto, K.A., Linhares, R.E.C., Bandyopadhyay, S.S., Sinha, S., Nozawa, C., Ray, B., 2010. Water-extracted polysaccharides from *Azadirachta indica* leaves: structural features, chemical modification and anti-bovine herpes virus type 1(BoHV-1) activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 47, 640–645.

Sairam, M., Ilavazhagan, G., Sharma, S.K., Dhanraj, S.A., Suresh, B., Parida, M.M., Jana, A.M., Devendra, K., Selvamurthy, W., 2000. Anti-microbial activity of a new vaginal contraceptive NIM-76 from neem oil (*Azadirachta indica*). *J. Ethnopharmacol.* 71, 377–382.

Shin, J., Cai, G., Weinberg, A., Leary, J., Levin, M., 2001. Frequency of acyclovir-resistant herpes simplex virus in clinical specimens and laboratory isolates. *J. Clin. Microbiol.* 39, 913–917.

- Sinha, S., Astani, A., Ghosh, T., Schnitzler, P., Ray, B., 2010. Polysaccharides from *Sargassum tenerrimum*: structural features, chemical modification and anti-viral activity. *Phytochemistry*. 71, 235–242.
- Steiner, I., Kennedy, P., Pachner, A., 2007. The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster. *Lancet Neurol*. 6, 1015–1028.
- 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., 2008. Anti-HSV activity of digitoxin and its possible mechanisms. *Antiviral Res*. 79, 62–70.
- Subapriya, R., Nagini, S., 2005. Medicinal properties of neem leaves: a review. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*. 5, 146–149.
- Tal-Singer, R., Lasner, T.M., Podrzucki, W., Skokotas, A., Leary, J.J., Berger, S.L., Fraser, N.W., 1997. Gene Expression during Reactivation of Herpes Simplex Virus Type 1 from Latency in the Peripheral Nervous System Is Different from That during Lytic Infection of Tissue Cultures. *J. Virol*. 5268–5276 .
- Upadhyay, S.N., Dhawan, S., Garg, S., Talwar, G.P., 1992. Immunomodulatory effects of neem (*Azadirachta indica*) oil. *Int. J. Immunopharmacol*. 14, 1187-1193.
- Vaheri, A., 1964. Heparin and related polyionic substances as virus inhibitors. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Suppl*. 171, 1–98.
- Vaibhav, T., Nissar, D.A., Beatrice, Y.J.T., Deepak, S., 2010. *In vitro* antiviral activity of neem (*Azadirachta indica* L.) bark extract against herpes simplex virus type- 1 infection. *Phytotherapy Res*. 24, 1132–1140.
- Whitley, R., Roizman, B., 2001. Herpes simplex virus infections. *Lancet*. 357, 1513–1518.
- Witvrouw, M., De Clercq, E., 1997. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *Gen. Pharmacol*. 29, 497–511.

WuDunn, D., Spear, P.G., 1989. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J. Virol.* 63, 52–58.

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

Zhang, M., Cheung, P.C.K., Ooi, V.E.C., Zhang, L., 2004. Evaluation of sulfated fungal  $\beta$ -glucans from the sclerotium of *Pleurotus tuberregium* as a potential water-soluble antiviral agent. *Carbohydr. Res.* 339, 2297–2301.

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

Zhu, W., Chiu, L.C., Ooi, V.E., Chan, P.K., Ang Jr., P.O., 2006. Antiviral property and mechanisms of a sulphated polysaccharide from the brown alga *Sargassum patens* against Herpes simplex virus type 1. *Phytomedicine.* 13, 695– 701.