



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DANIELE ZENDRINI RECHENCHOSKI

**GALACTOMANANA ISOLADA DE *Dimorphandra
gardneriana* ASSOCIADA COM MANGIFERINA INIBE
REPLICAÇÃO DE POLIOVÍRUS E HERPESVÍRUS**

DANIELE ZENDRINI RECHENCHOSKI

**GALACTOMANANA ISOLADA DE *Dimorphandra*
gardneriana ASSOCIADA COM MANGIFERINA INIBE
REPLICAÇÃO DE POLIOVÍRUS E HERPESVÍRUS**

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

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

Londrina
2015

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

R297g Rechenchoski, Daniele Zandrini.

Galactomanana isolada de *Dimorphandra gardneriana* associada com mangiferina inibe replicação de poliovírus e herpesvírus / Daniele Zandrini Rechenchoski. – Londrina, 2015.
134 f. : il.

Orientador: Rosa Elisa Carvalho Linhares.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2015.
Inclui bibliografia.

1. Agentes antivirais – Teses. 2. Plantas medicinais – Teses. 3. Polissacarídeos – Teses. 4. Vírus do herpes – Teses. 5. Poliovírus – Teses. 6. Replicação viral – Teses.
I. Linhares, Rosa Elisa Carvalho. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

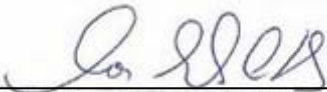
CDU 578.7

DANIELE ZENDRINI RECHENCHOSKI

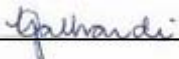
**GALACTOMANANA ISOLADA DE *Dimorphandra gardneriana*
ASSOCIADA COM MANGIFERINA INIBE REPLICAÇÃO DE
POLIOVÍRUS E HERPESVÍRUS**

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

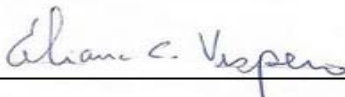
BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dra. Rosa Elisa Carvalho Linhares
Universidade Estadual de Londrina - UEL



Prof^a. Dra. Ligia Carla Faccin-Galhardi
Universidade Estadual de Londrina - UEL



Prof^a. Dra. Eliana Carolina Vespero
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 27 de fevereiro de 2015.

Aos meus queridos pais, Deonice e Antonio, por toda paciência, orações e ensinamentos de uma vida e pela confiança que depositaram em mim sem hesitar; à minha irmã, Denise, pelo carinho e amizade; e ao meu namorado Bruno, pelo companheirismo, estímulo e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que na sua infinita bondade, amparou-me nos momentos em que mais precisei, concedendo-me sabedoria, paciência, saúde e determinação para que eu pudesse concluir mais esta etapa.

Ao professor Carlos Nozawa, exemplo de competência e postura profissional, meu profundo respeito e admiração.

A minha orientadora, Rosa Elisa Carvalho Linhares, pela oportunidade de crescimento intelectual, permitindo que eu atuasse em uma área diferente e pela confiança, paciência, incentivo e conhecimento científico compartilhado.

A minha família, pelo alicerce e exemplo de moral e valores humanos vivenciados desde os meus primeiros anos de vida. Em especial, aos meus pais, pelo amor incondicional, pelas palavras de apoio e incentivo nos momentos de frustrações e pelo investimento constante em meus estudos.

Ao meu namorado Bruno, pela paciência nos momentos de ausência e pelo estímulo nos momentos de desmotivação.

Ao pessoal do Laboratório de Virologia, pelo acolhimento, convivência e lições profissionais e de vida.

Ao pessoal da Universidade Federal do Ceará, por ter cedido as amostras.

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

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

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

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

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para esta importante etapa da minha vida.

“A tarefa não é tanto ver aquilo
que ninguém viu, mas pensar o
que ninguém ainda pensou sobre
aquilo que todo mundo vê.”
(Arthur Schopenhauer)

RECHENCHOSKI, Daniele Zendrini. **Galactomanana isolada de *Dimorphandra gardneriana* associada com mangiferina inibe replicação de poliovírus e herpesvírus**. 2015. 134f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

Mangiferina é o principal constituinte obtido a partir de *Mangifera indica* e tem múltiplas atividades farmacológicas, tais como, antitumor, antidiabética, anti-inflamatória, antiparasitária, antifúngica, antibacteriana e, inclusive, antiviral. Muitos autores têm mostrado aplicações potenciais para galactomananas de *Dimorphandra gardneriana* como veículos para agentes farmacêuticos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade da galactomanana isolada de *Dimorphandra gardneriana* associada com mangiferina (GLMDg) contra o vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e o poliovírus tipo 1 (PV-1), em culturas de células HEP-2. A citotoxicidade do composto foi avaliada pelo método do MTT e a atividade antiviral pelo ensaio de redução de plaque, imunofluorescência e reação em cadeia da polimerase. A GLMDg exibiu uma concentração citotóxica (CC_{50}) $> 2000 \mu\text{g/mL}$. A concentração inibitória de 50% (CI_{50}) para o HSV-1 foi de $287.5 \mu\text{g/mL}$ e para o PV-1 de $206.2 \mu\text{g/mL}$, com índice de seletividade (IS) > 6.95 e > 9.69 , respectivamente. A análise do efeito da GLMDg em diferentes estágios da replicação do HSV-1 mostrou uma inibição máxima na concentração de $500 \mu\text{g/mL}$, quando adicionada concomitantemente com a infecção viral e no tempo 1 h após a infecção (pi.). Enquanto para o PV-1 maior inibição foi observada quando adicionada concomitantemente com a infecção viral e nos tempos 4 e 8 h pi. A inibição também foi demonstrada pelo decréscimo de células fluorescentes e/ou do genoma viral. Estes resultados sugerem que o composto inibiu a replicação do HSV-1 e do PV-1 e, portanto, representa um potencial candidato para agente antiviral.

Palavras-chave: *Dimorphandra gardneriana*. Galactomanana. Herpesvírus. Mangiferina. Poliovírus.

RECHENCHOSKI, Daniele Zandrini. **Galactomannan isolated from *Dimorphandra gardneriana* associated with mangiferin inhibits replication of poliovirus and herpesvirus**. 2015. 134p. Dissertation (Master's degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Mangiferin is the major constituent obtained from *Mangifera indica* and has multiple pharmacological activities, such as, antitumor, antidiabetic, anti-inflammatory, antiparasitic, antifungal, antibacterial and, including, antiviral. Many authors have shown potential applications for *Dimorphandra gardneriana* galactomannans as vehicles for pharmaceutical agents. The aim of this work was evaluate the activity of galactomannan isolated from *Dimorphandra gardneriana* associated with mangiferin (GLMDg) against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and poliovirus type 1 (PV-1), in HEp-2 cell cultures. The cytotoxicity of the compound was evaluated by the MTT method and the antiviral activity by the plaque reduction assay, immunofluorescence and polymerase chain reaction. The GLMDg exhibited a cytotoxic concentration (CC_{50}) > 2000 $\mu\text{g/mL}$. The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) for HSV-1 was of 287.5 $\mu\text{g/mL}$ and for PV-1 of 206.2 $\mu\text{g/mL}$, with selectivity index (SI) > 6.95 and > 9.69, respectively. The analysis of GLMDg effect in different stages of HSV-1 replication showed a maximum inhibition at the concentration of 500 $\mu\text{g/mL}$, when added concomitantly with viral infection and at the time 1 h post infection (pi.). While for PV-1 greatest inhibition was observed when added concomitantly with viral infection and at the times 4 and 8 h pi. The inhibition was also demonstrated by the decrease of fluorescent cells and/or of the genomic viral. These results suggested that the compound inhibited PV-1 and HSV-1 replication and therefore represents a potential candidate for antiviral agent.

Keywords: *Dimorphandra gardneriana*. Galactomannan. Herpesvirus. Mangiferin. Poliovirus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Estrutura do HSV	23
Figura 2	- Interações moleculares que ocorrem durante a adsorção e a penetração do HSV nas células.....	26
Figura 3	- Formação do complexo de pré-iniciação	27
Figura 4	- Replicação do genoma do HSV	30
Figura 5	- Montagem do capsídeo e empacotamento do genoma do HSV.....	32
Figura 6	- Modelos propostos para a saída do HSV da célula hospedeira.....	33
Figura 7	- Ciclo de multiplicação do HSV	34
Figura 8	- Etapas da infecção e latência do HSV	37
Figura 9	- Estrutura de alguns análogos de nucleosídeos e nucleotídeos anti-herpesvírus	51
Figura 10	- Mecanismo de ação do aciclovir (ACV)	55
Figura 11	- Estrutura do poliovírus	67
Figura 12	- Formação de poro na membrana celular pelo poliovírus	68
Figura 13	- Ciclo de replicação do poliovírus	70
Figura 14	- Distribuição global do poliovírus em 1988 e em 2014.....	78
Figura 15	- Estrutura geral das galactomananas	87
Figura 16	- Estrutura química da mangiferina	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Herpesvírus humanos pertencentes à família <i>Herpesviridae</i>	21
Tabela 2 - Classificação da Família <i>Picornaviridae</i>	65
Tabela 3 - Lista de extratos de plantas com atividade anti-HSV ou anti-PV.....	85
Tabela 4 - Lista de compostos extraídos de plantas com atividade anti-HSV ou anti-PV	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.	Antes de Cristo
ACV	Aciclovir
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
Alfa - TIF	<i>alfa- Trans-inducing factor</i>
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
bp	Pares de bases
bVOP	Vacina oral de poliovírus bivalente
CC ₅₀	Concentração citotóxica de 50%
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50%
Da	Daltons
dATP	Trifosfato de desoxiadenosina
dCMP	Monofosfato de desoxicitidina
dCTP	Trifosfato de desoxicitidina
dGTP	Trifosfato de desoxiguanosina
DISC	<i>Disabled infectious single cycle</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dTMP	Monofosfato de desoxitimidina
dTTP	Trifosfato de desoxitimidina
dUMP	Monofosfato de desoxiuridina
E	<i>Early</i>
EBV	Vírus Epstein-Barr
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G/C	Guanina/citosina
GAGs	Glicosaminoglicanas
HCF	<i>Host cell factor</i>
HCMV	Citomegalovírus humano
HDL	<i>High Density Lipoproteins</i>
HeLa	Células de carcinoma uterino humano
HEp-2	Células epiteliais de carcinoma de laringe humano

HHV	Herpesvírus humanos
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HS	Sulfato de heparana
HSV	Vírus herpes simplex
HSV-1	Vírus herpes simplex tipo 1
HSV-2	Vírus herpes simplex tipo 2
HVEM	Receptor mediador de entrada de herpesvírus
ICP	<i>Infected cell protein</i>
IS	Índice de seletividade
IDU	Iododesoxiuridina
IE	<i>Immediate early</i>
Ig	Imunoglobulina
IRES	<i>Internal ribossomal entry site</i>
KDa	Kilodaltons
Kpb	Kilopares de bases
L	<i>Late</i>
LATs	<i>Latency associated transcripts</i>
LCR	Líquido cefalorraquidiano
L20B	Linhagem de células murinas expressando receptor para poliovírus
M/G	Manose/galactose
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mL	Mililitros
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-difeniltetrazólio
mVOP	Vacina oral de poliovírus monovalente
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
nm	Nanômetros
Oct-1	Octâmero 1
Oct-2	Octâmero 2
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORFS	<i>Open reading frames</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PODS	<i>Nuclear promyelocytic leukemia protein oncogenic domains</i>

PTLD	Síndrome proliferativa pós-transplante
PV	Poliovírus
PV-1	Poliovírus tipo 1
PV-2	Poliovírus tipo 2
PV-3	Poliovírus tipo 3
PVR	<i>Poliovirus receptor</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _{si}	Ácido ribonucleico silenciador/interferência
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SNC	Sistema nervoso central
TAP	Proteína transportadora associada com o processamento do antígeno
3-OS-HS	Sulfato de heparana 3-O-sulfatado
tVOP	Vacina oral de poliovírus trivalente
UTR	<i>Untranslated region</i>
VAPP	<i>Vaccine associated paralytic poliomyelitis</i>
Vero	Linhagem celular proveniente de fibroblastos de rim de macaco verde da África (<i>Cercopithecus aethiops</i>)
VHS	<i>Virion host shut-off protein</i>
VIP	Vacina inativada de poliovírus
VOP	Vacina oral de poliovírus
VP	<i>Virion protein</i>
VPg	Proteína viral ligada ao genoma
VZV	Vírus da varicela-zoster
WB	<i>Western blot</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	VÍRUS HERPES SIMPLEX.....	18
3.1.1	Histórico	18
3.1.2	Família <i>Herpesviridae</i>	19
3.1.3	Estrutura Viral.....	21
3.1.4	Replicação Viral	24
3.1.5	Latência.....	35
3.1.6	Patogênese da Infecção pelo HSV.....	37
3.1.6.1	Efeitos do HSV na resposta imunológica	38
3.1.7	Manifestações Clínicas	39
3.1.7.1	Reativação da infecção	39
3.1.7.2	Infecção congênita ou neonatal.....	40
3.1.7.3	Ceratoconjuntivite.....	41
3.1.7.4	Infecção da orofaringe.....	41
3.1.7.5	Infecção genital	42
3.1.7.6	Encefalite.....	43
3.1.7.7	Infecções cutâneas	43
3.1.7.8	Infecções em pacientes imunossuprimidos	44
3.1.8	Diagnóstico Laboratorial.....	44
3.1.8.1	Isolamento do vírus em culturas de células.....	45
3.1.8.2	Microscopia eletrônica.....	45
3.1.8.3	Detecção do DNA viral	45
3.1.8.4	Testes sorológicos	46
3.1.9	Epidemiologia.....	46
3.1.10	Vacinas.....	49
3.1.11	Agentes Anti-Herpesvírus.....	50

3.1.11.1	Iododesoxiuridina	51
3.1.11.2	Trifluridina.....	52
3.1.11.3	Vidarabina	52
3.1.11.4	Brivudina	53
3.1.11.5	Aciclovir	54
3.1.11.6	Valaciclovir	56
3.1.11.7	Penciclovir.....	56
3.1.11.8	Fanciclovir	57
3.1.11.9	Ganciclovir.....	57
3.1.11.10	Valganciclovir	59
3.1.11.11	Cidofovir	59
3.1.11.12	Fomivirsen Sódico.....	60
3.1.11.13	Fosfonoformato	60
3.1.11.14	Doxorrubicina lipossomal	61
3.1.11.15	Docosanol	61
3.2	POLIOVÍRUS	62
3.2.1	Histórico	62
3.2.2	Família <i>Picornaviridae</i>	63
3.2.3	Estrutura Viral.....	65
3.2.4	Replicação Viral	67
3.2.5	Patogênese da Infecção pelo PV	70
3.2.6	Manifestações Clínicas	72
3.2.6.1	Poliomielite abortiva	72
3.2.6.2	Poliomielite não parálítica	72
3.2.6.3	Poliomielite parálítica	72
3.2.6.4	Síndrome pós-poliomielite	73
3.2.7	Diagnóstico Laboratorial.....	73
3.2.7.1	Isolamento do vírus em cultura de células	73
3.2.7.2	Exames inespecíficos.....	74
3.2.7.3	Sorologia e estudo do genoma.....	74
3.2.8	Epidemiologia.....	75
3.2.9	Vacinas.....	78
3.2.10	Tratamento	82
3.3	PRODUTOS NATURAIS	83

3.3.1	Galactomananas	86
3.3.2	<i>Dimorphandra gardneriana</i>	88
3.3.3	Mangiferina.....	90
4	REFERÊNCIAS	92
5	ARTIGO	108
6	CONCLUSÃO	134

1 INTRODUÇÃO

Algumas evidências sobre a existência de infecções virais surgiram a partir dos primeiros registros de atividades humanas, acompanhando o homem desde a formação das primeiras civilizações e causando algumas das doenças mais devastadoras à humanidade (YAMAMOTO, 2011). É notória a ameaça que as viroses representam principalmente à saúde pública, seja pela ampla distribuição, facilidade de transmissão e capacidade de alguns vírus de estabelecer infecções latentes (CHATTOPADHYAY et al., 2009; LU et al., 2011). Além disso, considerando as infecções virais e as suas consequências, o pesado ônus socioeconômico e médico, a emergência de cepas virais resistentes aos antivirais disponíveis, e principalmente, a inexistência de uma terapia específica para a maioria dos casos, o desenvolvimento de fármacos antivirais seguros, eficazes e de baixo custo deve ser enquadrado entre as prioridades globais (CHATTOPADHYAY et al., 2009; KUCHENBECKER, 2006).

Uma das principais razões para o insucesso no desenvolvimento de fármacos antivirais é a natureza dos vírus, os quais são totalmente dependentes dos processos metabólicos celulares para sua replicação. Assim, agentes que inibem a replicação viral e/ou causam a inativação do vírus, exibem também certo grau de toxicidade às células hospedeiras. Algumas características são indispensáveis aos medicamentos antivirais como a especificidade pelas células infectadas, a eficácia e um baixo nível de toxicidade (TAFURI, 2011).

Portanto, compostos que apresentem potencial terapêutico necessitam ser avaliados quanto à sua toxicidade, uma vez que substâncias com ótima atividade biológica, porém com elevada toxicidade exibem altos riscos na sua utilização. A medida da determinação da toxicidade é, dessa forma, um parâmetro importante para avaliar a margem de segurança da utilização dessas substâncias (GEMIN, 2008). Os ensaios baseados em cultura de células geralmente são considerados ideais na descoberta de novos fármacos, pois mimetizam interações moleculares que ocorrem no sistema celular fisiológico humano (BAKER et al., 2007).

O desenvolvimento e a utilização de fármacos antivirais a partir de produtos naturais, que sejam capazes de prevenir uma infecção ou de combatê-la, têm despertado o interesse das indústrias farmacêuticas. Existe um vasto potencial neste campo de pesquisa no Brasil, visando ao aproveitamento de produtos naturais com

valor curativo e que há muito tempo são utilizados pela medicina popular como medicamentos antibacterianos, antifúngicos, anti-inflamatórios, antitumorais e que agora podem ser testados quanto aos seus potenciais como antivirais (OLIVEIRA, 2007).

As plantas são capazes de sintetizar moléculas bastante complexas com estereoquímica específica, fornecendo uma grande diversidade estrutural, muito maior do que a fornecida pelos compostos obtidos por técnicas de química combinatória. Portanto, essas moléculas não podem ser ignoradas pelas indústrias farmacêuticas (OJIMA, 2008; RHISTON, 2008). Desta forma, a investigação da atividade antiviral destes compostos pode revelar macromoléculas altamente eficazes e de fácil aceitabilidade, por apresentarem baixa toxicidade e serem de baixo custo (BANDYOPADHYAY et al., 2011; ZHU et al., 2006). Estas substâncias têm mostrado interagir com muitos alvos virais, variando desde a adsorção do vírus à célula hospedeira até a liberação das novas partículas virais, o que pode resultar em mecanismos de ação complementares às drogas antivirais existentes (LOPES, 2012).

A busca de novos agentes farmacologicamente ativos, através da triagem de fontes naturais, tem levado à descoberta de muitos fármacos úteis clinicamente para o tratamento de várias doenças. Neste contexto, produtos naturais, representando uma fonte inesgotável de compostos com grande diversidade de estruturas químicas, oferecem novas opções de potenciais agentes terapêuticos (GOMES, 2005). A realização deste trabalho constitui uma importante estratégia de triagem de um composto ativo de origem natural, direcionando a execução de estudos posteriores mais aprofundados, o que possibilitaria a inserção desta substância no arsenal disponível para o controle e tratamento de viroses.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antiviral de galactomanana isolada de *Dimorphandra gardneriana* associada com mangiferina contra os vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e poliovírus tipo 1 (PV-1), *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar a toxicidade do composto em células HEp-2 e determinar a concentração citotóxica de 50% (CC₅₀), utilizando o teste do MTT;
- b) Determinar a concentração inibitória de 50% (CI₅₀), através do ensaio de redução de plaque;
- c) Determinar o índice de seletividade (IS) do composto testado;
- d) Analisar a atividade antiviral do composto, através do ensaio de redução de plaque, seguindo diferentes protocolos de tratamento, além da avaliação antiviral pelos ensaios de imunofluorescência (síntese de proteínas) e pela reação em cadeia da polimerase (síntese de ácido nucleico);
- e) Avaliar o potencial sinérgico do composto ao aciclovir contra o HSV-1.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 VÍRUS HERPES SIMPLEX

3.1.1 Histórico

Algumas descrições de lesões genitais semelhantes às causadas pelo vírus herpes simplex (HSV) foram encontradas em tábuas sumerianas, por volta do terceiro milênio antes de Cristo (a.C.), e também no Papiro de Ebers (cerca de 1500 a.C.) (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007). Na Grécia Antiga, o médico Hipócrates (460/377 a.C.) documentou lesões causadas por esse vírus, denominando-as de *herpes* (derivado do grego *herpein* = rastejar, réptil), já que apareciam umas próximas às outras e eram de natureza vesicular. Porém, as lesões relatadas por Hipócrates poderiam ser causadas por qualquer outro microrganismo. O primeiro autor a descrever uma patologia com lesões da maneira como ocorre para o herpes zoster foi Celsius. O historiador Heródoto (484/425 a.C.), denominou a doença de *herpes febrilis*, a qual apresentava manifestações características como febre, pequenas vesículas na boca e ulcerações nos lábios. O farmacêutico e médico Galeno (129/204 a.C.) dizia que as lesões eram uma maneira de o corpo liberar os humores malignos (WIGG; MIRANDA, 2008).

O médico do Rei Louis XIV, Jean Astruc, publicou um livro “*De Morbis Veneris*”, no qual ele escreveu sobre herpes genital, depois de estudar doenças venéreas em prostitutas francesas (KIM et al., 2011). Posteriormente, em 1896, Fournier escreveu sobre o diagnóstico e o tratamento de herpes genital (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007). A comprovação de que o herpes era infeccioso e podia ser transmitido de uma pessoa a outra, coube a Vidal. Paralelamente, Gruter realizou estudos em coelhos mostrando inequivocamente o isolamento e a transmissão do vírus. Os experimentos de Gruter foram, mais tarde, repetidos e aprimorados por Lowenstein. Em 1930, Andrews e Carmichael descreveram a reativação da doença em pacientes com anticorpos neutralizantes e em 1939, Burnet e Williams publicaram a descrição que mais se assemelha à que é hoje reconhecida para os herpesvírus. Por fim, em 1968, Nahmias e Dowdle demonstraram a existência de dois tipos de herpesvírus do gênero *Simplexvirus*, com base em suas diferenças antigênicas e biológicas (WIGG; MIRANDA, 2008).

3.1.2 Família *Herpesviridae*

Até o momento, dos mais de 200 vírus pertencentes à família *Herpesviridae* capazes de infectar diferentes espécies, oito causam doenças em seres humanos. Todos os membros dessa família compartilham quatro significantes propriedades biológicas: codificam várias enzimas envolvidas no metabolismo e síntese do ácido nucleico viral e processamento de proteínas; a síntese do DNA viral ocorre no núcleo; a produção de partículas infecciosas leva à destruição das células e; apresentam a capacidade de causar infecção persistente, com alguns vírus permanecendo em estado de latência, em que somente alguns genes são expressos (WIGG; MIRANDA, 2008). Os herpesvírus humanos (HHV) estão agrupados em três subfamílias (Tabela 1), com base em diferenças nas características virais (estrutura do genoma, tropismo tecidual, efeito citopatológico e sítio de infecção latente, assim como na patogênese e manifestações da doença) (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

Os vírus da subfamília *Alphaherpesvirinae* possuem uma gama variável de hospedeiros, apresentam um ciclo replicativo curto, destroem rapidamente as células de cultivo e estabelecem infecções latentes primariamente em neurônios dos nódulos sensoriais e autonômicos (FRANCO; ROEHE, 2007). Essa subfamília abriga os gêneros: *Simplexvirus*, herpes simplex tipos 1 e 2 (HSV-1/HHV-1, HSV-2/HHV-2), os quais são neurotrópicos e causam lesões orofaciais e genitais, podendo ocasionar também encefalite e; *Varicellovirus*, vírus da varicela-zoster (VZV ou HHV-3), que causa varicela (catapora) em crianças e em adultos com algum tipo de imunossupressão, principalmente idosos, o vírus pode ainda sofrer reativação e provocar o aparecimento do quadro de herpes zoster (FRANCO; ROEHE, 2007; WIGG; MIRANDA, 2008). Essa subfamília também inclui gêneros que infectam aves: *Mardivirus* (agente da doença de Marek) e *Iltovirus* (agente da laringotraqueíte infecciosa) (FRANCO; ROEHE, 2007).

Os representantes da subfamília *Betaherpesvirinae* possuem uma gama restrita de hospedeiros e apresentam ciclo replicativo longo, ou seja, a infecção progride lentamente em cultivos celulares. As células infectadas frequentemente apresentam aumento de volume (citomegalia). O vírus pode ser mantido de forma latente em tecidos glandulares, células linforreticulares, rins e outros tecidos (FRANCO; ROEHE, 2007). Nesta subfamília encontram-se os gêneros

Cytomegalovirus, citomegalovírus humano (HCMV ou HHV-5), capaz de causar infecções congênitas, acarretando, principalmente, perda de audição e retardamento mental e *Roseolovirus*, herpesvírus humanos tipos 6 e 7 (HHV-6 e HHV-7). O HHV-6 possui duas variantes, A e B. Até o momento, nenhuma doença foi claramente associada ao HHV-6A, enquanto a variante B é o agente etiológico do exantema súbito, também conhecido por *roseola infantum* (FRANCO; ROEHE, 2007; VIANNA et al., 2002; WIGG; MIRANDA, 2008). O HHV-7 também está envolvido como agente do exantema súbito (WIGG; MIRANDA, 2008). Outro gênero pertencente a essa subfamília é o *Muromegalovirus* (citomegalovírus murino) (FRANCO; ROEHE, 2007).

Por fim, os representantes da subfamília *Gamaherpesvirinae* estabelecem infecções latentes principalmente em células linfoblastóides. Alguns membros podem produzir infecções líticas em células epitelióides e fibroblásticas e esses vírus possuem potencial oncogênico (FRANCO; ROEHE, 2007). Essa subfamília contém os gêneros: *Lymphocryptovirus*, vírus Epstein-Barr (EBV ou HHV-4), também chamado de vírus da mononucleose infecciosa, capaz de causar o linfoma de Burkitt, o linfoma do sistema nervoso central (SNC) em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), a síndrome proliferativa pós-transplante e o carcinoma de nasofaringe e; *Rhadinovirus*, HHV-8, que está associado ao sarcoma de Kaposi, ao linfoma de efusão primário e à doença multifocal de Castleman (FRANCO; ROEHE, 2007; PAOLI, 2004; WIGG; MIRANDA, 2008).

Tabela 1 – Herpesvírus humanos pertencentes à família *Herpesviridae*

Tipo	Sinônimo	Subfamília	Patologia
HHV-1	Vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1)	α	Herpes orofacial e/ ou genital (predominantemente orofacial)
HHV-2	Vírus herpes simplex tipo 2 (HSV-2)	α	Herpes orofacial e/ou genital (predominantemente genital)
HHV-3	Vírus varicela-zoster (VZV)	α	Varicela ou zoster
HHV-4	Vírus Epstein-Barr (EBV), linfocriptovírus	γ	Mononucleose infecciosa, linfoma de Burkitt, linfoma do SNC em pacientes com AIDS, síndrome linfoproliferativa pós-transplante (PTLD), carcinoma de nasofaringe
HHV-5	Citomegalovírus (HCMV)	β	Síndrome mononucleose- <i>like</i> , infecções congênicas, retinite, pneumonia
HHV-6 HHV-7	Roseolovírus	β	Exantema súbito (sexta doença ou <i>roseola infantum</i>)
HHV-8	Herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi	γ	Sarcoma de Kaposi, linfoma primário de efusão, alguns tipos de doença de Castleman

Fonte: Wigg e Miranda (2008).

3.1.3 Estrutura Viral

O HSV é um vírus envelopado que possui genoma de DNA dupla fita linear. O capsídeo icosaédrico é formado por 162 capsômeros, sendo 150 hexaméricos e 12 pentaméricos e não está localizado simetricamente no centro do envelope viral (KIMBERLIN, 2003; WIGG; MIRANDA, 2008). O vírion é esférico, de 186 nm de diâmetro, podendo chegar a 225 nm, incluindo as espículas do envelope e apresenta peso molecular de 96×10^6 KDa (ARDUINO; PORTER, 2008; WIGG; MIRANDA, 2008).

O genoma consiste de dois componentes ligados covalentemente, designados L (long) e S (short) (KIMBERLIN, 2003). Cada componente é formado

por sequências únicas (U_L e U_S , respectivamente) flanqueadas por regiões de sequências repetidas e invertidas (IR_L e TR_L , IR_S e TR_S) que facilitam a replicação do genoma (ARDUINO; PORTER, 2008; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). O rearranjo desses dois componentes origina quatro isômeros lineares que diferem somente na orientação das suas sequências de DNA (KIMBERLIM, 2003; WHITLEY; ROIZMAN, 2001). Cada vírion de HSV intacto contém apenas um desses quatro isômeros e todos são igualmente virulentos, ou seja, funcionalmente equivalentes na célula hospedeira (KIMBERLIN, 2003). O genoma do HSV-1 e do HSV-2 também possui pelo menos 84 possíveis sequências de leitura aberta (*open reading frames* - ORFs), que codificam aproximadamente 100 proteínas, que constituem o capsídeo, componentes do envelope, tegumento, além de proteínas não estruturais ou funcionais. A nomenclatura mais comumente utilizada para designar as proteínas virais é VP (*virion protein*) ou ICP (*infected cell protein*) (WIGG; MIRANDA, 2008). Estudos baseados na caracterização física do genoma do HSV estimaram originalmente ser de aproximadamente 150 Kpb com 68% de G/C para o HSV-1 e 69% de G/C para o HSV-2. Também foi observado 50% de homologia entre os genomas desses vírus (BUTEL, 2012a; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007; VERONESI; FOCACCIA, 2005).

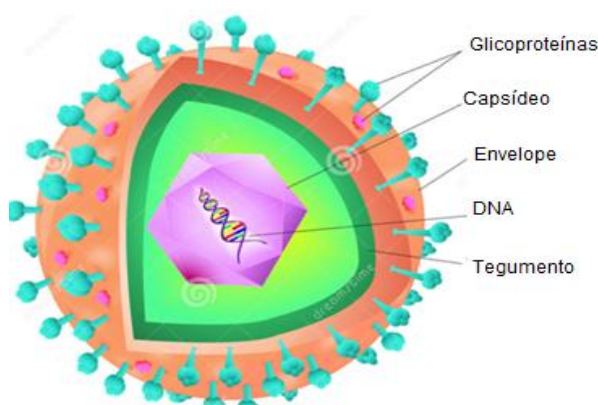
O capsídeo possui entre 100 e 110 nm de diâmetro e é formado pelas proteínas virais: VP5 - principal proteína do capsídeo (U_L19), VP26 (U_L35), VP23 (U_L18) e VP19C (U_L38). Além disso, também contém a proteína codificada pelo gene U_L6 , que forma um dodecâmero e origina um portal localizado dentro do capsídeo, através do qual ocorre o empacotamento e a liberação do DNA viral e, a proteína VP24 ($U_L26.5$), protease processadora de proteínas durante o empacotamento do DNA no capsídeo (SILVA; BOWERS, 2009; WIGG; MIRANDA, 2008; ZOLINI, 2012).

Entre o capsídeo e o envelope encontra-se uma camada amorfa proteica, denominada tegumento (ELLERMANN-ERIKSEN, 2005). Ele é constituído por mais de 20 proteínas importantes na regulação do ciclo replicativo viral, servindo como um compartimento de distribuição de algumas proteínas necessárias no início da infecção (ARDUINO; PORTER, 2008). As principais são: a *α -trans-inducing factor* (α -TIF), conhecida como VP16 ou $V_{mw}65$, envolvida na transcrição dos genes iniciais imediatos (α), a *virion host shut-off protein* (VHS) ou VP22, produto do gene U_L41 , que tem sido implicada na estabilização de certas proteínas virais tais como as glicoproteínas E (gE) e D (gD) e ICP0, além de estar relacionada à disseminação

viral durante a infecção lítica e degradar o mRNA da célula hospedeira e a VP1-2 que parece participar da liberação do DNA viral, no poro nuclear, após a penetração (SILVA; BOWERS, 2009; WIGG; MIRANDA, 2008).

Finalmente, o envelope é um envoltório que apresenta natureza bioquímica com constituição de lipídeos, compatível com membranas de estruturas citoplasmáticas das células infectadas e, contém 600 a 750 espículas de glicoproteínas virais de cerca de 8 nm de comprimento (ARDUINO; PORTER, 2008; BUTEL, 2012a; WIGG; MIRANDA, 2008). Ele consiste em uma bicamada lipídica e acomoda aproximadamente 11 glicoproteínas virais, sendo que quatro delas (gB, gD, gH, gL) são essenciais para a entrada do vírus nas células (ARDUINO; PORTER, 2008). Além dos lipídeos e das glicoproteínas, há diversas poliaminas e proteínas não glicosiladas no envelope viral (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007; WIGG; MIRANDA, 2008). A partícula viral é frágil, pois o envelope lipídico é suscetível ao tratamento químico com solventes orgânicos, detergentes e proteases e ao tratamento físico como calor (60°C) ou radiação ionizante ou não ionizante (WIGG; MIRANDA, 2008). Sua estrutura está representada na Figura 1.

Figura 1 - Estrutura do HSV



Fonte: adaptado de Dreamstime (2015).

3.1.4 Replicação Viral

A infecção pelo vírus é iniciada através da adsorção, mediada por glicoproteínas virais que se ligam às cadeias de glicosaminoglicanas (GAGs) presentes na superfície celular, tais como moléculas de sulfato de heparana, sulfato de condroitina e sulfato de dermatana (WIGG; MIRANDA, 2008). Dentre elas, o sulfato de heparana (HS) é considerado o principal receptor de ligação do HSV, possuindo um papel fundamental na aderência das glicoproteínas virais C (gC) e B (gB) na superfície da célula alvo (SPEAR, 2004; WIGG; MIRANDA, 2008). A importância desse passo é evidente a partir da observação de que a remoção enzimática das GAGs resulta em um decréscimo de 10 a 20 vezes na eficiência de formação de plaques (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007). Estudo realizado por Bender et al. (2005), com vírus mutantes que não expressavam a gC, demonstrou que eles tinham a sua adsorção reduzida, porém a infecciosidade viral era mantida. Já os vírus desprovidos de gB não foram capazes de penetrar nas células alvo. Portanto, a gC é considerada uma glicoproteína não essencial de entrada, ao contrário da gB, que é essencial.

Essa interação entre a gC e a gB com o receptor sulfato de heparana é lábil até que a gD participe do processo (WIGG; MIRANDA, 2008). Em seus estudos, Reske et al. (2007) observaram que mutantes de gD que apresentavam deleção ou inserção na região carboxi-terminal tinham a entrada celular prejudicada. Vários receptores celulares para a gD são conhecidos, tais como o “receptor mediador de entrada de herpesvírus” (HVEM), que é uma proteína transmembranar do tipo I com domínio extracelular rico em cisteína e membro da família do receptor do fator de necrose tumoral. O HVEM também é conhecido como HveA, ATAR, TR2, TNFRSF14. Outros receptores de gD são as nectinas 1 (HveC) e 2 (HveB), membros da superfamília das imunoglobulinas e uma forma específica de HS chamada 3-OS HS (sulfato de heparana 3-O-sulfatado) (ELLERMANN-ERIKSEN, 2005; SPEAR, 2004). As modificações enzimáticas no HS para gerar o 3-OS HS são catalisadas pela enzima 3-O-sulfotransferase (SPEAR, 2004). Essa enzima está presente no cérebro e há especulações de que esse receptor pode desempenhar um papel importante no referido órgão (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007).

Todos esses receptores são expressos em diferentes células e tecidos, determinando assim, um importante papel no tropismo viral (TIWARI et al., 2005). O

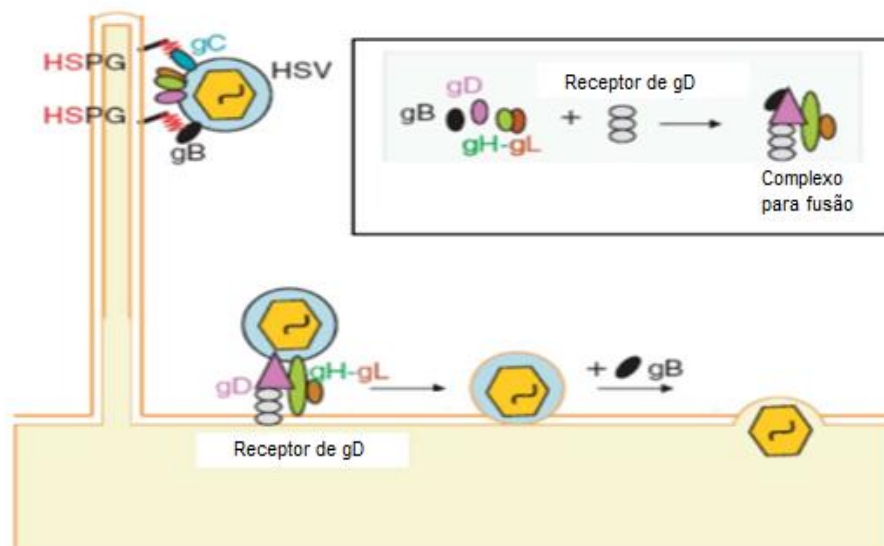
receptor HVEM, por exemplo, pode ser encontrado em uma grande variedade de tecidos e tipos celulares, incluindo células T e B, outros leucócitos, células epiteliais e fibroblastos, porém ainda não foi constatada a sua presença em neurônios. Já os receptores de nectina-1 e 2 podem ser encontrados em células epiteliais, fibroblastos e inclusive em neurônios, participando dos processos de adesão celular (SPEAR, 2004). Mais especificamente, a nectina-1 é amplamente expressa em células humanas de origem epitelial e neuronal, assim como na córnea, enquanto o receptor de nectina-2 é expresso em muitos tecidos humanos, mas com expressão limitada em células neuronais e queratinócitos. Por fim, o receptor não proteico 3-OS HS é expresso em muitas linhagens de células humanas como neuronais e endoteliais (TIWARI et al., 2005). O HSV-1 e o HSV-2 divergem na preferência pelos receptores. Enquanto o HVEM e a nectina-1 são importantes receptores de entrada para ambos os sorotipos, a nectina-2 é praticamente inativa para mediar a entrada do HSV-1 na célula, mas apresenta uma fraca atividade em relação a entrada do HSV-2; a recíproca acontece para o 3-OS HS (SPEAR, 2004).

Posteriormente, quando a gD interage com um dos seus diversos receptores, ela sofre uma alteração conformacional na sua cadeia polipeptídica, liberando o segmento carboxi-terminal, o que proporciona a interação com o heterodímero formado por gH/gL. Essa interação expõe os domínios de fusão de gB e do heterodímero, levando a fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula alvo, evento muito rápido, logo após a adsorção (Figura 2) (HELDWEIN et al., 2006; WIGG; MIRANDA, 2008).

O HSV pode penetrar nas células por fusão entre o envelope viral e a membrana celular. Essa fusão da membrana pode ocorrer de duas formas distintas, resultando em diferentes vias de entrada. A principal delas é a dependente de interações com receptores celulares específicos e independente do pH. Alternativamente, a ligação do vírus a uma célula pode induzir a endocitose do vírus, seguida de acidificação do endossomo, desencadeando a fusão entre o envelope viral e a membrana do endossomo (SHUKLA; SPEAR, 2001). O ambiente ácido de vesículas de endocitose é usado por muitos vírus para penetrar eficientemente no citoplasma do hospedeiro (CLEMENT et al., 2006). Embora o HSV-1 costume entrar na célula pela via independente do pH, a rota de entrada pode variar de acordo com o tipo de célula. Por exemplo, em células Vero e HEp-2, o HSV penetra por fusão da membrana plasmática e libera seu capsídeo diretamente no citoplasma. Então, os

microtúbulos impulsionam os capsídeos nus para a região nuclear. No entanto, em outras linhagens celulares, a endocitose é necessária para iniciar a entrada do HSV na célula. Dois desses tipos celulares são as células de ovário de hamster chinês, modificadas para expressar receptores de entrada, tais como HVEM, nectina-1 e nectina-2 e as células HeLa (AKHTAR; SHUKLA, 2009; NICOLA; STRAUS, 2004). Os pesquisadores Wigg e Miranda (2008), porém, relatam que o mecanismo de penetração por endocitose pode até ocorrer, mas levaria à degradação e digestão da partícula viral, abortando a infecção.

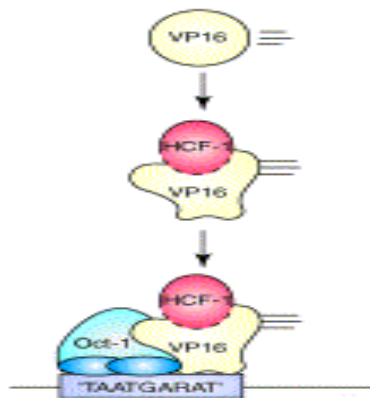
Figura 2 - Interações moleculares que ocorrem durante a adsorção e a penetração do HSV nas células. A gC e a gB interagem reversivelmente com o sulfato de heparana (HS), na superfície da membrana da célula e, posteriormente, a gD se liga a outros receptores celulares, estabilizando a ligação. Com isso, ocorre uma alteração conformacional de gD que interage com gH/gL, havendo a exposição dos domínios de fusão de gB e do heterodímero e fazendo com que haja a penetração do vírus através da fusão direta do envelope viral com a membrana da célula.



Fonte: adaptado de Akhtar e Shukla (2009).

Após a penetração no citoplasma, o nucleocapsídeo é transportado, via microtúbulos do citoesqueleto, através da interação da proteína do tegumento U_L34 com a dineína celular, até o poro da membrana nuclear, onde o DNA viral é liberado no núcleo (YE et al., 2000). Também foi proposto que a proteína do tegumento VP1-2, ligada ao capsídeo, tem que ser clivada por uma serino ou cisteíno protease para que o DNA seja liberado no núcleo e esse evento só ocorre quando o capsídeo se liga ao poro nuclear. Em seguida, a proteína do tegumento VP16 se desliga do mesmo e liga-se à proteína celular chamada fator celular do hospedeiro (HCF- *host cell factor*). Dentro do núcleo, o complexo VP16 - HCF liga-se a Oct 1 (octâmero 1) ligado ao DNA viral, formando o complexo ativador ou de pré-iniciação. O Oct-1 é um fator de transcrição celular que reconhece uma sequência específica de oito nucleotídeos em promotores de genes celulares. Quando complexado com VP16, o Oct-1 reconhece outra sequência nucleotídica que está presente em promotores de genes virais. Por essa ligação ser instável, há necessidade da participação de HCF para formar o complexo ativador de transcrição dos genes α (Figura 3). A outra proteína do tegumento, VHS, permanece no citoplasma onde causa a degradação do mRNA da célula hospedeira. Os processos de transcrição do genoma viral em mRNA, replicação do DNA viral e a montagem dos novos capsídeos são todos realizados no núcleo (WIGG; MIRANDA, 2008).

Figura 3 - Formação do complexo de pré-iniciação. A proteína do tegumento VP16 se desliga do mesmo e liga-se à proteína celular HCF. Dentro do núcleo, o complexo VP16 – HCF liga-se ao Oct 1 ligado ao DNA viral, formando o complexo ativador ou de pré-iniciação, o qual é responsável por ativar a transcrição dos genes α .



Fonte: Wysocka e Herr (2003).

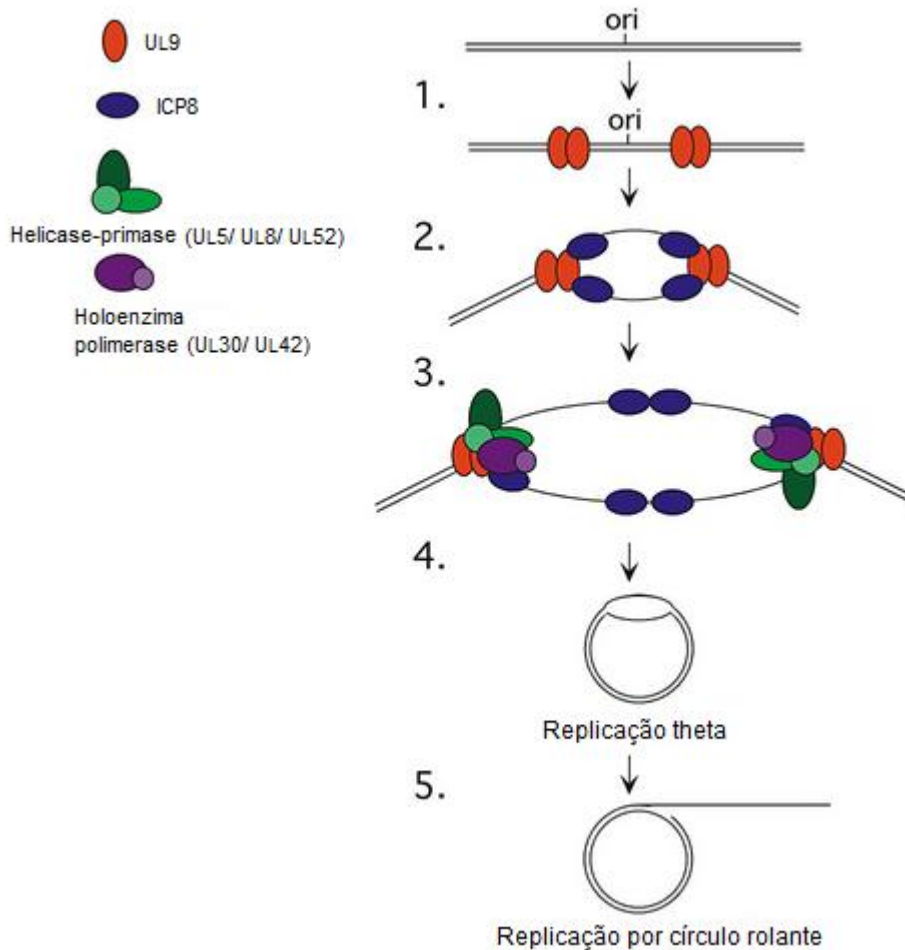
O ciclo lítico do HSV envolve a expressão regulada de maneira sequencial e coordenada de três conjuntos de genes virais: α ou iniciais imediatos (*immediate early-IE*), β ou iniciais (*early-E*) e γ ou tardios (*late-L*) (HANCOCK; CORCORAN; SMILEY, 2006). Inicialmente, o DNA viral é transcrito em mRNA pela RNA polimerase II da célula hospedeira e os primeiros genes a serem transcritos são os genes α . A principal característica que os diferencia dos outros genes virais é a presença da sequência consenso 5'GyATGnTAATGAArATTcYTTGnGGG3'. Após a formação do complexo ativador, seis proteínas α são sintetizadas nos estágios iniciais de uma infecção produtiva: ICP0 (α 0), ICP4 (α 4), ICP22 (α 22/U_s1), ICP27 (α 27/U_L54), ICP47 (α 47/U_s12) e U_s1.5. O pico máximo de produção dessas proteínas iniciais imediatas ocorre três horas após a entrada do vírus na célula (WIGG; MIRANDA, 2008). A ICP0 é uma proteína multifuncional, melhor caracterizada como um transativador gênico, que estimula a expressão de genes do HSV pertencentes a todas as três classes temporais (fases α , β e γ) durante a infecção lítica (HANCOCK; CORCORAN; SMILEY, 2006; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007). Já a fosfoproteína ICP4 se liga ao DNA e interage com fatores de transcrição, sendo necessária para a expressão da maioria dos genes de fase β e γ (OLESKY et al., 2005; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007). Outra proteína α é a ICP22, uma proteína regulatória fosforilada pela proteína cinase codificada pelo gene U_L13, que é necessária para a expressão de um subconjunto de proteínas γ e também participa da fosforilação da RNA polimerase II (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007; WIGG; MIRANDA, 2008). O estudo de Mostafa e Davido (2013) sugere que a U_s1.5 parcialmente complementa as funções da ICP22. A ICP27, por sua vez, está envolvida na inibição de *splicing* de mRNA, promovendo a exportação nuclear desse mRNA. Por fim, a ICP47 se liga às proteínas transportadoras associadas com o processamento do antígeno (TAP1 ou TAP2) e as impede de transportar os peptídeos antigênicos para o retículo endoplasmático, evitando que esses antígenos sejam apresentados pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I em células infectadas (WHITLEY; ROIZMAN, 2001; WIGG; MIRANDA, 2008).

Uma vez acumuladas em quantidade suficiente, as proteínas α retornam para o núcleo a fim de ativar a transcrição e a tradução dos genes β ou iniciais, em proteínas iniciais ou polipeptídeos β , responsáveis pela replicação do ácido nucleico viral, incluindo a DNA polimerase e a timidino cinase. O pico máximo de síntese

dessas proteínas ocorre em seis horas. À medida que as proteínas β são expressas, várias proteínas celulares migram para o núcleo e se reúnem para formar o complexo de replicação nos sítios pré-replicativos, onde a síntese do DNA viral tem início, próximo aos domínios nucleares do genoma celular chamados PODs (*nuclear promyelocytic leukemia protein oncogenic domains* – proteína nuclear da leucemia promielocítica de domínio oncogênico), também conhecidos como domínio nuclear 10 (ND10) (WIGG; MIRANDA, 2008). Uma consideração importante é que o recrutamento de fatores do hospedeiro para os sítios pré-replicativos e compartimentos de replicação pode inibir alguns processos das células hospedeiras, tais como a transcrição de genes, o processamento e transporte de mRNAs e a síntese de proteínas, o que beneficia a replicação viral (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007).

O primeiro passo na replicação do DNA do HSV envolve a ligação da proteína codificada pelo gene U_L9 às sequências de origem *oriS* e *oriL*, as quais são estruturas palindrômicas, com 144 e 45 bp, respectivamente (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007). A proteína ICP8 associa-se à U_L9, a qual inicia a sua atividade de helicase e a ICP8 se liga a regiões de DNA de fita simples, recrutando para o local o complexo helicase-primase, o qual contém as proteínas virais dos genes U_L5, U_L8 e U_L52 (FRANCO; ROEHE, 2007). Esse complexo promove o desenrolamento do DNA e sintetiza um iniciador (*primer*) para a síntese do DNA (WIGG; MIRANDA, 2008). A holoenzima DNA polimerase do HSV-1 é um heterodímero, composto pela proteína do gene U_L30 (136 KDa) associada com a proteína do gene U_L42 (65 KDa). A subunidade U_L30 possui o sítio catalítico responsável pela polimerização das novas cadeias e também apresenta atividade intrínseca 3'-5' exonuclease, servindo como atividade *proofreading* (correção dos erros). A proteína do gene U_L42 é necessária para a processividade da U_L30 e a interação entre U_L30 e U_L42 é essencial para a replicação do DNA viral, *in vivo*, sendo que estes locais de interação são investigados como possíveis alvos para compostos antivirais (FRANCO; ROEHE, 2007; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007). Esse modelo propõe o início da replicação em uma molécula de DNA circularizada, seguida de replicação bidirecional do tipo theta que, posteriormente, é alterada para um mecanismo de círculo rolante (Figura 4) (FRANCO; ROEHE, 2007).

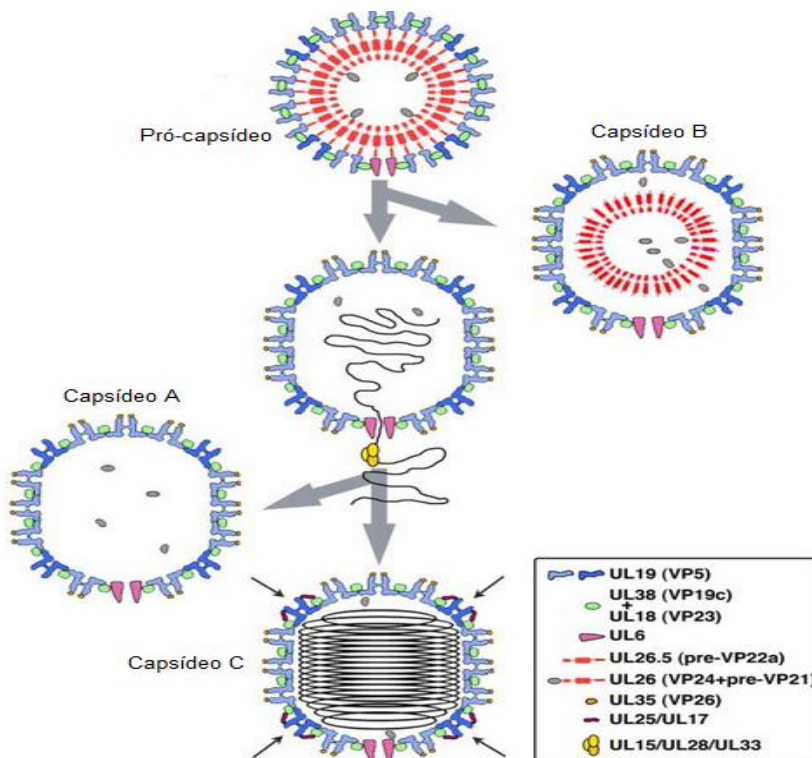
Figura 4 - Replicação do genoma do HSV. (1) A proteína de ligação à origem (codificada pelo UL9) se liga a sítios específicos da origem de replicação (*oriL* ou *oriS*) e se associa a ICP8 (2), que é a proteína de ligação a cadeia simples de DNA. (3) A helicase/primase é então recrutada para a origem, promovendo o desenrolamento do DNA e a síntese de um iniciador (*primer*). Isso faz com que se forme uma bolha e a holoenzima polimerase inicia, então, a síntese de DNA. Ela ocorre inicialmente pelo mecanismo de replicação theta (4) e, em seguida, passa para um mecanismo de círculo rolante (5).



Fonte: adaptado de Taylor et al. (2002).

Após a replicação do genoma, o terceiro grupo de genes é expresso. Esses genes γ ou tardios são regulados por proteínas α e β e codificam proteínas tardias, que formam as proteínas estruturais do vírus, como as proteínas do tegumento, capsídeo e espículas glicoproteicas. Essas proteínas são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e algumas das proteínas do envelope viral são glicosiladas no complexo de Golgi. Os genes tardios podem ser divididos em duas classes: tardios γ_1 (genes que codificam ICP5, glicoproteínas B e D e γ 34.5), chamados de “fugazes” (*leaky-late*), e verdadeiramente tardios γ_2 (U_L44, o gene que codifica a glicoproteína C, U_L41, U_L36, U_L38, U_L11). Os transcritos γ_1 são expressos em baixos níveis antes da replicação do DNA e alcançam níveis elevados assim que a replicação se inicia. Por outro lado, os transcritos γ_2 são difíceis de detectar até que termine a replicação do DNA. A formação do capsídeo ocorre em torno de proteínas de suporte (*scaffolding*) que são transportadas para o núcleo. Estudos de imunofluorescência demonstraram que as fases iniciais da montagem de, pelo menos, algumas proteínas do capsídeo ocorrem no citoplasma. A VP5, principal proteína do capsídeo; a VP26, localizada nas terminações externas dos hexons; e a VP23, proteína tríplex, são incapazes de montagem por meios próprios (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007; WIGG; MIRANDA, 2008). Três tipos de capsídeos são formados, denominados A, B, e C (Figura 5). Os componentes predominantes do capsídeo são as proteínas VP5 (principal), a pré-VP22a (*scaffolding*), VP19C e VP23 (tríplex, 1 VP19C : 2 VP23) (NEWCOMB et al., 2003; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007). Os envoltórios vazios contendo um arcabouço interno formado pelas proteínas *scaffolding* são montados primeiro (pró-capsídeo), e mais tarde, quando o DNA é empacotado esse arcabouço proteico se perde (WIGG; MIRANDA, 2008). Os genes U_L26 e U_L26.5 codificam um conjunto de produtos envolvidos na montagem e na maturação dos capsídeos (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007). Além disso, o complexo de U_L15, U_L28 e U_L33 cliva os concatâmeros de DNA em monômeros, encapsidando-os (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007; WIGG; MIRANDA, 2008).

Figura 5 - Montagem do capsídeo e empacotamento do genoma do HSV. Três tipos de capsídeos são formados: A, B e C. O capsídeo B, que ocorre em uma taxa de 20-30%, contém proteínas *scaffolding*, mas não apresenta o core. O capsídeo A ocorre raramente e aparece quando as proteínas *scaffolding* são expelidas, mas o DNA não é encapsidado. Finalmente o capsídeo C, o mais produzido, é a forma totalmente madura do capsídeo que permite o empacotamento do DNA e dá origem a novos nucleocapsídeos, os quais receberão o envelope ao serem liberados da célula.

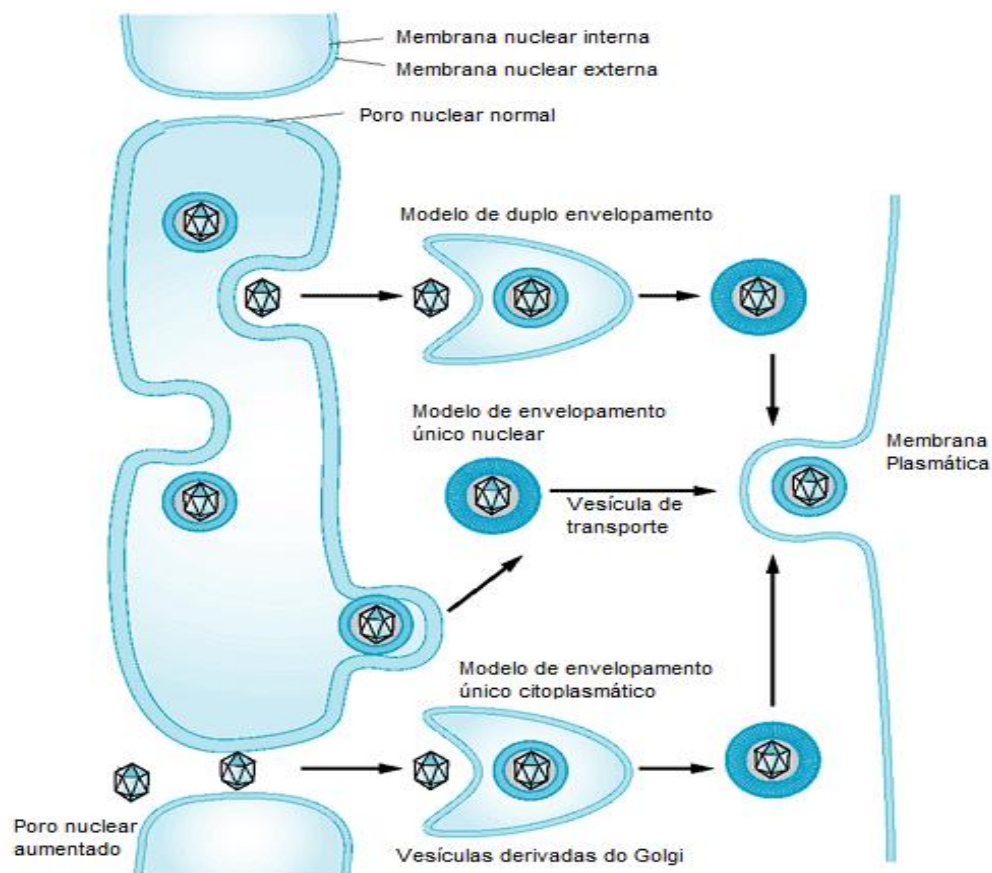


Fonte: adaptado de Cardone et al. (2012).

A transição do nucleocapsídeo no espaço entre a membrana externa do núcleo chegando à membrana citoplasmática ainda não está bem estabelecida. Foram propostas três hipóteses, sendo que a mais recente sugere que o nucleocapsídeo sofre um primeiro envelopamento na lamela interna da membrana nuclear e perde esse envelope na membrana externa do núcleo. Posteriormente, sofre um segundo envelopamento em vesículas da membrana plasmática onde a fusão da vesícula com a membrana plasmática libera os vírions da célula. A segunda hipótese sugere que o nucleocapsídeo adquire o envelope na lamela interna da membrana nuclear e por brotamento da lamela externa é conduzido pelo citoplasma até a membrana citoplasmática onde o vírus é liberado. Por fim, há,

ainda, um terceiro mecanismo em que o nucleocapsídeo sai do núcleo através de poros nucleares aumentados, torna-se envolpado ao passar por vesículas derivadas do Golgi e sai por fusão da membrana da vesícula com a membrana citoplasmática (Figura 6) (WIGG; MIRANDA, 2008).

Figura 6 - Modelos propostos para a saída do HSV da célula hospedeira: Modelo de duplo envelopamento, de envelopamento único nuclear e de envelopamento único citoplasmático.



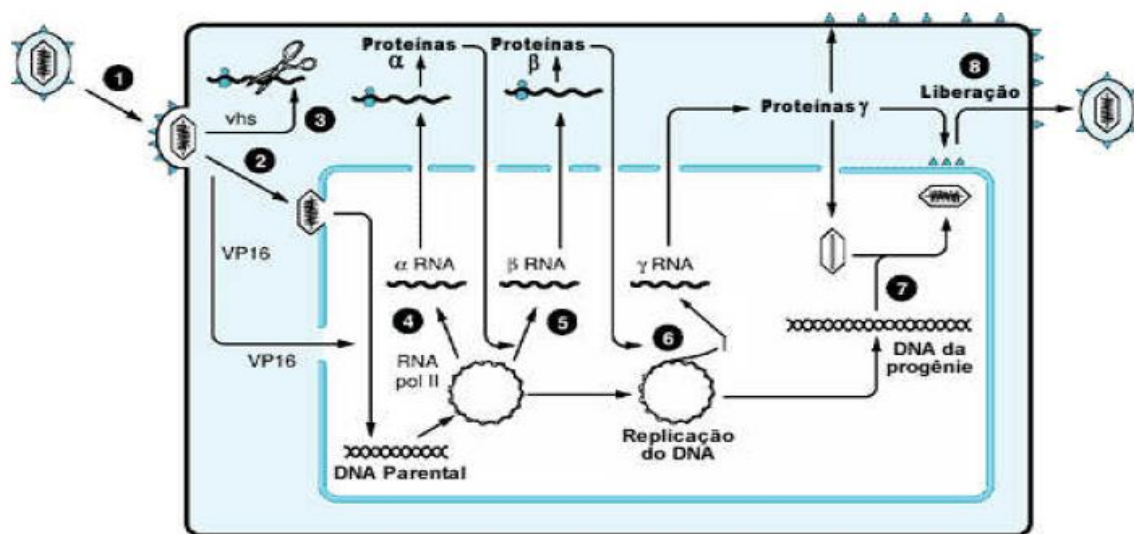
Fonte: adaptado de Roizman, Knipe e Whitley (2007).

Evidências obtidas por Mettenleiter (2006) sugerem que a formação do envelope do HSV é um processo de duplo envelopamento e que a coexpressão de U_L31 e U_L34 é necessária para o posicionamento adequado de ambas as proteínas na membrana nuclear interna para o envelopamento primário. A proteína codificada pelo gene U_L34 provavelmente representa um componente do envelope primário, enquanto que a proteína do gene U_L31 representa um componente do tegumento primário. Após a fusão do envelope primário com a membrana nuclear externa, os nucleocapsídeos são liberados no citoplasma. A seguir, o capsídeo se associa com

várias proteínas do tegumento incluindo a VP16 e a VHS, que parecem interagir para auxiliar no envelopamento.

Após o término da biossíntese, as partículas virais infecciosas podem permanecer associadas à célula dentro de vesículas, onde se espalham para outras células não infectadas ou podem ser liberadas da célula por vesículas exocíticas, que contêm todas as glicoproteínas do envelope do vírion infeccioso, no espaço intercelular. Todo o processo de replicação (Figura 7) demora em torno de 18 a 20 horas e a saída da célula é dependente de gD e gH (WIGG; MIRANDA, 2008).

Figura 7 - Ciclo de multiplicação do HSV. (1) O vírus adsorve e funde-se à membrana celular, liberando o nucleocapsídeo e as proteínas do tegumento no citoplasma da célula; (2) O nucleocapsídeo é transportado, através de microtúbulos do citoesqueleto, para o poro nuclear, onde o DNA viral é liberado; (3) A proteína VHS permanece no citoplasma e degrada o mRNA da célula hospedeira; (4) A proteína VP16 migra para o núcleo, forma um complexo com as proteínas celulares HCF e OCT-1, o qual se liga ao DNA viral e inicia sua transcrição pela RNA polimerase II celular, formando os mRNAs; (5) As proteínas α estimulam a transcrição dos genes β ; (6) As proteínas β estão envolvidas na replicação do DNA viral e estimulam a expressão dos genes γ ; (7) As proteínas γ estão envolvidas na montagem do capsídeo no núcleo e o DNA é encapsidado, formando os nucleocapsídeos; (8) Os nucleocapsídeos são liberados para formar o vírus envelopado.



Fonte: adaptado de Roizman, Knipe e Whitley (2007).

3.1.5 Latência

Na infecção latente, o DNA viral migra para o núcleo dos neurônios e é circularizado pelas enzimas de reparo do DNA, diferentemente da infecção produtiva, que ocorre nas células epiteliais, nas quais o DNA viral permanece linear, através da ação da proteína imediata inicial ICP0, que inibe o mecanismo de reparo do DNA celular, ocorrendo infecção lítica com a expressão dos genes. Além disso, na infecção latente, a ação de VHS não ocorre e a célula continua suas funções. O DNA viral circularizado, na forma episomal, ou seja, não integrado ao DNA celular, se associa a histonas modificadas, principalmente por metilação e acetilação, presentes na cromatina nuclear e que têm um papel importante para regular a expressão dos transcritos associados à latência (LATs - *latency associated transcripts*), constituídos de vários RNAs produzidos por *splicings* (WIGG; MIRANDA, 2008).

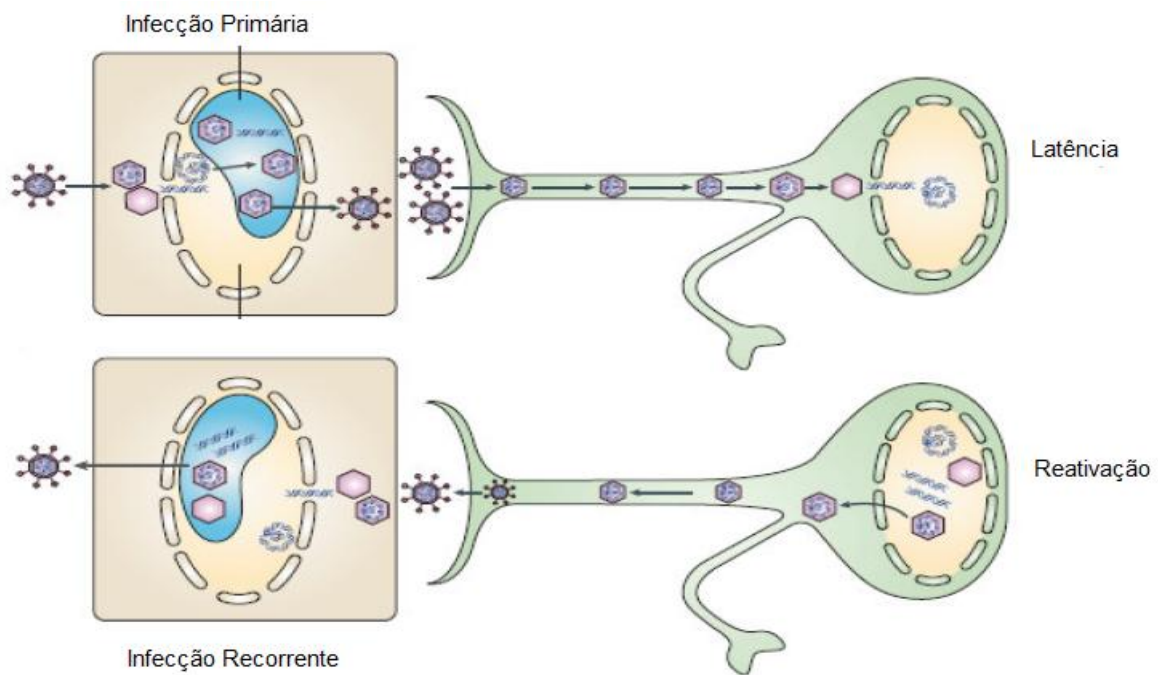
O ciclo de latência é dividido em três estágios: estabelecimento, manutenção e reativação (Figura 8). O estabelecimento da latência inclui a infecção primária, a qual é caracterizada pela replicação viral no sítio de inoculação, seguida pelo transporte axonal retrógrado do vírus ao nódulo sensorial correspondente, dependendo do local de replicação primária do vírus (BERTOL, 2011; FRANCO; ROEHE, 2007). Assim, infecções respiratórias ou orais resultam em colonização dos neurônios sensoriais do trigêmeo com o DNA viral. Os nódulos sacrais são os sítios de predileção para a infecção latente que se segue às infecções genitais (FRANCO; ROEHE, 2007). A infecção poderá seguir duas vias diferentes. Em alguns neurônios, o vírus expressa seus genes, replica-se e causa a morte celular; e em outros, o vírus estabelece uma infecção latente, caracterizada pela transcrição limitada, exceto dos LATs, que são abundantemente expressos neste estágio. A fase de manutenção da latência é o estágio em que o vírus infeccioso não é detectado por procedimentos padrões de isolamento viral (BERTOL, 2011).

O processo de reativação da latência é desencadeado por um estímulo local, tal como injúria ao tecido inervado por neurônios infectados pelo vírus, ou por um estímulo sistêmico como estresse físico ou emocional, febre, exposição à luz ultravioleta, menstruação e desequilíbrio hormonal. Para que a reativação seja efetiva, é necessário que a célula latentemente infectada permita alguma replicação produtiva e o hospedeiro apresente algum grau de imunossupressão. Esse

comprometimento imunológico está relacionado com o estresse físico e psicológico, que são sabidamente fortes indutores da reativação (WIGG; MIRANDA, 2008). Nesse processo, os nucleocapsídeos virais são então levados através do transporte axonal anterógrado para o tecido periférico, usualmente próximo ao local da infecção primária (ROIZMAN, KNIPE, 2001). Dependendo de inúmeros fatores, a reativação pode ser assintomática ou pode levar a uma lesão recorrente local ou sistêmica (CASAGRANDE, 2007). A ocorrência de sinais clínicos associada com a reativação é denominada recrudescência e, geralmente, é caracterizada por sinais mais brandos do que aqueles resultantes da infecção aguda (FRANCO; ROEHE, 2007). As prostaglandinas E e F, que são rapidamente sintetizadas na membrana plasmática em resposta à injúria tissular e são liberadas rapidamente nos espaços extracelulares, têm sido fortemente implicadas na reativação da latência viral. Em células de mamíferos, a interação de um ligante com um receptor da superfície celular leva à ativação da adenilato ciclase, que sintetiza adenosina monofosfato cíclico (AMPc) a partir de adenosina trifosfato (ATP). O AMPc liga-se às subunidades reguladoras de proteíno-cinases dependentes de AMPc, permitindo que as subunidades catalíticas fosforilem outras proteínas e ativem a expressão de genes virais (WIGG; MIRANDA, 2008).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a infecção latente dos neurônios e é possível que não ocorra apenas um modelo, mas a combinação de vários deles. O primeiro seria a repressão da expressão do gene lítico viral por fatores celulares. Parece que o fator celular Oct-2 (octâmero 2) reprime a expressão dos genes α bloqueando a ativação de Oct-1. Outra hipótese seria de que os neurônios não possuiriam fatores celulares essenciais para a expressão dos genes α , provavelmente porque eles não expressam Oct-1. A terceira hipótese estaria relacionada à inibição da expressão dos genes líticos pelos genes LATs que promoveriam a formação de heterocromatina, inibindo os promotores dos genes líticos através de RNAs silenciadores (RNAsi). O último modelo refere-se à inibição da replicação viral pela resposta imunológica do hospedeiro, através das células TCD₈⁺ ou interferon- γ , que poderiam bloquear a expressão de genes virais e a replicação. Além disso, foi demonstrado que a latência ocorre em neurônios dependentes do fator de crescimento do nervo (*nerve growth factor*-NGF), porque quando esses neurônios são privados de NGF ocorre uma rápida expressão de vírus (WIGG; MIRANDA, 2008).

Figura 8 - Etapas da infecção e latência do HSV. A infecção das células epiteliais dá origem a uma infecção primária. Os vírus invadem os neurônios e o nucleocapsídeo é transportado através do neurônio até o núcleo, onde o DNA viral é liberado e circularizado e os genes associados à latência são expressos. Após a reativação, a expressão dos genes de infecção lítica se inicia e, os nucleocapsídeos são transportados para a porção terminal do neurônio. As partículas virais infecciosas são liberadas a partir do axônio e infectam novamente células epiteliais, resultando na infecção recorrente.



Fonte: adaptado de Knipe e Cliffe (2008).

3.1.6 Patogênese da Infecção pelo HSV

O HSV é transmitido por contato direto de uma pessoa suscetível com uma pessoa que está excretando o vírus e, entra através da superfície da mucosa ou solução de continuidade da pele, dando início a infecção (BUTEL, 2012a). Em geral, as infecções por HSV-1, limitam-se à orofaringe e os vírus são transmitidos pela saliva ou por gotículas respiratórias, sendo que a transmissão mais frequente se dá pelo beijo. O HSV-2 é geralmente transmitido através da atividade sexual (WIGG; MIRANDA, 2008).

Como já foi mencionado, com a replicação do vírus no sítio de entrada, o vírion intacto ou seu nucleocapsídeo são transportados pelos axônios dos nervos sensoriais para a raiz do nódulo, através de um fluxo retrógrado, onde a latência é estabelecida, preferencialmente nas raízes dorsossacrais para o HSV-2 e no trigêmeo para o HSV-1 (VERONESI; FOCACCIA, 2005; WIGG; MIRANDA, 2008). Durante o período de latência, o vírus não é transmissível. No entanto, algumas vezes, as partículas virais começam a se replicar, não causam sintomas, mas são transmitidas (*shedding*) a outra pessoa suscetível à infecção (WIGG; MIRANDA, 2008). As recorrências ocorrem quando o vírus latente é reativado, sendo transportado por fluxo axonal anterógrado até a região da infecção primária (ZOLINI, 2012). Normalmente a infecção primária costuma ser mais invasiva que a recorrente, devido à falta de imunidade celular e humoral do hospedeiro (WIGG; MIRANDA, 2008). Algumas evidências clínicas de doença generalizada são encontradas acometendo neonatos, gestantes e pacientes imunossuprimidos. Portanto, o envolvimento disseminado dos órgãos parece ser consequência da viremia em hospedeiros incapazes de limitar a replicação do vírus em superfícies mucosas (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007).

Finalmente, as células infectadas sofrem severas alterações estruturais e bioquímicas que ocorrem em consequência da replicação viral. Entre as alterações estruturais, há alterações na cromatina celular, duplicação e dobramento de membranas celulares, fragmentação e dispersão das membranas do complexo de Golgi, inserção de proteínas virais em membranas celulares, rearranjo da rede de microtúbulos e formação de corpúsculos de inclusão intranucleares. Além disso, entre as alterações bioquímicas celulares estão o bloqueio da síntese de proteínas, a degradação de mRNAs, o bloqueio da transcrição e redução da síntese de RNA, a inibição do processamento de mRNA e a degradação seletiva de proteínas celulares (FRANCO; ROEHE, 2007).

3.1.6.1 Efeitos do HSV na resposta imunológica

Assim como muitos outros vírus, o HSV evoluiu vários mecanismos moleculares para escapar das respostas protetoras do hospedeiro. O vírus bloqueia a inibição da síntese proteica viral induzida por interferon e codifica uma proteína (ICP47) para bloquear o canal transportador de antígeno. Assim, ele impede a

introdução de peptídeos no retículo endoplasmático, o que bloqueia sua associação a moléculas do MHC de classe I e o reconhecimento das células infectadas por células TCD₈⁺ (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009; WAKIMOTO et al., 2003). Além disso, a proteína ICP22 inibe a capacidade das células B de apresentarem antígenos através do MHC de classe II a linfócitos TCD₄⁺ (WIGG; MIRANDA, 2008).

O HSV também possui a capacidade de espalhamento célula-célula, que é rápida e eficiente. Essa disseminação em tecidos epiteliais envolve o movimento de partículas virais através de junções celulares, em um espaço que é resistente aos efeitos dos anticorpos. Um heterodímero de duas glicoproteínas de membrana, gE/gI, e gM, em células polarizadas, são os responsáveis pela interação com os receptores nas junções intercelulares mediando o espalhamento célula-célula (JOHNSON et al., 2001; WIGG; MIRANDA, 2008).

O vírion e as células infectadas pelo vírus expressam receptores de anticorpos e complemento, que enfraquecem essas defesas humorais (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). A participação de glicoproteínas virais interferindo na resposta imunológica, por exemplo, tem sido descrita. A gC liga-se no componente C3b do complemento e impede a ativação das vias do complemento e a neutralização dos vírions, mediada pelo complemento, por anticorpos IgM. Portanto, a gC também pode reduzir a indução da resposta humoral contra o HSV por ligação a C3b. Além disso, o complexo formado pelas glicoproteínas gE e gI tem alta afinidade pela fração Fc da IgG, o que resulta no bloqueio da capacidade dos anticorpos de neutralizarem a infecciosidade dos vírus. Esse complexo receptor para Fc também bloqueia a citotoxicidade mediada por anticorpos e a fagocitose (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007; WIGG; MIRANDA, 2008). Por fim, a infecção por HSV também reduz a maturação de células dendríticas e a expressão de moléculas coestimuladoras (KOELLE; COREY, 2003).

3.1.7 Manifestações Clínicas

3.1.7.1 Reativação da infecção

A reativação da infecção orofacial, e também genital, é pré-anunciada por um período prodrômico, no qual o paciente sente dor, queimação, coceira ou formigamento. Podem ocorrer febre, dor de cabeça, cansaço e linfadenopatia. Em 2

a 5 dias o paciente nota a formação de vesículas na borda dos lábios (no herpes orofacial) ou na região anogenital. Essas vesículas ficam agrupadas e apresentam um líquido claro, contendo grande quantidade de vírus. Após 5-12 dias, as vesículas se rompem, liberando as partículas virais infecciosas, que podem ser transmitidas a outro indivíduo não imune. Por fim, as vesículas se transformam em crostas e se inicia o processo de cicatrização (WIGG; MIRANDA, 2008).

3.1.7.2 Infecção congênita ou neonatal

A infecção por HSV no neonato é uma doença devastadora e frequentemente fatal. Pode ser adquirida na vida intrauterina ou durante a passagem do bebê pelo canal vaginal, devido à liberação do herpesvírus pela mãe no momento do parto ou ainda no pós-natal, a partir de membros da família ou profissionais do hospital (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). Crianças que adquirem o HSV no útero normalmente apresentam uma tríade de achados clínicos que consiste em: danos neurológicos, lesões oculares e manifestações cutâneas (KIMBERLIN, 2003). Já os lactentes com herpes neonatal exibem três tipos de doença: lesões localizadas na pele, nos olhos e na boca, encefalite com ou sem envolvimento cutâneo localizado e doença disseminada que acomete vários órgãos como cérebro, pulmões, fígado, glândulas adrenais, pele, olhos e/ou boca (BUTEL, 2012a; WIGG; MIRANDA, 2008).

Alguns fatores que influenciam na transmissão do vírus da mãe para o recém-nascido são: o tipo de infecção materna, a prevalência de anticorpos maternos do tipo IgG que atravessam a placenta, protegendo o bebê de uma exposição inadvertida, o tempo de ruptura da membrana amniótica até o nascimento da criança, que a expõe à infecção, por ascensão do vírus pela cérvix e a intervenção médica durante seu nascimento (KIMBERLIN, 2003; WIGG; MIRANDA, 2008). O maior risco para o bebê ocorre quando a mãe tem uma infecção assintomática no momento do parto por ter adquirido o vírus no final da gestação. Em tais casos, entre 30 a 50% dos recém-natos tornam-se infectados. O herpes recorrente ou uma infecção primária adquirida no início da gestação tem menor risco para a criança (menos de 1%) (WIGG; MIRANDA, 2008).

As gestantes infectadas por HSV podem ser tratadas com aciclovir ou valaciclovir e são orientadas a começar a medicação no último trimestre da gravidez, ingerindo uma dose diária. Se houver suspeita de infecção do recém-nato, o aciclovir

é o agente de escolha, porém é necessária uma terapia administrada por via endovenosa (WIGG; MIRANDA, 2008). Além disso, qualquer neonato com risco de transmissão deve ser mantido isolado dos demais. (VERONESI; FOCACCIA, 2005).

3.1.7.3 Ceratoconjuntivite

A ceratite (inflamação da córnea) causa dor repentina, visão embaçada e lesão na córnea. O olho pode inchar e a infecção pode levar de duas a três semanas para regredir. Está associada à conjuntivite uni ou bilateral, seguida de adenopatia, fotofobia, lacrimejamento, edema e lesões dendríticas da córnea. A ceratite estromal pode ocorrer, mas não é frequente. Nesse caso, camadas profundas da córnea estão envolvidas (WIGG; MIRANDA, 2008). A patogênese da ceratite herpética estromal permanece pouco compreendida, mas ocorre provavelmente devido à reação inflamatória crônica iniciada pela infecção por HSV e sustentada pela reatividade aos antígenos oculares (ARDUINO; PORTER, 2008). As lesões oculares recorrentes são comuns e dependendo do número de recorrências, ocorre a formação de cicatrizes, que com o tempo podem levar à perda da visão (WIGG; MIRANDA, 2008).

3.1.7.4 Infecção da orofaringe

Geralmente, na infecção primária por HSV-1, ocorre o acometimento da orofaringe. No curso da infecção primária, existe grande diversidade de sintomas, que varia desde totalmente assintomática até quadros combinados de febre, úlceras na garganta, lesões vesiculares e ulcerativas, gengivoestomatite, edema, linfadenopatia localizada, anorexia e dor (WIGG; MIRANDA, 2008). A doença sintomática ocorre com maior frequência em crianças pequenas (1 a 5 anos). O período de incubação é curto (cerca de 3 a 5 dias, com variação de 2 a 12 dias) e a doença clínica dura 2 a 3 semanas (BUTEL, 2012a).

A gengivoestomatite pela infecção primária por HSV-1 geralmente surge em crianças e adultos jovens. Em média, o início da gengivoestomatite primária tem dois picos relacionados com a idade. Em primeiro lugar, durante a infância, geralmente entre 6 meses e 5 anos de idade, e em segundo lugar, aos vinte e poucos anos. A maioria das infecções primárias por HSV em crianças é assintomática ou tão leve

que o filho ou os pais não percebem a doença. Sugere-se que apenas 10-12% das crianças que estão infectadas tem sinais ou sintomas graves o suficiente para serem recordados pelo filho ou pelos pais (ARDUINO; PORTER, 2008).

Os casos sintomáticos geralmente afetam a língua, lábios, gengiva, mucosa da boca e palatos duro e mole. As lesões da mucosa oral apresentam-se como bolhas de 1-2 mm que rapidamente se aglutinam para formar úlceras superficiais, pequenas, dolorosas e geralmente irregulares, cobertas por uma pseudomembrana cinza-amarelada e rodeadas por um halo eritematoso. As úlceras curam gradualmente em 10-14 dias, sem cicatrizes (ARDUINO; PORTER, 2008). As crianças apresentam dificuldade para engolir alimentos e água devido à dor e à inflamação presentes na mucosa oral, podendo, desse modo, surgir um quadro de desidratação (SIMMONS, 2002; WIGG; MIRANDA, 2008).

3.1.7.5 Infecção genital

A maioria dos casos de herpes genital é causada pelo HSV-2, embora a prevalência do HSV-1 esteja em ascensão, principalmente na população jovem e devido à prática de sexo oral (PENELLO et al., 2010). No herpes genital ocorre formação de vesículas ulcerativas no pênis do homem e no colo uterino, vulva, vagina ou períneo da mulher (BUTEL, 2012a). As lesões duram aproximadamente três semanas, caracterizando-se pela excreção de grandes quantidades de vírus (10^6 partículas/0,2 mL) (WIGG; MIRANDA, 2008). Em pacientes de ambos os sexos, a infecção primária pode ser acompanhada por febre, mal estar e mialgia que são sintomas relacionados a uma viremia transitória (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). As complicações incluem lesões extragenitais (cerca de 20% dos casos) e meningite asséptica (cerca de 10% dos casos). As recidivas das infecções herpéticas genitais são comuns e tendem a ser leves. Independentemente de a recidiva ser sintomática ou assintomática, o indivíduo que elimina o vírus pode transmitir a infecção a seus parceiros sexuais (BUTEL, 2012a).

3.1.7.6 Encefalite

A doença está associada a uma elevada taxa de mortalidade e os sobreviventes frequentemente apresentam sequelas neurológicas (BUTEL, 2012a). As manifestações clínicas, em adultos e crianças mais velhas, variam desde encefalite focal, com febre, até alteração de consciência, comportamento bizarro, desordem mental e alterações neurológicas (WIGG; MIRANDA, 2008). A patologia e a imunopatologia virais causam a destruição do lobo temporal, resultando em eritrócitos no líquido cefalorraquidiano (LCR), convulsões, entre outras anormalidades (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). Algumas complicações vasculares cerebrais, incluindo edema cerebral, aumento da pressão intracraniana e hemorragia contribuem para a elevada taxa de mortalidade e morbidade. A encefalite por HSV normalmente responde bem à terapia de corticosteroides seguida por terapia antiviral (ARDUINO; PORTER, 2008).

3.1.7.7 Infecções cutâneas

A paroníquia por HSV é uma infecção do dedo e o herpes gladiatorum uma infecção do corpo. O vírus estabelece a infecção através de cortes ou abrasões na pele (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). A paroníquia apresenta-se com características prodrômicas de dor local, formigamento ou sensação de queimadura, seguida por uma erupção vesicular, atingindo a falange distal de um ou mais dedos. Em crianças, normalmente ocorre através de autoinoculação a partir de estomatite herpética, herpes labial ou, raramente, genital. Em contraste, a maioria dos adultos é infectada com HSV-2 e tem uma história de herpes genital. A infecção dos dedos é um risco ocupacional para dentistas, médicos ou pessoal paramédico que descuidam na utilização de luvas. A infecção pode ser resultante do contato com lesões de regiões orais e periorais ou do contato com pacientes assintomáticos (*shedding*) (ARDUINO; PORTER, 2008).

Já o herpes gladiatorum é frequentemente adquirido durante a prática de lutas ou rúgbi (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). As recorrências são frequentes e, particularmente, atingem a face, o pescoço e as orelhas. O uso profilático de valaciclovir durante a época desportiva tem sido útil em tais casos (SIMMONS, 2002). Outra lesão de pele que raramente pode ocorrer é o eritema

multiforme, que se caracteriza por erupções irregulares e circulares na parte de trás dos braços e dorso das mãos e que pode se manifestar após a recorrência de uma infecção por HSV (WIGG; MIRANDA, 2008). Além disso, o eczema, também conhecido como erupção variceliforme de Kaposi, surge geralmente em pacientes que apresentam problemas dermatológicos pré-existentes, como por exemplo, dermatite atópica e, também, em pacientes imunossuprimidos. Quando não tratada, essa patologia pode ser extremamente grave progredindo para a infecção disseminada ou morte (LIAW et al., 2012; WIGG; MIRANDA, 2008). Essa disseminação da infecção pode ocorrer ao longo da pele e potencialmente, atingir as glândulas adrenais, fígado e outros órgãos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). A infecção bacteriana e bacteremia são geralmente as complicações que provocam mortalidade (LIAW et al., 2012).

3.1.7.8 Infecções em pacientes imunossuprimidos

Pacientes que possuem o sistema imunológico comprometido por desnutrição, por uso de terapia imunossupressora ou por doenças que atingem o sistema imunológico são alvos de infecção de alto risco (WIGG; MIRANDA, 2008). As lesões podem se disseminar e afetar o trato respiratório, o esôfago e a mucosa intestinal (BUTEL, 2012a). Além disso, em pacientes imunossuprimidos, as lesões são muito mais invasivas e dolorosas e o vírus pode facilmente atingir a circulação sanguínea, resultando em um mau prognóstico (WIGG; MIRANDA, 2008).

3.1.8 Diagnóstico Laboratorial

Embora os médicos identifiquem facilmente a forma recorrente da infecção pelo tipo de lesão e histórico da doença, nas infecções primárias, nas manifestações clínicas atípicas e nas reativações assintomáticas (*shedding*) é necessário que se faça o diagnóstico laboratorial da infecção. Além disso, o resultado do diagnóstico deve ser usado juntamente com a avaliação clínica do paciente (WIGG; MIRANDA, 2008).

3.1.8.1 Isolamento do vírus em culturas de células

O isolamento do vírus é o ensaio mais definitivo para o diagnóstico de infecção por HSV. O vírus pode ser obtido a partir de vesículas, mas não de lesões crostosas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). Realiza-se uma escarificação das vesículas com um *swab* ou a retirada do líquido da vesícula. O isolamento viral geralmente é feito a partir da inoculação em cultura de células e o resultado pode variar dependendo da linhagem celular utilizada e da quantidade de vírus infeccioso presente, em geral o efeito citopático é visível após 2-3 dias de cultivo (SINGH et al., 2005; WIGG; MIRANDA, 2008). As células infectadas tornam-se aumentadas e de aparência globosa e alguns isolados induzem a fusão entre células vizinhas, gerando células gigantes multinucleadas (sincícios) (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). O teste tem 100% de especificidade para o HSV-1 e o HSV-2, porém a sensibilidade depende do estágio da lesão e também varia de 75% para as infecções primárias a 50% para as lesões recorrentes (SINGH et al., 2005).

3.1.8.2 Microscopia eletrônica

O exame direto do líquido das vesículas ou outro material clínico por microscopia eletrônica para o diagnóstico de HSV é limitado porque esse vírus e os demais herpesvírus são morfologicamente indistinguíveis (SINGH et al., 2005). Apesar de ser um método rápido, tem sido menos utilizado por apresentar baixa sensibilidade e especificidade e devido ao alto custo do equipamento (VERONESI; FOCACCIA, 2005).

3.1.8.3 Detecção do DNA viral

A reação em cadeia da polimerase (PCR) pode ser usada para a detecção viral, pois é um ensaio sensível e específico (BUTEL, 2012a). O uso da PCR para amplificar o DNA do HSV em fluido cerebrospinal é mais rápido e mais sensível que a cultura de células, sendo o teste de escolha para detectar encefalite herpética (BRADY; BERNSTEIN, 2004). Além disso, a PCR de material proveniente direto da lesão é utilizada se houver pouca quantidade de vírus no material clínico ou para diferenciar amostras virais. Já quando ocorre o *shedding* viral, a PCR pode ser

utilizada para demonstrar a presença do vírus sem a manifestação dos sintomas (WIGG; MIRANDA, 2008).

3.1.8.4 Testes sorológicos

A maioria dos testes disponíveis é tipo inespecífico, simplesmente fornecendo uma evidência de exposição prévia ao antígeno do HSV. Porém o advento da sorologia tipo específica revolucionou o entendimento sobre a epidemiologia e a variação das manifestações clínicas da infecção pelo HSV. São duas as técnicas principais: o teste de ELISA que detecta anticorpos contra a gG do envelope viral, altamente específica para o HSV-1 (gG1-238 aminoácidos) e para o HSV-2 (gG2-699 aminoácidos) e o *western blot* (WB) (LEGOFF; PÉRÉ; BÉLEC, 2014; VERONESI; FOCACCIA, 2005). O WB é um teste que apresenta alta sensibilidade e capacidade de discriminação entre os anticorpos contra HSV-1 e HSV-2 (SINGH et al., 2005). No entanto, é um método caro e de execução mais lenta (VERONESI; FOCACCIA, 2005). O antígeno viral também pode ser facilmente detectado através de imunofluorescência, usando anticorpos monoclonais específicos marcados com fluoresceína (LEGOFF; PÉRÉ; BÉLEC, 2014).

3.1.9 Epidemiologia

O HSV-1 e o HSV-2 estão distribuídos em todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento, incluindo tribos indígenas no Brasil, quanto em países mais desenvolvidos, com uma estimativa de 60-95% da população adulta sendo infectada por esses vírus (BRADY; BERNSTEIN, 2004; WIGG; MIRANDA, 2008). A soroprevalência em adultos varia de 80-90% para o HSV-1 e 10-25% para o HSV-2 (REIL et al., 2008). Segundo pesquisas epidemiológicas da Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 536 milhões de pessoas no mundo possuem anticorpos contra o HSV (LOOKER; GARNETT; SCHMID, 2008). Nos países desenvolvidos, os indivíduos de classe média desenvolvem anticorpos mais tarde que os de populações socioeconômicas menos favorecidas, o que, presumivelmente, reflete condições de vida em maiores aglomerações e padrões de higiene mais precários nos grupos socioeconômicos mais baixos (BUTEL, 2012a). Estudos sugerem que por volta dos 5 anos mais de um terço das crianças em áreas pobres esteja

infectado com o HSV-1, comparado com 20% de infecção em áreas com melhores condições socioeconômicas. No entanto, 60% dessa população mais privilegiada chega aos 30 anos infectada. Após os 40 anos de idade não há diferenças no número de pessoas infectadas em função das condições socioeconômicas (WHITLEY; ROIZMAN, 2001; WIGG; MIRANDA, 2008).

O HSV-1 se propaga por contato direto com a saliva infectada ou por meio de utensílios contaminados pela saliva de um indivíduo que esteja eliminando o vírus. A fonte de infecção em crianças geralmente é proveniente de um adulto com lesão por HSV sintomática ou disseminação viral assintomática na saliva (BUTEL, 2012a). A frequência de recorrência por HSV-1 é relativamente constante, aproximadamente 33%, segundo Roizman, Knipe e Whitley (2007). A maior parte dos casos de herpes genital é causada pelo HSV-2, embora o HSV-1 seja responsável por cerca da metade dos novos casos nos países desenvolvidos (GUPTA; WARREN; WALD, 2007). As infecções genitais por HSV-1 são geralmente menos graves e menos propensas à reincidência do que as causadas pelo HSV-2 (WHITLEY; ROIZMAN, 2001). A infecção prévia pelo HSV-1 atua como fator protetor, provavelmente devido à imunidade cruzada, reduzindo a incidência de HSV-2 (PENELLO et al., 2010).

O número de novos casos de infecções genitais por HSV-2, nos Estados Unidos, foi estimado em 776.000 indivíduos, totalizando cerca de 24 milhões de infectados a cada ano (CDC, 2013). A frequência das recorrências varia um pouco entre homens e mulheres, com cálculo de 2.7 e 1.9 por 100 pacientes-dia, respectivamente. Em termos gerais, cerca de 90% dos pacientes infectados com HSV-2 terão uma ou mais recorrências por ano, 38% mais do que seis repetições, e 20% mais do que dez recidivas (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007).

O HSV-2 é adquirido como doença sexualmente transmissível, de modo que os anticorpos são raramente encontrados antes da puberdade. Estudos têm estimado que a transmissão de herpes genital em cerca de 50% dos casos resulta de contato sexual na ausência de lesões ou sintomas e mostram que apenas 10-25% das pessoas com anticorpos anti-HSV-2 estão conscientes da sua infecção e da capacidade de transmitir o vírus para pacientes suscetíveis (BUTEL, 2012a). Muitos são os fatores de risco descritos na aquisição do HSV-2, entre eles estão: iniciação sexual precoce, história prévia de doença sexualmente transmissível, número de abortos provocados e multiplicidade de parceiros sexuais (PENELLO et

al., 2010). Os pesquisadores Veronesi e Focaccia (2005) acrescentam, ainda, entre os fatores de risco: sexo feminino, nível educacional mais baixo, idade avançada e raça negra ou hispânica.

A maior prevalência de anticorpos para o HSV-2, nos Estados Unidos, foi identificada em prostitutas (75%) e homossexuais do sexo masculino (83%). Para as mulheres heterossexuais que vivem nos Estados Unidos com um parceiro, a probabilidade de aquisição do HSV-2 é inferior a 10% e aumenta para 40%, 62%, e acima de 80% de acordo com o número de parceiros sexuais durante a vida: de 2 a 10, de 11 a 50, ou maior do que 50, respectivamente. Para os homens heterossexuais, a probabilidade é de 20%, 35% e 70% para cada um dos seguintes grupos de risco e para os homens homossexuais, a soroprevalência aumenta para mais que 60% a 90% para aqueles com 11 a 50 e mais de 50 parceiros. Assim, a multiplicidade de parceiros sexuais, independentemente da preferência sexual, se correlaciona diretamente com a infecção pelo HSV-2 (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007).

Esta infecção aumenta o risco de aquisição do vírus da imunodeficiência humana (HIV), em cerca de três vezes, independente do gênero. A transmissão do HIV também parece ser aumentada pela infecção por HSV-2 (GUPTA; WARREN; WALD, 2007). Isto se deve ao fato de que a infecção lítica pelo HSV-2 na mucosa genital gera uma ruptura da barreira epitelial, deflagrando um processo inflamatório que recruta células linfocitárias efectoras, suscetíveis à infecção pelo HIV. Além disso, a infecção lítica ou persistente pelo HSV-1 ou HSV-2 estimula a replicação do HIV, aumentando a transcrição e a tradução de proteínas desse vírus, com consequente aumento da liberação de partículas virais no plasma e favorecimento da progressão para a AIDS (WIGG; MIRANDA, 2008). Uma análise soropidemiológica realizada no Brasil com 100 pacientes HIV positivos demonstrou uma prevalência de 73% para o HSV-2 (PENELLO et al., 2010).

Nos Estados Unidos, aproximadamente 1 de 1000 nascidos vivos (2500 a 4000 por ano) está infectado com o HSV. Nas mulheres grávidas que apresentam infecção disseminada por HSV, a taxa de mortalidade entre elas é relatada como sendo maior que 50%. As mortes fetais também têm ocorrido em mais de 50% dos casos, embora a mortalidade não se correlacione necessariamente com a morte da mãe. Por fim, os Centros para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estimam uma incidência aproximada de encefalite por HSV de 40 a 50 casos por ano, no

entanto, a ocorrência da doença é, sem dúvida, superior (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007).

3.1.10 Vacinas

As vacinas contra o HSV ainda não são uma realidade disponível para o uso clínico rotineiro, mas seu estudo tem contribuído de forma decisiva para o surgimento de novas tecnologias em imunoprofilaxia. Em 1938, o pesquisador Frank tentou efetuar a imunização com o HSV inativado em formalina, observando resultados discretos. Muita discussão acompanhou as avaliações epidemiológicas envolvendo a vacina anti-HSV-1 com vírus inativado pelo calor, a chamada vacina Lupidon (LUPI, 2003). Estas vacinas de vírus inativado foram utilizadas em uma variedade de sistemas de modelos animais, frequentemente, com bons resultados. No entanto, quando elas foram administradas a pacientes com infecção pré-existente por HSV a fim de reduzir a frequência das recorrências, a maioria dos estudos, não incluiu um adequado grupo controle (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007).

Além disso, numerosos investigadores tentaram alterar o padrão de recorrências da infecção por meio da inoculação de vírus selvagem, porém isto conduziu a infecção no local da injeção em até 40% a 80% dos voluntários. Infelizmente, a eficácia foi relatada em um número limitado de pacientes. Várias outras abordagens de vacinas têm sido testadas, incluindo mutantes do HSV, herpesvírus heterólogos ou não humanos, antígenos do HSV expressos em vetores vivos/não-HSV e vírus geneticamente modificado (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007; VERONESI; FOCACCIA, 2005).

A vacina DISC (*disabled infectious single cycle*) foi desenvolvida com partículas infecciosas incapacitadas para mais de um ciclo replicativo. Uma cepa do HSV foi modificada, por meio de enzimas de restrição Bam H1 e Not I, de forma a deletar a sequência genômica codificadora da gH. Em suma, é um vírus não patogênico, mas capaz de induzir resposta imunológica celular e humoral exatamente como o vírus selvagem sem os riscos incluídos neste último. Animais vacinados com a DISC mostraram proteção estatisticamente significativa contra a primoinfecção por HSV-1 e os quadros de recorrência (LUPI, 2003).

As subunidades vacinais também são possíveis candidatas, pois as glicoproteínas gB e gD do HSV são fundamentais na estimulação da imunidade celular específica, ativando a população de linfócitos citotóxicos. Uma vacinação em cobaias soronegativas para o HSV-1, com um concentrado de glicoproteínas virais, sensibilizou os linfócitos T a reconhecerem a gB e a gD e apresentou ação profilática contra a infecção por HSV (LUPI, 2003). Os problemas que ainda impedem o desenvolvimento de uma vacina contra o HSV são: a imunidade devido à infecção natural por um determinado tipo de HSV não previne a infecção primária, as recorrências ou a latência por outro tipo de HSV; a incerteza sobre a proteína do HSV antigênica, *in vivo* e; a inexistência de um modelo, *in vitro*, de latência viral (VERONESI; FOCACCIA, 2005).

3.1.11 Agentes Anti-Herpesvírus

A busca por drogas antivirais teve início há sessenta anos, com a descoberta de Bauer, em 1955, de que as tiossemicarbazonas eram capazes de inibir o vírus da vacínia. Posteriormente, ele demonstrou que a N-metil-isatin tiossemicarbazona (metisazona) era eficaz na prevenção da varíola, tendo sido usada com êxito em epidemias do passado, apesar de seus efeitos colaterais. Embora alguns antibióticos já estivessem disponíveis na década de 1940, o primeiro agente antiviral só foi licenciado na década de 1960 (WIGG, 2008).

As experiências vinculadas ao desenvolvimento de agentes antivirais deram margem a percepções gerais úteis com implicações práticas:

a) Apesar de muitos compostos evidenciarem atividade antiviral *in vitro*, a maioria afeta alguma função da célula hospedeira e se associa a uma toxicidade inaceitável em seres humanos;

b) Os agentes eficazes tipicamente têm uma gama restrita de atividade antiviral e têm como alvo uma proteína viral específica, muito frequentemente uma enzima envolvida na síntese dos ácidos nucleicos virais;

c) Alterações em nucleotídeos únicos que conduzam a substituições de aminoácidos críticos em uma proteína-alvo costumam ser suficientes para originar resistência aos fármacos antivirais;

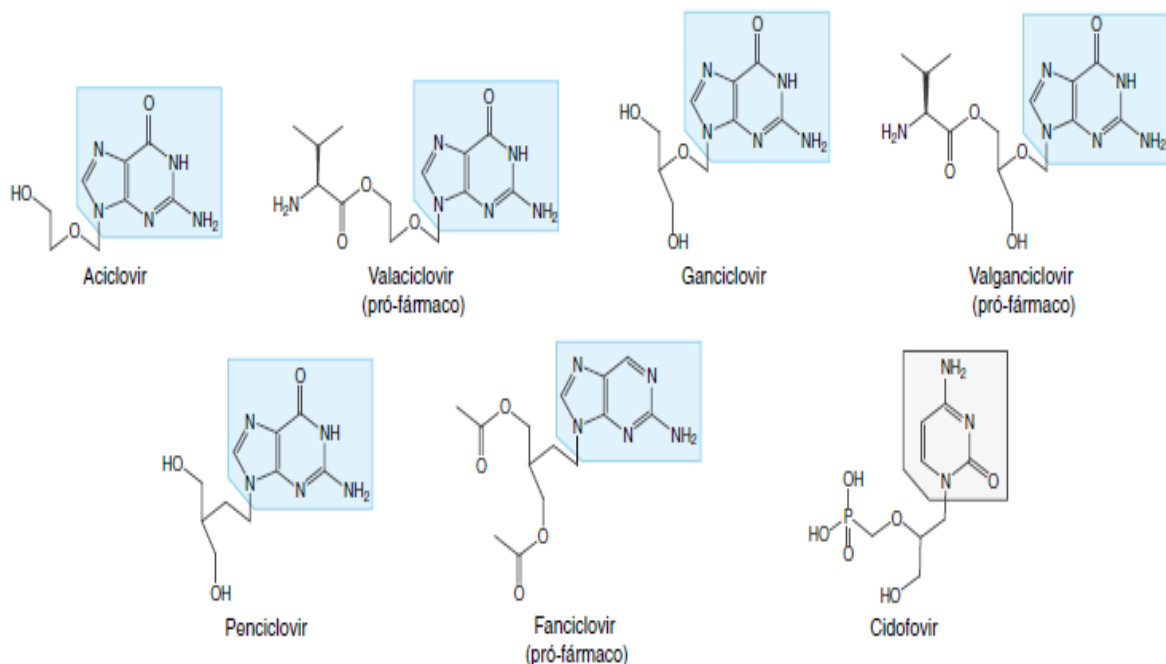
d) Os agentes antivirais inibem a replicação ativa de tal forma que o crescimento viral pode ser retomado após a suspensão do fármaco;

e) Os agentes atuais não eliminam o vírus latente ou que não esteja em fase de replicação, apesar de alguns fármacos terem sido utilizados com sucesso para suprimir cronicamente a reativação da doença. A eficácia clínica depende do fato de serem alcançadas concentrações inibitórias no local da infecção, em geral no interior das células infectadas e;

f) Os resultados dos testes de sensibilidade, *in vitro*, para agentes antivirais dependem do sistema de avaliação, do tipo celular, do inóculo viral e do laboratório (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

Na figura 9 estão representadas as estruturas químicas de alguns antivirais disponíveis.

Figura 9 - Estrutura de alguns análogos de nucleosídeos e nucleotídeos anti-herpesvírus



Fonte: Yeh e Coen (2009).

3.1.11.1 Iododesoxiuridina

A iododesoxiuridina (5-iodo-2-desoxiuridina), ou IDU, é um análogo iodado da timidina, que inibe a replicação, *in vitro*, de diversos vírus de DNA, inclusive dos herpesvírus e dos poxvírus (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). Seu mecanismo de ação ocorre pela incorporação da forma trifosfatada no DNA viral com conseqüente inibição da replicação viral pela incorporação de um análogo que

não é o substrato natural (WIGG, 2008). A IDU não é seletiva, por ser fosforilada por enzimas celulares e concentrações baixas do fármaco inibem o crescimento de células não infectadas, comprometendo o DNA celular. Sendo assim, ela é muito tóxica para ser administrada por outra via que não seja a tópica. Portanto, pode ser usada sob a forma de pomada oftálmica ou colírio (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; WIGG, 2008).

3.1.11.2 Trifluridina

A trifluridina (5-trifluorometil-2-desoxiuridina) é o nucleosídeo de pirimidina fluorado. O composto possui atividade, *in vitro*, contra o HSV-1, o HSV-2, vacínia e alguns adenovírus (SAFRIN, 2010). A ativação da trifluridina exige, inicialmente, a sua conversão na forma 5'-monofosfato por enzimas celulares e depois é convertida a sua forma trifosfatada. (DYKE; WOODFORK, 2011). Não é seletiva, por ser fosforilada apenas por enzimas celulares, e dessa forma, compromete também o DNA celular, sendo, assim como a IDU, muito tóxica para ser administrada por outra via além da tópica (WIGG, 2008). O monofosfato de trifluridina inibe a conversão do monofosfato de desoxiuridina (dUMP) em monofosfato de desoxitimidina (dTMP) pela timidilato sintetase. Além disso, a forma trifosfatada compete com o trifosfato de desoxitimidina (dTTP) pela sua incorporação por DNA polimerases tanto virais quanto celulares. Foi constatado que os mutantes resistentes à trifluridina apresentam alterações na especificidade da timidilato sintetase (DYKE; WOODFORK, 2011).

3.1.11.3 Vidarabina

A vidarabina (9-β-D-arabinofuranosiladenina) é um análogo da adenosina em que a ribose é substituída pela arabinose (WIGG, 2008). Possui atividade contra HSV-1, HSV-2, VZV, CMV, vírus da hepatite B, poxvírus, hepadnavírus, rabdovírus e certos vírus tumorais de RNA (DYKE; WOODFORK, 2011). A vidarabina passa à forma trifosfato por meio de enzimas celulares. Assim, atua como um substrato para a polimerase viral competindo com a desoxiadenosina trifosfato (dATP), que deveria ser incorporada na fita que está sendo sintetizada (WIGG, 2008). *In vivo*, a vidarabina é rapidamente metabolizada à hipoxantina arabinosídeo através da

remoção do grupo 6-amino pela adenosina desaminase, resultando em acentuada redução da atividade antiviral. Essa instabilidade, bem como a toxicidade excessiva do fármaco, limitou sua utilização clínica (SAFRIN, 2010). Além da toxicidade, sua baixa solubilidade em soluções fisiológicas obriga à administração por infusão lenta com grandes volumes de líquido. Como a vidarabina não necessita da timidino cinase para ser fosforilada, isso a torna eficaz em casos de resistência aos demais antivirais, como o aciclovir (WIGG, 2008). A resistência ocorre em consequência de mutações da DNA polimerase (DYKE; WOODFORK, 2011). A vidarabina na forma de pomada a 3% constitui um tratamento eficaz para ceratoconjuntivite aguda, ceratite superficial e ceratite epitelial recorrente por HSV-1 e HSV-2 (SAFRIN, 2010). Também é um medicamento administrado por via intravenosa, para tratamento de infecções produzidas pelos vírus herpes simplex e varicela-zoster, resistentes ao aciclovir, em pacientes imunossuprimidos (WIGG, 2008).

3.1.11.4 Brivudina

A brivudina [(E)-5-(2-bromovinil)-2'-desoxiuridina] é um análogo da timidina que foi sintetizado em 1970, mas não está licenciada no Brasil e nos Estados Unidos, sendo utilizada em alguns países da Europa. Apresenta efeito inibidor sobre o HSV-1, varicela-zoster e vírus Epstein-Barr, *in vitro*. Sua atividade deve-se ao grupamento (E)-bromovinil na configuração *trans*, que é crucial para a seletividade desse antiviral. A vantagem da brivudina sobre o aciclovir, em relação ao vírus varicela-zoster, é que essa droga age em concentrações nanomolares (WIGG, 2008). A brivudina é fosforilada pela timidino cinase viral à forma 5'-monofosfato e 5'-difosfato. Depois ainda ocorre outra fosforilação por cinases celulares sendo transformada em brivudina 5'-trifosfato (ABDEL-HAQ et al., 2006). A forma trifosfato age como um inibidor competitivo em relação ao substrato natural desoxitimidina trifosfato (dTTP), sendo incorporada ao DNA viral através da DNA polimerase. Essa incorporação afeta a estabilidade e a função do DNA viral, com consequente inibição da replicação do HSV-1 e VZV (WIGG, 2008).

A brivudina tem potente atividade contra o HSV-1, mas não contra o HSV-2. Esse efeito antiviral seletivo é devido à incapacidade do HSV-2 em codificar uma timidino cinase que converta eficientemente a brivudina monofosfato para a forma difosfato, resultando em uma redução substancial da forma ativa, em células

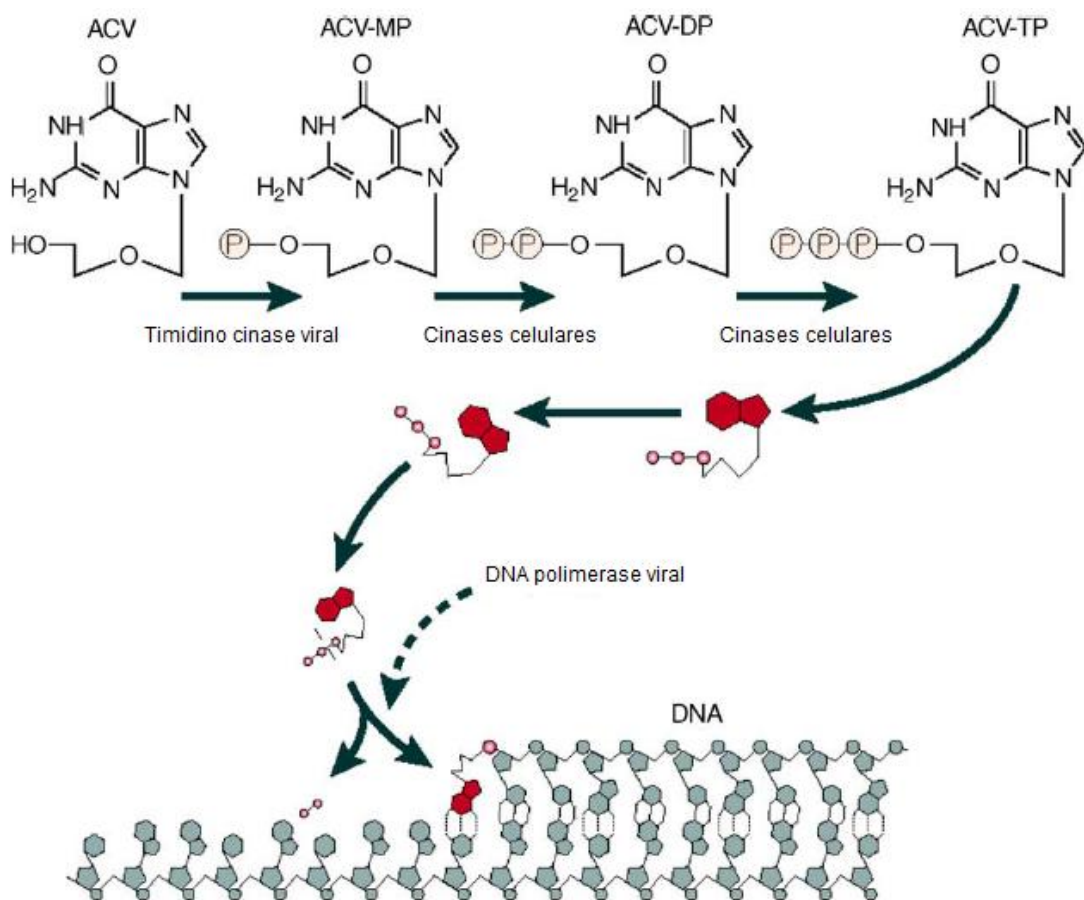
infectadas (ABDEL-HAQ et al., 2006; WIGG, 2008). A brivudina pode ser utilizada por via tópica ou oral, sendo que a sua biodisponibilidade oral é de aproximadamente 33% (ABDEL-HAQ et al., 2006).

3.1.11.5 Aciclovir

O aciclovir (ACV) (9-[2-hidroxi-etoximetil] guanina, acicloguanosina, Zovirax[®]) é um análogo da guanosina, que apresenta uma cadeia acíclica no lugar da desoxirribose. Por sua potente seletividade e baixa toxicidade, é atualmente o antiviral de escolha para o tratamento das infecções produzidas pelo HSV-1 e HSV-2, podendo ser usado também para infecções causadas pelo VZV, mas com menor eficiência (WIGG, 2008). Possui alto índice terapêutico (dose tóxica/ dose efetiva) em virtude de sua elevada seletividade pelo fato de que nenhuma enzima de mamífero fosforila o aciclovir de modo tão eficiente quanto à timidino cinase do HSV e do VZV. Dessa forma, as células infectadas por esses vírus contêm muito mais aciclovir fosforilado do que às não infectadas, isso explica grande parte da seletividade antiviral do aciclovir (YEH; COEN, 2009). A forma trifosfato ativa encontra-se em concentrações 40 a 100 vezes maiores nas células infectadas que nas células saudáveis, inibindo a replicação do DNA viral e produzindo poucos efeitos colaterais (WIGG, 2008).

Para a ativação do ACV são necessárias três etapas de fosforilação (Figura 10). Dentro da célula, o aciclovir recebe um fosfato, passando à forma monofosfato, por intermédio de uma timidino cinase viral (WIGG, 2008). Após essa primeira fosforilação, enzimas celulares transformam-no em di-(DP) e trifosfato (TP) (WIGG, 2008). O trifosfato de aciclovir inibe a síntese de DNA através de dois mecanismos (SAFRIN, 2010). Na primeira etapa, ele inibe competitivamente a incorporação da desoxiguanosina-trifosfato (dGTP) e a seguir, atua como substrato e é incorporado na cadeia de DNA em crescimento, em oposição a um resíduo de citosina. A polimerase é translocada para a posição seguinte no molde, mas não pode adicionar um novo trifosfato de desoxirribonucleosídeo, devido à ausência de 3'-hidroxila no trifosfato de ACV. Por conseguinte, ele também é um elemento de terminação da cadeia (COEN; RICHMAN, 2007; YEH; COEN, 2009).

Figura 10 - Mecanismo de ação do aciclovir (ACV). A timidino cinase viral adiciona um fosfato ao aciclovir, que passa à forma monofosfatada. A partir dessa primeira fosforilação, enzimas celulares transformam-no em di-(DP) e trifosfato (TP). Dessa forma, o aciclovir-TP compete com a guanosina-TP no sítio de ação da DNA polimerase viral, que então o incorpora à cadeia de DNA viral que está sendo sintetizada. Devido ao fato de o aciclovir não possuir hidroxila (OH) na posição 3', necessária à ligação de outros nucleotídeos, a síntese de DNA é interrompida.



Fonte: adaptado de De Clercq (2004).

Alguns mecanismos relacionados à resistência do HSV ao aciclovir referem-se à deficiência completa na atividade da timidino cinase viral, baixa produção da enzima viral, produção da enzima com especificidade alterada pelo substrato, ou seja, ela é capaz de fosforilar timidina, o substrato natural, mas não fosforila o aciclovir e, por fim, produção da DNA polimerase viral com alteração da especificidade pelo substrato (GILBERT; BESTMAN-SMITH; BOIVIN, 2002). Estes mecanismos podem estar associados às mutações pontuais, inserção ou deleção de

bases nos genes correspondentes. O mecanismo de resistência mais comum em isolados clínicos de HSV é a deficiência da atividade da timidino cinase, já a alteração da atividade da timidino cinase é incomum e os mutantes da DNA polimerase são raros (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). O aciclovir pode ser usado via oral (comprimidos, cápsula ou suspensão), intravenosa ou tópica (WIGG, 2008). O uso oral é eficaz na gengivoestomatite primária e no tratamento de herpes genital primário e recorrente; o tópico pode ser benéfico nos casos de infecções labiais e faciais por HSV, muito localizadas; enquanto o intravenoso constitui o tratamento de escolha para a encefalite e infecção do recém-nato por HSV (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; SAFRIN, 2010).

3.1.11.6 Valaciclovir

Após o sucesso do ACV, várias empresas farmacêuticas buscaram descobrir novas moléculas relacionadas a esse fármaco (COEN; RICHMAN, 2007). Como o aciclovir tem limitada biodisponibilidade oral (cerca de 10 a 20%) e regimes de dosagem de até cinco vezes por dia são necessários para atingir a eficácia de uma variedade de indicações, o valaciclovir (Valtrex[®]) foi desenvolvido (TYRING; BAKER; SNOWDEN, 2002). Este é um pró-fármaco do aciclovir (éster de valina derivado do aciclovir) que atinge níveis séricos três a cinco vezes maiores do que os obtidos com o aciclovir oral, aproximando-se àqueles alcançados com a administração intravenosa de aciclovir (SAFRIN, 2010; YEH; COEN, 2009). O valaciclovir contém uma estrutura de aciclovir ligada de modo covalente a uma valina e é rapidamente convertido em aciclovir após administração oral por hidrólise enzimática de primeira passagem no fígado e no intestino (BUTEL, 2012a; YEH; COEN, 2009). A biodisponibilidade oral é de 54% a 70% e a meia vida de eliminação é de 2.5 a 3.3 horas (BUTEL, 2012a). A atividade *in vitro*, o mecanismo de ação e o desenvolvimento de resistência são idênticos aos do ACV (SAFRIN, 2010).

3.1.11.7 Penciclovir

A exemplo do aciclovir, a estrutura do penciclovir (9-[4-hidroxi-3-hidroxemetilbut-1-il] guanina) consiste em uma guanina ligada a uma molécula acíclica semelhante a açúcar, que carece de um componente 2'CH₂ (YEH; COEN, 2009). O penciclovir apresenta um mecanismo de ação semelhante ao do aciclovir.

É inicialmente monofosforilado pela timidina cinase viral, a seguir, é convertido em trifosfato por cinases celulares. O trifosfato de penciclovir atua como inibidor competitivo da DNA polimerase viral, entretanto, ao contrário do aciclovir, não atua como elemento de terminação de cadeia (DYKE; WOODFORK, 2011). Embora o penciclovir trifosfatado seja 100 vezes menos potente na inibição da DNA polimerase viral do que o aciclovir trifosfatado, ele alcança altas concentrações intracelulares e tem vida longa nas células infectadas pelo HSV (BRADY; BERNSTEIN, 2004). O penciclovir foi aprovado como formulação tópica para o tratamento de herpes labial (DYKE; WOODFORK, 2011).

3.1.11.8 Fanciclovir

O fanciclovir (Famvir[®]) é a pró-droga éster diacetil do 6-desoxi-penciclovir, um análogo acíclico da guanossina. Mostra-se ativo, *in vitro*, contra HSV-1, HSV-2, VZV, EBV e vírus da hepatite B (SAFRIN, 2010). O fanciclovir é bem absorvido por via oral e rapidamente convertido em penciclovir pela desacetilação da cadeia lateral e pela oxidação do anel purina durante e após a absorção intestinal (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). Nos seres humanos, essa modificação resulta em biodisponibilidade oral de cerca de 70% (YEH; COEN, 2009). Em geral, o fanciclovir é tão eficaz quanto o aciclovir no tratamento do HSV. A resistência ao fármaco pode ser provocada pela ocorrência de mutações na DNA polimerase ou na timidina cinase viral. As cepas de HSV resistentes ao aciclovir que apresentam deficiência de timidina cinase viral também exibem resistência ao fanciclovir e ao penciclovir (DYKE; WOODFORK, 2011).

3.1.11.9 Ganciclovir

O ganciclovir (9-[1-3-deidroxi-2-propoxi] metilguanina, Cymevene[®], Cytovene[®]) é um análogo acíclico da 2'-desoxiguanosina, com atividade inibitória contra todos os herpesvírus, mas é cerca de 100 vezes mais ativo contra o CMV (DYKE; WOODFORK, 2011; WIGG, 2008). O ganciclovir exige trifosforilação para a sua ativação antes de inibir a DNA polimerase viral. A fosforilação inicial é catalisada pela proteína cinase vírus específica: a fosfotransferase codificada pelo gene U_L97 nas células infectadas por CMV ou a timidina cinase viral nas células infectadas por

HSV (SAFRIN, 2010). A seguir, as enzimas da célula do hospedeiro efetuam mais duas fosforilações. Então, o trifosfato de ganciclovir resultante compete com o trifosfato de desoxiguanosina (dGTP) pelo seu acesso à DNA polimerase viral (DYKE; WOODFORK, 2011). Sua incorporação no filamento de DNA em crescimento provoca término da cadeia de modo semelhante ao do aciclovir, pois também interrompe a síntese do DNA por não possuir a hidroxila no carbono 3' (DYKE; WOODFORK, 2011; WIGG, 2008). O trifosfato de ganciclovir concentra-se até 100 vezes mais nas células infectadas por CMV do que nas células normais e é preferencialmente incorporado pela DNA polimerase viral (DYKE; WOODFORK, 2011).

Os citomegalovírus resistentes ao ganciclovir que aparecem no início da terapia apresentam tipicamente mutações no gene U_L97, já as mutações associadas à terapia mais prolongada podem incluir mutações no gene da DNA polimerase ou mutações duplas no gene da DNA polimerase e U_L97 (SAFRIN, 2010). As concentrações inibitórias para as células progenitoras da medula óssea humana são semelhantes às que inibem a replicação do CMV. Essa constatação prenuncia uma mielotoxicidade pelo ganciclovir durante seu emprego clínico (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). Por conseguinte, é preciso proceder a uma monitorização rigorosa das contagens hematológicas do paciente (DYKE; WOODFORK, 2011).

O ganciclovir é disponível em formulações intravenosa e oral, porém a sua biodisponibilidade oral é pequena (6-9%) (SAFRIN, 2010). O uso intravenoso é indicado para o tratamento da retinite causada por CMV em indivíduos imunossuprimidos, bem como para a prevenção da infecção por CMV em receptores de transplantes de órgãos. O ganciclovir oral é menos eficaz que a preparação intravenosa, porém está associado a um menor risco de reações adversas (DYKE; WOODFORK, 2011). Atualmente, também já estão disponíveis implantes oculares de ganciclovir para tratamento da retinite causada por CMV em pacientes com AIDS (DYKE; WOODFORK, 2011; WIGG, 2008).

3.1.11.10 Valganciclovir

O valganciclovir (Valcyte[®]) é um éster de valina do ganciclovir, ou seja, é um pró-fármaco do ganciclovir. Seus efeitos tóxicos, portanto, são os mesmos do ganciclovir. Após a administração oral, o valganciclovir é rapidamente convertido em ganciclovir por esterases hepáticas e intestinais (WIGG, 2008). A biodisponibilidade do ganciclovir após a administração do valganciclovir é de cerca de 60% (DYKE; WOODFORK, 2011).

3.1.11.11 Cidofovir

O cidofovir ou (S)-9-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil) citosina (Vistide[®]) é um análogo nucleotídico da desoxicitidina monofosfato (dCMP) e foi o primeiro análogo de nucleotídeo a ser licenciado (WIGG, 2008). Apresenta atividade, *in vitro*, contra CMV, HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, HHV-6, HHV-8, adenovírus, poxvírus, poliomavírus e papilomavírus humano (SAFRIN, 2010). Para a sua ativação, o cidofovir precisa ser metabolizado a difosfato por enzimas celulares do hospedeiro. Como essa ativação não depende de enzimas virais é observado nível semelhante de difosfato de cidofovir tanto em células infectadas quanto nas células não infectadas (DYKE; WOODFORK, 2011). O cidofovir difosforilado inibe competitivamente a incorporação da dexocitidina-trifosfato (dCTP) à cadeia de DNA ao se ligar à DNA polimerase, impedindo a adição de nucleotídeos naturais (WIGG, 2008). A incorporação de uma molécula de cidofovir à cadeia de DNA em crescimento retarda a replicação e a incorporação sequencial de duas moléculas interrompe a atividade da DNA polimerase (DYKE; WOODFORK, 2011).

A resistência ao cidofovir é produzida por uma mutação de ponto na DNA polimerase (SAFRIN, 2010). Embora a meia-vida de eliminação plasmática do cidofovir seja, em média, de 2.6 horas, o metabólito ativo, difosfato de cidofovir, é retido no interior das células e possui meia-vida intracelular prolongada, de 17 a 65 horas, permitindo, assim, uma administração amplamente espaçada (DYKE; WOODFORK, 2011; SAFRIN, 2010). A nefrotoxicidade constitui um importante problema e é preciso ter muita cautela na administração desse fármaco (YEH; COEN, 2009). Portanto, administra-se probenecida juntamente com cidofovir para

bloquear sua captação nas células epiteliais dos túbulos proximais, inibindo assim a sua secreção tubular, bem como a sua toxicidade (DYKE; WOODFORK, 2011).

3.1.11.12 Fomivirsen Sódico

O fomivirsen (Vitravene[®]) é um oligonucleotídeo complementar à região precoce imediata 2 (IE2, *immediate early region 2*) do mRNA do CMV (DYKE; WOODFORK, 2011). Essa região do genoma codifica várias proteínas responsáveis pela regulação da expressão gênica essencial para a síntese do CMV infeccioso (WIGG, 2008). Através de sua ligação ao mRNA IE2, o fomivirsen impede a tradução em proteínas e, portanto, bloqueia a replicação do vírus (DYKE; WOODFORK, 2011). O fomivirsen é mais ativo que as outras drogas anti-CMV disponíveis, apresenta uma dosagem mais conveniente e efetiva, é mais seletivo e apresenta baixa incidência de efeitos colaterais, mesmo quando administrado sistemicamente (WIGG, 2008). Além disso, como seu mecanismo de ação difere daquele de outros agentes antivirais, é pouco provável que haja resistência cruzada entre o fomivirsen e outros agentes anti-CMV (ganciclovir, cidofovir, foscarnet) (DYKE; WOODFORK, 2011; SAFRIN, 2010). Também apresenta absorção sistêmica mínima, pois sofre degradação local por exonucleases celulares (DYKE; WOODFORK, 2011). Utiliza-se o fomivirsen em injeção intravítrea para o tratamento da retinite causada por CMV em pacientes com AIDS. Os efeitos colaterais consistem em irite e vitreíte, bem como em elevação da pressão intraocular (SAFRIN, 2010).

3.1.11.13 Fosfonoformato

O fosfonoformato (Foscarnet[®]) é o sal sódico do ácido fosfonofórmico, um análogo do pirofosfato (WIGG, 2008). Por ser análogo estrutural anômalo do pirofosfato, o foscarnet apresenta mecanismo de ação diferente do ACV, e, portanto, é usado nas infecções por HSV resistentes ao aciclovir e ao ganciclovir (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; DYKE; WOODFORK, 2011). Ele se liga à DNA polimerase viral no sítio de ligação do pirofosfato, inibindo, de forma não-competitiva, a ligação dos nucleosídeos (WIGG, 2008). A resistência ao foscarnet é decorrente de mutações de ponto no gene da DNA polimerase e, tipicamente, está associada a uma exposição prolongada ou repetida do fármaco. Sua baixa biodisponibilidade oral e a ocorrência de intolerância gastrointestinal impedem seu

uso oral (SAFRIN, 2010). A administração do foscarnet é via intravenosa, por meio de bomba de infusão (WIGG, 2008). O uso de uma bomba para controlar a velocidade da infusão é importante para evitar a toxicidade do fármaco, assim são necessários volumes relativamente grandes de líquido, devido à baixa solubilidade do foscarnet (SAFRIN, 2010).

3.1.11.14 Doxorrubicina lipossomal

A doxorrubicina lipossomal (Caelyx[®]) é uma antraciclina citotóxica isolada de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. Na formulação lipossomal é administrada por infusão intravenosa, no tratamento de pacientes com sarcoma de Kaposi relacionado à AIDS. Ela se liga ao DNA, inibindo a síntese de ácido nucleico. Estudos sobre o mecanismo de ação em estruturas celulares têm mostrado rápida penetração celular e ligação à cromatina perinuclear, com rápida inibição da atividade mitótica, indução de mutagênese e aberração cromossomal (WIGG, 2008).

3.1.11.15 Docosanol

O docosanol (álcool beenílico) é um álcool saturado de cadeia longa que possui atividade, *in vitro*, contra numerosos vírus envelopados, tais como HSV-1, HSV-2, VZV, HHV-6, CMV, vírus da influenza, vírus sincicial respiratório e HIV (DYKE; WOODFORK, 2011; SCOLARO et al., 2001). Seu mecanismo de ação baseia-se em bloquear a entrada do vírion na célula hospedeira ao inibir a fusão do envelope viral com a membrana plasmática do hospedeiro. Como não afeta a replicação viral nem a produção de proteínas, o docosanol pode estar menos associado ao desenvolvimento de resistência do que outros agentes antivirais (DYKE; WOODFORK, 2011). O creme de docosanol (Abreva[®]) foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamento do herpes labial (ABDEL-HAQ et al., 2006).

3.2 POLIOVÍRUS

3.2.1 Histórico

Acredita-se que a poliomielite seja uma doença antiga, o que é sugerido pela representação de um jovem egípcio com sequela típica (perna flácida e de muleta) que data do segundo milênio a.C. Essa representação é muito semelhante a uma imagem moderna de um homem jovem com poliomielite parálitica (GONÇALVES et al., 2008; NATHANSON; KEW, 2010). As primeiras descrições clínicas da doença foram feitas em 1800 com relatos de casos de paralisia com febre. Algumas publicações sobre essa doença por Heine (1840) e por Medin (1890) fizeram com que a poliomielite parálitica passasse a ser chamada doença de Heine-Medin (GONÇALVES et al., 2008).

Os pesquisadores Charcot e Joffroy (1850) descreveram alterações patológicas nos cornos anteriores da medula e, posteriormente, Wickman et al. reconheceram a importância dos indivíduos assintomáticos infectados na transmissão do poliovírus e, o papel da infecção entérica na patogênese da doença. Além disso, a participação do trato gastrintestinal no início e na propagação da infecção foi mais tarde confirmado por Trask et al. (GONÇALVES et al., 2008; PALLANSCH; ROOS, 2007). O poliovírus foi descrito como agente etiológico da poliomielite, em 1908, por Landsteiner e Popper, os quais comprovaram a natureza infecciosa da doença, através de sua transmissão a macacos, por inoculação do material do SNC proveniente de casos humanos (GPEI, 2015).

Em 1931, Burnet e MacNamara identificaram diferentes sorotipos de poliovírus, conhecidos como 1, 2 e 3 (GPEI, 2015). Já em 1949, Enders, Weller e Robbins foram os primeiros a multiplicar o poliovírus em células de mamíferos cultivadas, *in vitro*, iniciando a era moderna dos cultivos celulares. Essas investigações tiveram implicações para toda a virologia, porque mostraram que o vírus da poliomielite podia ser propagado em vários tipos de cultura de tecido que não correspondiam aos tecidos infectados na doença humana. Esta tecnologia levou ao desenvolvimento de duas vacinas altamente eficazes para a prevenção da poliomielite: a vacina inativada de poliovírus (VIP), desenvolvida por Jonas Salk, administrada por via intramuscular, licenciada em 1955, e a vacina oral de poliovírus (VOP), produzida com vírus atenuado, desenvolvida por Albert Sabin, licenciada em

1961-1962, o que alterou radicalmente o panorama epidemiológico da doença. Em 1981, o poliovírus tornou-se o primeiro vírus de RNA a ter o seu genoma clonado e completamente sequenciado. E, em 1985, teve a sua estrutura tridimensional resolvida por cristalografia por raios X (GONÇALVES et al., 2008; RIEDER; BRUM, 2007). Finalmente, em 1989, Mendelson et al. identificaram o receptor do PV: o CD155 (PALLANSCH; ROOS, 2007).

3.2.2 Família *Picornaviridae*

A família *Picornaviridae* é uma das mais antigas e variadas famílias virais, abrangendo mais de 200 vírus. Os representantes desta família são responsáveis por enfermidades importantes em humanos, incluindo o resfriado, doenças do trato digestivo e do SNC, como meningites, encefalites e paralisia (coxsackievírus, echovírus e poliovírus), doença hepática (vírus da hepatite A) e infecção cardíaca (coxsackievírus). Entre os picornavírus de interesse veterinário estão o vírus da febre aftosa, o vírus da encefalomiocardite dos camundongos, o enterovírus bovino e o vírus da doença vesicular de suínos (RIEDER; BRUM, 2007).

Os picornavírus são subdivididos em nove gêneros: *Enterovirus*, *Rinovirus*, *Cardiovirus*, *Aftovirus*, *Hepatovirus*, *Parechovirus*, *Erbovirus*, *Kobuvirus* e *Teschovirus* (Tabela 2) (RIEDER; BRUM, 2007). Os membros do gênero *Enterovirus* replicam-se no trato digestivo e, portanto, são resistentes a um pH baixo. Como representantes deste gênero, pode-se mencionar: poliovírus, coxsackievírus, echovírus, enterovírus humano e muitos vírus entéricos não humanos (RACANIELLO, 2007). Os coxsackievírus receberam esse nome em referência à cidade de Coxsackie, Nova Iorque, onde foram isolados pela primeira vez e o nome echovírus é derivado de *enteric cytopathic human orphan*, porque estes agentes não foram inicialmente associados à doença clínica (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

Os rinovírus, principais agentes do resfriado comum, são assim chamados porque se replicam na nasofaringe, embora tenha sido demonstrado que eles também podem se replicar no trato respiratório inferior. Estes vírus são sensíveis a pH ácido e replicam-se em temperaturas acima de 33°C (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009; RACANIELLO, 2007).

Os cardiovírus são divididos em dois grupos: o vírus da encefalomiocardite de murino, que pode também infectar outros hospedeiros, incluindo seres humanos, macacos, porcos, elefantes e esquilos. O segundo grupo inclui o vírus da encefalomielite murina de Theiler (RACANIELLO, 2007).

Os aftovírus infectam animais, mas raramente o homem e já foram identificados sete sorotipos e muitos subtipos desses vírus. Eles são altamente instáveis e perdem rapidamente a infecciosidade em pH inferior a 7 (RACANIELLO, 2007).

O vírus da hepatite A foi originalmente classificado como enterovírus tipo 72, entretanto, atualmente é designado em um gênero distinto (*Hepatovirus*) (BUTEL, 2012b). Esta reclassificação foi baseada em algumas propriedades peculiares do vírus, incluindo os nucleotídeos e a sequência de aminoácidos, a replicação em cultura de células sem efeito citopático e a existência de um único sorotipo (RACANIELLO, 2007).

O gênero *Parechovirus* contém dois sorotipos de parechovírus humanos que foram anteriormente classificados como echovírus tipos 22 e 23. Estudos da sequência de nucleotídeos do genoma viral não revelaram uma similaridade de aminoácidos superior a 30% com outros picornavírus. Além disso, o capsídeo consiste em três proteínas, e não quatro. Estas e outras diferenças levaram à reclassificação destes vírus (RACANIELLO, 2007).

O gênero *Erbovirus* contém dois sorotipos do vírus da rinite equina B e o *Teschovirus* é composto por 11 sorotipos de teschovírus suíno. Estes últimos podem causar polioencefalomielite suína, também chamada de doença de Teschen (RACANIELLO, 2007). Por fim, o gênero *kobuvirus* é composto pelo kobuvírus bovino e pelo vírus Aichi, o qual causa gastroenterite em seres humanos. Pode-se observar, portanto, que a variedade de hospedeiros dos picornavírus muda acentuadamente de um tipo para o outro e mesmo entre cepas do mesmo tipo. Por exemplo, muitos enterovírus podem crescer a 37°C em culturas de células humanas e de macaco e a maioria das cepas de rinovírus pode ser isolada em células humanas a 33°C. Já os coxsackievírus são patogênicos para camundongos recém-natos (BUTEL, 2012b).

Tabela 2 - Classificação da Família *Picornaviridae*

Gênero	Espécie	Sorotipo
Enterovirus	Poliovírus	3
	Enterovírus humano A	17
	Enterovírus humano B	56
	Enterovírus humano C	13
	Enterovírus humano D	3
	Enterovírus símio A	1
	Enterovírus bovino	2
	Enterovírus suíno B	2
Rinovirus	Rinovírus humano A	74
	Rinovírus humano B	25
Cardiovirus	Vírus da encefalomiocardite	1
	Theilovírus	3
Aftovirus	Vírus da febre aftosa	7
	Vírus da rinite equina A	1
Hepatovirus	Vírus da hepatite A	1
	Vírus da encefalomielite-like aviária	1
Parechovirus	Parechovírus humano	3
	Vírus Ljugan	2
Erbovirus	Vírus da rinite equina B	2
Kobuvirus	Vírus Aichi	1
	Kobuvírus bovino	1
Teschovirus	Teschovírus suíno	11

Fonte: adaptado de Gonçalves et al. (2008).

3.2.3 Estrutura Viral

Os picornavírus são icosaédricos, com diâmetro de 25 a 30nm, sem envelope e contêm uma molécula de RNA de fita simples e de polaridade positiva como genoma (RIEDER; BRUM, 2007). A composição química desses vírus é de 30% de ácido nucleico e 70% de proteína (GONÇALVES et al., 2008).

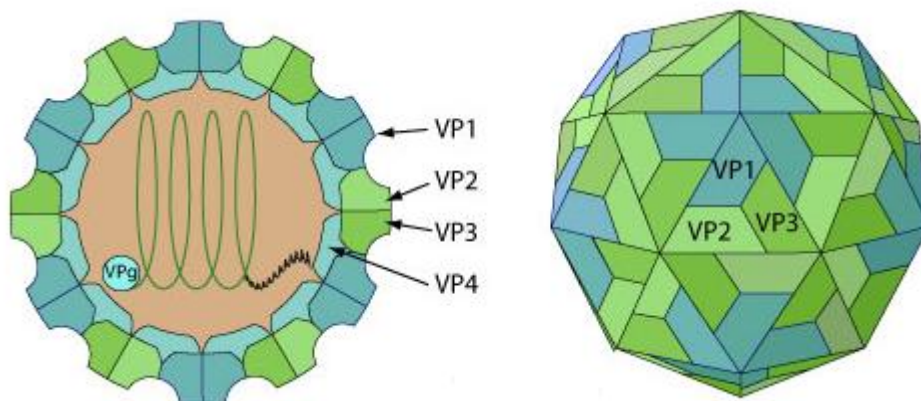
O RNA possui aproximadamente 7200 a 8450 bases, sendo que o genoma é poliadenilado na extremidade 3' e apresenta uma pequena proteína codificada pelo

vírus (VPg-proteína viral ligada ao genoma, contendo 22 a 24 aminoácidos), que se liga de modo covalente à extremidade 5' (BUTEL, 2012b; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). A sequência poli A aumenta a infecciosidade do RNA e a VPg pode ser importante no empacotamento do genoma no capsídeo e na iniciação da síntese de RNA viral. Além disso, próximo à extremidade 5', existe uma longa região não traduzida (*untranslated region* – 5'UTR), que varia entre 740-1300 nucleotídeos, precedendo o códon de iniciação da única e longa sequência aberta de leitura (ORF) e também há uma estrutura secundária denominada sítio interno de entrada dos ribossomos (*internal ribosomal entry site* – IRES). Essa região do genoma contém sequências que controlam a replicação e a tradução. Próximo à extremidade 3', existe outra região não codificante (50-100 bases) que contém sítios importantes para a replicação do genoma e infecções produtivas (GONÇALVES et al., 2008; RIEDER; BRUM, 2007).

O capsídeo icosaédrico possui 12 vértices pentaméricos, cada um é composto de cinco unidades protoméricas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). Os protômeros são formados por uma cópia dos quatro polipeptídeos estruturais (VP1, VP2, VP3 e VP4) (RIEDER; BRUM, 2007). Os três primeiros são externos e o VP1 é o mais superficial, predominantemente exposto. Nele se localiza o sítio antigênico mais importante, que é, possivelmente, o sítio de reconhecimento do receptor celular. Já o VP4 é o mais interno, associado ao ácido nucleico (GONÇALVES et al., 2008) (Figura 11). Esses polipeptídeos são produzidos pela clivagem enzimática de uma poliproteína precursora (P1). Eles são estáveis e protegem o genoma de ambientes hostis, proporcionando um meio de transmitir o genoma entre células e hospedeiros (RIEDER; BRUM, 2007). Estudos da estrutura do poliovírus e do rinovírus mostraram que suas superfícies têm uma topografia enrugada, um platô proeminente com forma de estrela, no eixo 5x, circundado por uma profunda depressão (cânion) e outra protuberância no eixo 3x. Foi comprovado que o cânion é o lugar de ligação do receptor no caso desses vírus (GONÇALVES et al., 2008; RACANIELLO, 2007). A sequência de aminoácidos que constituem esses polipeptídeos estruturais é determinante do tipo celular que pode ser infectado, portanto, possui influência direta no tropismo e patogenia viral. Esses sítios juntamente com outras regiões do capsídeo são altamente antigênicos e, portanto, alvos de anticorpos do hospedeiro (RIEDER; BRUM, 2007).

Além das proteínas do capsídeo e da VPg, os picornavírus codificam pelo menos duas proteases e uma RNA polimerase RNA-dependente. O poliovírus também produz uma protease que degrada a proteína de 200000 Da, *cap* ligante (*cap-binding protein*) dos ribossomos eucarióticos, bloqueando a tradução da maioria do mRNA celular (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). Os vírus são estáveis em uma faixa de pH de 3 a 9 e resistentes a muitos desinfetantes, como álcool a 70%, lisol diluído, isopropanol e compostos quaternários de amônio, além de solventes lipídicos como éter e clorofórmio. São termolábeis, sendo destruídos pela exposição a 42°C, mas são estáveis por anos, em temperaturas entre -20°C e -70°C (GONÇALVES et al., 2008).

Figura 11 - Estrutura do poliovírus



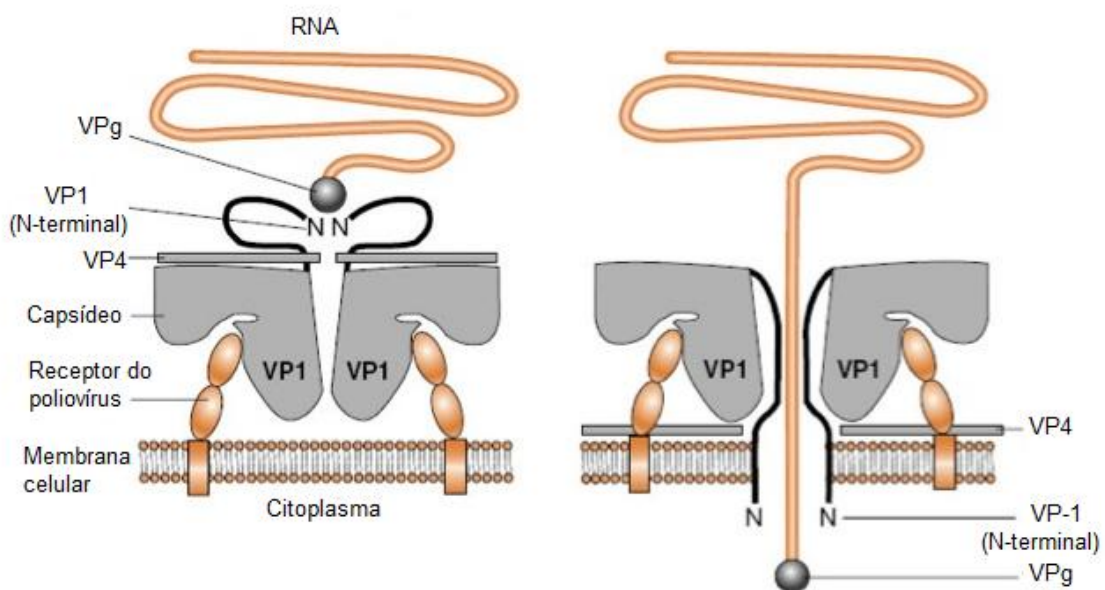
Fonte: Swiss Institute of Bioinformatics (2008).

3.2.4 Replicação Viral

O ciclo de replicação dos picornavírus ocorre integralmente no citoplasma das células hospedeiras e a primeira etapa é a interação dos vírions com os receptores celulares (RIEDER; BRUM, 2007). A especificidade dos picornavírus com os receptores é o principal fator determinante do tropismo pelo tecido alvo, tendo uma influência fundamental na patogenia da doença (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009; RIEDER; BRUM, 2007). O receptor do poliovírus (PVR- *poliovirus receptor*), CD155, é uma proteína integral da membrana, membro da superfamília de imunoglobulina (Ig) e está presente em diversas células humanas, mas nem todas replicarão o vírus. As proteínas VP1 nos vértices do vírion contém uma estrutura em

fenda (cânion) à qual o receptor se liga. Com a ligação ao receptor, o VP4 é liberado e o vírion enfraquecido. O genoma é então injetado diretamente através da membrana por um canal criado pela proteína VP1 em um dos vértices do vírion (Figura 12) (GONÇALVES et al., 2008; RIEDER; BRUM, 2007).

Figura 12 - Formação de poro na membrana celular pelo poliovírus. A interação do poliovírus com o seu receptor provoca uma alteração estrutural no vírion, formando as partículas alteradas ou partículas A, as quais 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 pelas membranas, inserindo-se na membrana celular e levando à formação de poros através dos quais o RNA viral é liberado no citoplasma celular.



Fonte: adaptado de Proprofs Flashcards (2011).

Uma vez no citoplasma, o RNA de polaridade positiva, sem a VPg, que foi clivada por uma fosfodiesterase, é traduzido pelos ribossomos da célula hospedeira, para produzir as proteínas essenciais para a replicação e para produção de novas partículas virais (GONÇALVES et al., 2008). A tradução ocorre por um mecanismo independente de *cap*, por meio do local interno de entrada do ribossomo após a extremidade 5' do genoma viral (BUTEL, 2012b). Os picornavírus possuem um mecanismo pelo qual podem assegurar a tradução dos seus mRNA em detrimento

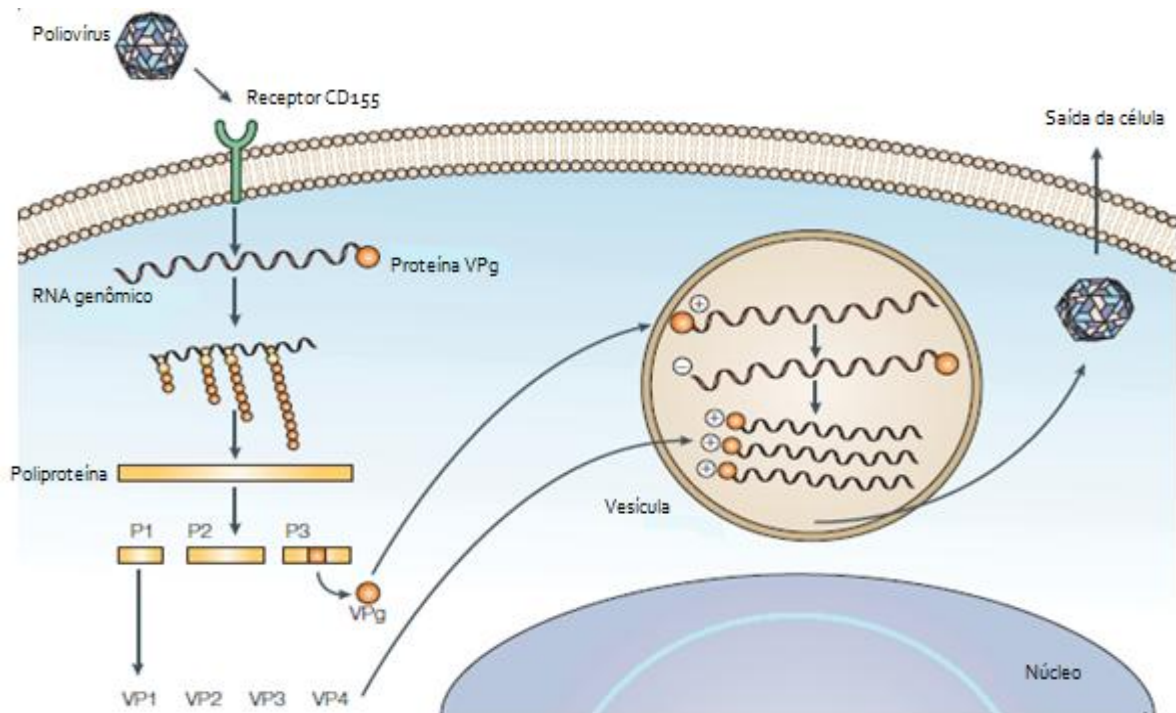
da tradução dos mRNAs celulares. Uma protease viral cliva fatores celulares necessários para a tradução dependente de *cap*, que é o mecanismo utilizado pela célula para traduzir os seus mRNAs. Nos poliovírus, a clivagem do fator de iniciação da tradução eIF4C pela protease 2A^{PRO} impede a formação do complexo de tradução na extremidade 5' com *cap* (RIEDER; BRUM, 2007).

As proteínas virais são sintetizadas a partir de uma poliproteína precursora, que é clivada. As clivagens são feitas, principalmente, por três proteinases, 2A, 3C e 3CD. Entre as proteínas sintetizadas estão a RNA polimerase-RNA dependente e as proteínas acessórias necessárias para a replicação do genoma e a síntese do mRNA (GONÇALVES et al., 2008). A síntese de um novo RNA viral só pode começar após a produção das proteínas de replicação codificadas pelo vírus. A fita de RNA do vírus infectante é copiada e essa fita complementar serve de modelo para a síntese de novas fitas de sentido positivo. Várias dessas fitas positivas são produzidas a partir de cada molde de sentido negativo (BUTEL, 2012b). Esse processo é complexo e envolve a formação de intermediários, como a forma replicativa, que consiste em uma molécula de fita dupla, uma positiva e outra negativa, e o intermediário de replicação, composto de uma fita negativa, parcialmente hibridizada com várias fitas positivas de RNA nascentes (GONÇALVES et al., 2008). Durante a fase de replicação, a síntese de novas moléculas de mRNA genômico e da fita negativa complementar é gerada em uma taxa de cerca de 30-70:1 (FERREIRA et al., 2008). Algumas novas fitas de sentido positivo são recicladas como modelos para amplificar o reservatório de RNA da progênie e outras são encapsidadas para formar novos vírus (BUTEL, 2012b; GONÇALVES et al., 2008).

As etapas finais do ciclo replicativo envolvem a montagem dos capsídeos e a maturação dos vírions por clivagem da VP0 em VP2 e VP4 (RIEDER; BRUM, 2007). O processo de maturação envolve diversos eventos de clivagem. A proteína precursora do envoltório P1 é clivada para formar agregados de VP0, VP3 e VP1. Ao atingirem uma concentração adequada, esses “protômeros” organizam-se em pentâmeros que acondicionam o VPg-RNA de filamento positivo, formando os “pró-vírions”, os quais não são infecciosos até a ocorrência de uma clivagem final que transforma VP0 em VP4 e VP2 (BUTEL, 2012b). O tempo necessário para um ciclo inteiro varia de 5 a 10 horas dependendo de muitos fatores, incluindo a amostra viral em questão, a temperatura, o pH, a célula hospedeira e a multiplicidade da infecção

(RACANIELLO, 2007). Uma visão geral do ciclo de replicação do poliovírus está representada na figura 13.

Figura 13 - Ciclo de replicação do poliovírus



Fonte: adaptado de Minor (2004).

3.2.5 Patogênese da Infecção pelo PV

A boca constitui a porta de entrada do poliovírus, o qual é resistente à acidez do estômago e o intestino delgado é um ambiente adequado para a sua biossíntese, após ser ingerido (GONÇALVES et al., 2008). A duração da infecção é de 5 a 6 semanas em 50% dos indivíduos não expostos anteriormente, tempo durante o qual o poliovírus é excretado nas fezes (MINOR, 2004). A eliminação pode ser intermitente e é influenciada pelo estado imunológico do indivíduo. A quantidade e a duração da excreção do vírus podem ser significativamente reduzidas como resultado da imunidade de uma infecção natural anterior com PV selvagem, por vacinação ou por competir com outras infecções entéricas (PALLANSCH; ROOS, 2007). A transmissão ocorre principalmente por contato direto pessoa a pessoa, pelas vias fecal-oral ou oral-oral, esta última através de gotículas de muco da orofaringe (ao falar, tossir ou espirrar) (BRASIL, 2005). O período de incubação é

normalmente de 7 a 14 dias, podendo variar de 2 a 35 dias (MUELLER; WIMMER; CELLO, 2005).

O PV é produzido inicialmente em mucosas, especialmente nas placas de Peyer e amígdalas. A biossíntese nesses locais pode ser detectada em um a três dias. Em seguida, os vírus são sintetizados nos nódulos linfáticos mesentéricos profundos, levando a viremia primária, com invasão subsequente do sistema reticuloendotelial, incluindo nódulos linfáticos, medula espinhal e baço. O SNC também pode ser invadido, mas ocorre geralmente após amplificação no sistema reticuloendotelial seguida por viremia secundária (GONÇALVES et al., 2008).

O quadro de paralisia está associado, predominantemente, ao sorotipo 1 (MINOR, 2004). Em 1-2% dos indivíduos infectados, o vírus atinge o SNC e se replica em neurônios motores na medula espinhal, tronco cerebral, ou córtex motor o que leva à paralisia muscular característica, ou seja, o poliovírus não se multiplica no músculo, *in vivo*, e as alterações que ocorrem nos nervos periféricos e nos músculos voluntários são secundárias à destruição das células nervosas (BUTEL, 2012b; RACANIELLO, 2006). A localização e o número de células nervosas destruídas pelo vírus governam a extensão da paralisia e se outros neurônios podem reinervar o músculo e restaurar a atividade (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). Aproximadamente 80% dos casos de doença grave resultam em paralisia permanente, 10% em óbito e os 10% restantes recuperam-se completamente (MINOR, 2004).

Como o poliovírus se espalha para o SNC ainda não é completamente elucidado. Duas teorias prevalecem: em primeiro lugar, o vírus pode passar diretamente a partir do sangue para o SNC, atravessando a barreira hematoencefálica, independente do seu receptor. A segunda hipótese sugere que o vírus é transportado por transporte axonal retrógrado ascendente a partir do músculo para a medula espinhal e o cérebro. Ambos dependem da presença de vírus no sangue (viremia) (MUELLER; WIMMER; CELLO, 2005).

3.2.6 Manifestações Clínicas

3.2.6.1 Poliomielite abortiva

Ocorre em 4 a 8% dos indivíduos e o período de incubação é normalmente de 1 a 3 dias (PALLANSCH; ROOS, 2007). O paciente só apresenta doença discreta, caracterizada por febre, mal-estar, sonolência, cefaleia, náuseas, vômitos, prisão de ventre e faringite em várias combinações. A recuperação ocorre em poucos dias (BUTEL, 2012b).

3.2.6.2 Poliomielite não paralítica

A infecção por PV resulta, com menos frequência, em meningite asséptica. Esta doença não paralítica tem as características típicas de meningite viral, como febre, dor de cabeça e sinais meníngeos, mas uma ausência de sinais de envolvimento do parênquima do SNC (PALLANSCH; ROOS, 2007). A doença tem duração de 2 a 10 dias e a recuperação é rápida e completa. Em uma pequena porcentagem de casos, a doença progride para paralisia (BROOKS et al., 2012).

3.2.6.3 Poliomielite paralítica

O período de incubação é geralmente de 4 a 10 dias e a paralisia aparece 2 a 5 dias após os sintomas iniciais inespecíficos. A paralisia é classificada como espinal ou bulbar, dependendo se a biossíntese se dá na medula espinal ou no tronco cerebral, respectivamente. Muitas vezes a forma espinal se associa com a forma bulbar, ocorrendo poliomielite bulboespinal (GONÇALVES et al., 2008). A poliomielite espinal geralmente é assimétrica, flácida, limitada às extremidades e ao tronco, com os pacientes apresentando desde fraqueza branda a tetraplegia. Apenas 10 a 15% dos casos de poliomielite são da forma bulbar, envolvendo nervos motores ou centros medulares que controlam a respiração e o sistema vasomotor. Os nervos cranianos IX e X, os mais afetados, podem levar à paralisia dos músculos da faringe e laringe resultando em dificuldade na deglutição e na fala. O envolvimento de outros nervos cranianos pode levar a fraqueza da face (VII) e da língua (XII). O mais temido é o envolvimento da formação reticular do tronco cerebral, resultando em comprometimento respiratório, exigindo suporte ventilatório

(PALLANSCH; ROOS, 2007). Pulmões de aço e câmaras que forneciam compressão respiratória externa foram usados em 1950 para assistir a respiração de pacientes com essa poliomielite (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). Além disso, observa-se um envolvimento autonômico, que se manifesta como anormalidades da sudorese, micção, defecação e controle da pressão arterial (PALLANSCH; ROOS, 2007).

3.2.6.4 Síndrome pós-poliomielite

Trata-se de uma seqüela da poliomielite que pode ocorrer posteriormente (30 a 40 anos mais tarde) em 20 a 80% das vítimas originais (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). Repetidamente, foi observada a ocorrência de recrudescência da paralisia e degradação muscular em indivíduos, várias décadas após a poliomielite parálitica (BROOKS et al., 2012). Um subgrupo dessa síndrome, chamado de atrofia muscular progressiva pós-poliomielite, é uma desordem neurológica primária, manifestada por atrofia lenta e progressiva dos músculos, com evidente destruição de nervos motores. Não se conseguiu comprovar com certeza a presença do PV no fluido espinhal ou SNC desses pacientes. A única evidência de persistência da infecção por PV foi encontrada em pessoas imunossuprimidas (GONÇALVES et al., 2008).

3.2.7 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico envolve aspectos clínicos e epidemiológicos. Porém é imprescindível a confirmação laboratorial, com a detecção e identificação do agente viral, acompanhada da verificação da resposta de anticorpos tipo específicos (GONÇALVES et al., 2008).

3.2.7.1 Isolamento do vírus em cultura de células

Para a detecção dos enterovírus, as amostras clínicas mais usuais são fezes ou *swab* retal e lavado ou *swab* de garganta. Também é possível detectar o vírus no LCR. A recuperação do vírus de material de garganta é possível por um período de até duas semanas, ao passo que a recuperação de material fecal é possível por até 30 dias. O efeito citopático em monocamadas de células é característico,

constituindo-se de arredondamento, enrugamento e acentuada picnose nuclear, com degeneração e descolamento da superfície do suporte (GONÇALVES et al., 2008). Em geral, o poliovírus cresce bem em uma variedade de células de primatas e humanos, mas é indistinguível dos outros enterovírus unicamente com base no efeito citopático. O poliovírus utiliza o receptor CD155, que difere dos receptores usados por todos os outros enterovírus para infectar as células. Este receptor tem sido transfectado e expresso em uma linhagem celular de murinos, L20B, a qual tem sido explorada para isolar seletivamente o poliovírus (PALLANSCH; ROOS, 2007).

3.2.7.2 Exames inespecíficos

O LCR de meningite asséptica por poliovírus revela uma pleocitose predominantemente linfocítica. Em contraste com a meningite bacteriana, o LCR na meningite viral não apresenta neutrófilos e o nível de glicose é normal ou levemente baixo (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). Na eletromiografia os achados são comuns a um grupo de doenças que afetam o neurônio motor inferior, no entanto pode contribuir para descartar a hipótese diagnóstica de poliomielite. O exame anatomopatológico do sistema nervoso não permite o diagnóstico confirmatório, pois não há alterações patognomônicas. As alterações são comuns a quaisquer encefalomyelites virais, sendo que nos casos de poliomielite predominam nitidamente no corno anterior da medula e no tronco cerebral (BRASIL, 2005).

3.2.7.3 Sorologia e estudo do genoma

A sorologia é usada para confirmar a infecção por poliovírus, através da detecção de imunoglobulina (IgM) específica ou do aumento de quatro vezes no título de anticorpos entre a fase aguda da doença e o período de convalescença (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). A identificação dos enterovírus é feita, de modo geral, pelo teste de neutralização, mas em certos casos, podem ser usados os testes de inibição da hemaglutinação, fixação do complemento, imunofluorescência, ensaio imunoenzimático e hibridização do ácido nucleico. A utilização das técnicas moleculares tem modificado o diagnóstico dos enterovírus, devido à sua rapidez e grande sensibilidade. Assim, a reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), tem sido utilizada

para detectar o genoma de certos enterovírus em culturas de células, amostras clínicas e tecidos de biópsia ou autópsia. A técnica de hibridização com sondas de DNA é utilizada tanto na detecção como na identificação de enterovírus. O sequenciamento genômico, com sensibilidade mais alta, é utilizado para caracterização de enterovírus (GONÇALVES et al. 2008).

Além de identificar o tipo sorológico do PV, é muito importante diferenciar as amostras do poliovírus com caráter selvagem ou vacinal, já que estão amplamente disseminadas na natureza após a vacinação em massa. Com essa finalidade, usaram-se inicialmente diversas técnicas, chamadas marcadores genéticos (marcador de temperatura, sorodiferenciação e anticorpos monoclonais). Posteriormente, com o conhecimento da sequência de nucleotídeos das amostras vacinais e das selvagens predominantes, técnicas de biologia molecular passaram a ser utilizadas para a diferenciação, como a técnica de hibridização e o sequenciamento genômico (GONÇALVES et al., 2008). O sequenciamento dos nucleotídeos identifica a quantidade das mutações e a recombinação do vírus derivado vacinal. Para ser considerado derivado vacinal este vírus precisa apresentar mutações acima ou igual a 1%, podendo adquirir neurovirulência e provocar, portanto, a doença (BRASIL, 2005).

3.2.8 Epidemiologia

A poliomielite teve três grandes fases epidemiológicas: a endêmica, a epidêmica e a pós-vacinal. A fase endêmica foi mudando para epidêmica à medida que as condições de higiene e saneamento foram avançando nos países industrializados. Como o contato com o vírus se fazia cada vez mais tarde, houve o surgimento, na população, de grande massa de suscetíveis, o que facilitava a rápida disseminação quando o vírus penetrava na comunidade (GONÇALVES et al. 2008). Em 1985, a OMS recebeu uma informação de quase 300000 casos de poliomielite paralisante em 162 países, uma população estimada de 4.7 bilhões. Uma em cada 200 infecções conduz a uma paralisia irreversível. Entre aqueles paralisados, 5% a 10% morrem quando os músculos respiratórios ficam imobilizados (WHO, 2014). A era da vacina começou em 1955, quando foi introduzida a vacina de vírus inativado (VIP), firmando-se após 1960, com o advento e a utilização da vacina de vírus

atenuado (VOP) em larga escala. Em 12 anos (1955-1967), houve uma redução de 76000 para 1013 casos de poliomielite (GONÇALVES et al., 2008).

A doença ocorre em todos os grupos etários, mas as crianças geralmente são mais suscetíveis que os adultos em virtude da imunidade adquirida na população adulta. Nos países em desenvolvimento, onde as condições de vida favorecem a ampla disseminação do vírus, a poliomielite é uma doença de início na infância. Já nos países desenvolvidos, antes do advento da vacinação houve uma mudança na distribuição etária, de modo que a maioria dos pacientes tinha mais de 5 anos, enquanto 25% tinha mais de 15 anos (BUTEL, 2012b).

No Brasil, a partir de 1930, foram descritos surtos de poliomielite em capitais de estados da região sudeste-sul. Em 1953, ocorreu no Rio de Janeiro, a maior epidemia já registrada na cidade, com 746 casos. Somente em 1969 foi instituída a notificação regular de casos ao Ministério da Saúde, que registrou, até 1979, a ocorrência de 1000 a 3500 casos anuais. A partir de 1980, foram instituídos dois dias nacionais de vacinação contra a poliomielite, para vacinar toda a população de zero a cinco anos. Essa estratégia modificou inteiramente o quadro epidemiológico da poliomielite no Brasil. Em 1985, foram lançadas as bases do Plano de Erradicação da Poliomielite no Brasil e, a partir de 1990, não houve mais casos de poliomielite confirmados no país (GONÇALVES et al., 2008). O último caso de infecção pelo poliovírus selvagem, no Brasil, ocorreu em 1989, na cidade de Souza/Paraíba. Dois fatores foram decisivos para a certificação de país livre da circulação autóctone de poliovírus selvagem: os elevados níveis de cobertura vacinal obtidos nas campanhas nacionais, a partir de 1988, e o aumento do poder imunogênico da vacina utilizada no país (BRASIL, 2014).

Em 1994, a Organização Pan-americana de Saúde/OMS certificou a eliminação da transmissão autóctone do poliovírus selvagem nas Américas, após 3 anos sem circulação desse vírus no continente. Desde então, todos os países da região assumiram o compromisso de manter altas e homogêneas coberturas vacinais, bem como uma vigilância epidemiológica ativa e sensível para identificar, imediatamente, a reintrodução do poliovírus selvagem em cada território nacional e adotar medidas de controle capazes de impedir a sua disseminação (BRASIL, 2014).

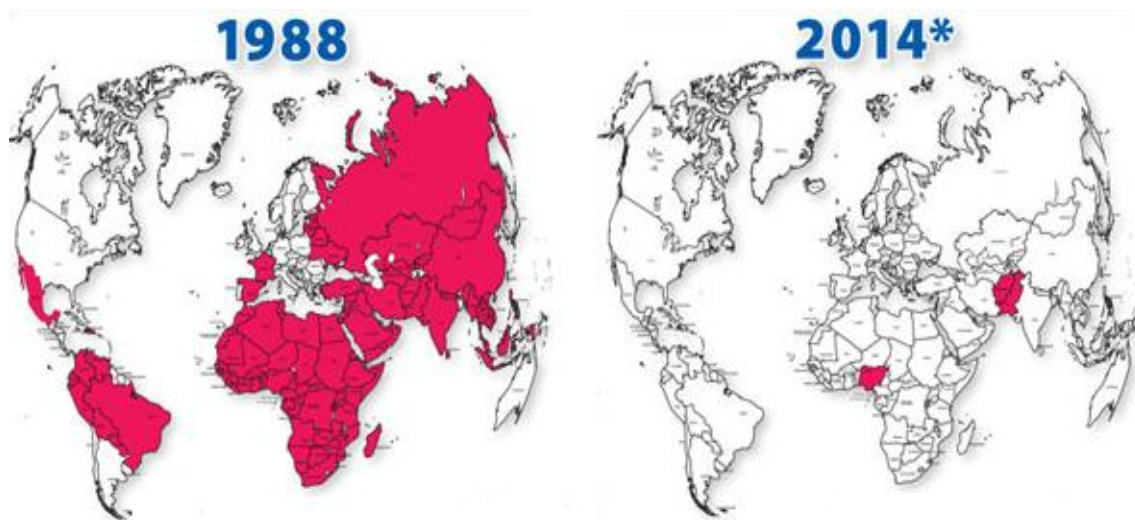
Chama-se a atenção para a ocorrência de casos de vírus derivado da vacina em países com coberturas vacinais insuficientes e/ou heterogêneas, ou seja, o vírus derivado da vacina passa a readquirir neurovirulência e patogenicidade, provocando

surtos de poliomielite em países que já tinham a doença controlada de forma parcial ou totalmente. O primeiro surto causado por um vírus derivado vacinal foi detectado na Ilha de Hispaniola (que pertence ao Haiti e à República Dominicana), em 2000/2001. De 2004 a 2014, ocorreram surtos em 18 países (Moçambique, Mianmar, Indonésia, China, Paquistão, Nigéria, Camarões, Niger, Chade, Afeganistão, Somália, Quênia, Congo, Yemen, Índia, Etiópia, Madagascar e Camboja) (BRASIL, 2014).

Em 2013, um total de 416 casos de poliomielite foram relatados de 8 países, o que representou um aumento de 86% comparando-se aos 223 casos relatados de 5 países, em 2012. Este aumento em 2013 foi devido a uma elevação de 60% dos casos detectados no Paquistão e surtos em países anteriormente livres da poliomielite. Observa-se que o número de casos da poliomielite foi reduzido em mais de 99% desde 1988, quando 125 países eram considerados áreas endêmicas, passando de 350 mil a 416 casos notificados em 2013. De acordo com dados globais de vigilância da poliomielite, no ano de 2014, 356 casos totais foram registrados, dentre estes, 337 nos países endêmicos. Atualmente, a doença é considerada endêmica apenas no Afeganistão, Nigéria e Paquistão (Figura 14) (WHO, 2014).

No entanto, até que a transmissão do poliovírus seja interrompida nesses países, todos os outros continuam em risco de importação da doença. Por exemplo, entre janeiro e abril, habitualmente período de baixa transmissão da poliomielite, três novos casos importados da doença foram detectados em 2014: na Ásia (do Paquistão para o Afeganistão), no Oriente Médio (da Síria para o Iraque) e na África Central (do Camarões para a Guiné Equatorial) (WHO, 2014). Segundo a OMS, a existência de focos remanescentes da poliomielite pode resultar em cerca de 200000 novos casos a cada ano, dentro de 10 anos, em todo o mundo. Em 2015, o primeiro caso de poliomielite foi relatado no Paquistão, o qual teve início no dia 3 de janeiro (GPEI, 2015).

Figura 14 - Distribuição global do poliovírus em 1988 e em 2014. O número de casos da poliomielite foi reduzido em mais de 99% desde 1988, quando 125 países eram considerados áreas endêmicas, com 350 mil casos notificados. Em 2014, apenas 3 países permaneceram endêmicos (Afeganistão, Nigéria e Paquistão) e um total de 356 casos foram registrados.



Fonte: CDC (2014).

3.2.9 Vacinas

São dois os tipos de vacinas utilizadas: as inativadas e as atenuadas. Nas primeiras o vírus inativado perde a capacidade replicativa devido a alterações irreversíveis que podem ser provocadas por diferentes métodos como calor, alteração do pH, radiação ou agentes químicos (HINDS; RUST; SCOVINO, 2008; TRABULSI; ALTERTHUM, 2004). A vacina inativada de poliovírus (VIP), desenvolvida por Salk em 1954, foi a primeira a ser licenciada e utilizada inicialmente nos Estados Unidos. Para a fabricação da VIP, os três poliovírus são inoculados em culturas de células de rim de macaco e, após a propagação nesse hospedeiro, foi demonstrado que o poliovírus, mediante incubação com formalina 1/1.000 em um período de 12 a 14 dias, a uma temperatura de 37 °C, pH 7, fica inativado, mantendo, porém, um poder antigênico adequado (CARVALHO; WECKX, 2006; GONÇALVES et al., 2008). Essas vacinas não possuem o fator limitante de reversão ao tipo selvagem, porém a resposta imunológica produzida por esse tipo de vacinação em geral é menos potente, com pouca ou nenhuma ativação de linfócitos TCD₈⁺ (HINDS; RUST; SCOVINO, 2008). Também apresentam como vantagem o

fato de poderem ser aplicadas em indivíduos imunossuprimidos e naqueles nos quais a vacina atenuada não é recomendada (GONÇALVES et al., 2008). A eficácia destas vacinas depende da aplicação de doses múltiplas, uma vez que o vírus perdeu sua capacidade de replicação nos tecidos do indivíduo. Em geral, a primeira dose sensibiliza os diversos elementos do sistema imunológico, a segunda ativa a produção de anticorpos pelos linfócitos B e a terceira eleva as taxas de anticorpos nos níveis de proteção adequada. Os reforços são importantes para a complementação da vacina e a eficácia na imunização da criança contra a doença (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

Já as vacinas atenuadas são preparadas com cepas de vírus tornadas avirulentas, que mantêm a capacidade de replicação nos tecidos do indivíduo vacinado (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004). Os vírus atenuados são tradicionalmente produzidos através de várias passagens em um sistema hospedeiro, que resultam no acúmulo de mutações, as quais tornam o vírus menos patogênico à célula humana, mas capaz de induzir resposta imunológica eficiente. Assim, após realizar sucessivas passagens em hospedeiro animal, Sabin desenvolveu cepas atenuadas dos três tipos de poliovírus com perda da neurovirulência e manutenção da capacidade infectante no trato alimentar e da capacidade imunogênica (CARVALHO; WECKX, 2006). As vacinas produzidas por vírus atenuados são geralmente muito potentes, pois são capazes de estimular diferentes componentes do sistema imunológico. O fato de o vírus manter a sua capacidade replicativa não só gera a produção de anticorpos, mas também possibilita o processamento e a apresentação de proteínas virais via MHC de classe I e a ativação dos linfócitos TCD_8^+ . A vacinação com vírus atenuado está associada, ainda, à ativação de células TCD_4^+ e ao desenvolvimento de células de memória (HINDS; RUST; SCOVINO, 2008). Além da imunidade produzida, o vírus vacinal compete com o vírus selvagem da poliomielite pela ocupação dos sítios de adsorção na luz intestinal, sendo por isso bastante eficaz no bloqueio de surtos. Os vírus vacinais que colonizam o intestino são excretados em grande quantidade nas fezes e podem infectar secundariamente contatos suscetíveis do indivíduo vacinado, produzindo também imunidade neles. A capacidade das cepas atenuadas de se disseminarem contribui para uma taxa maior de imunização do que a fornecida pela cobertura vacinal. Esses conhecimentos forneceram o embasamento para as

campanhas de vacinação em massa, implantadas com sucesso em várias regiões do mundo (CARVALHO; WECKX, 2006).

A vacina oral de poliovírus (VOP) vem sendo amplamente utilizada pela maior facilidade de administração (gotas orais), custo mais barato para a aplicação, capacidade de induzir não apenas anticorpos séricos, mas também anticorpos secretores (IgA) e pela rapidez com que a vacina induz o aparecimento de imunidade duradoura (GONÇALVES et al., 2008). Porém a limitação dessa estratégia de vacinação é dada pela possibilidade de o vírus sofrer mutações que possam reverter o estágio não patogênico para um estágio patogênico. Essa reversão pode levar ao desenvolvimento da doença e possibilita a transmissão do vírus de indivíduos vacinados para indivíduos que não tiveram contato com o vírus (HINDS; RUST; SCOVINO, 2008).

Nos Estados Unidos, segundo o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), ocorreu um caso de poliomielite paralítica associado à vacina anti-PV (VAPP- *vaccine associated paralytic poliomyelitis*), para dois a três milhões de doses de VOP aplicadas. No Brasil, no período de 1989 a 2006, foram constatados 11 casos de poliomielite associados à vacina (GONÇALVES et al., 2008). Para VAPP, a cepa vacinal do tipo 1 responde por cerca de 10% dos casos totais, ao passo que a vacina de cepas do tipo 2 e 3, responde a 45% dos casos, cada (MINOR, 2004).

Como mencionado, três tipos de vírus selvagens, conhecidos como tipo 1, 2 e 3, causam a poliomielite. Como parte da iniciativa de erradicação global da doença, a principal arma contra eles foi a chamada vacina trivalente (tVOP), sintetizada a partir dos três tipos de vírus atenuados. Quando existe mais de um tipo de vírus circulando em uma mesma comunidade, a tVOP é epidemiologicamente a melhor vacina a ser utilizada. Entretanto, quando essa vacina é usada, ocorre competição entre os três sorotipos do vírus, ocasionando como resultado final uma proteção desigual para cada um deles. A proteção contra o PV-2 é a que se desenvolve mais facilmente, porém a sua circulação foi interrompida em 1999. Atualmente, circulam apenas os poliovírus selvagens 1 e 3 nas áreas críticas de ocorrência da doença (o PV-3 ainda circula na Índia, nordeste da Nigéria, sudeste de Niger e Afeganistão) (CARVALHO; WECKX, 2006). Uma e três doses de VOP produzem imunidade contra todos os três sorotipos de poliovírus, em aproximadamente 50% e 95% dos receptores, respectivamente (GPEI, 2015).

As vacinas monovalentes orais contra a poliomielite (mVOP) consistem de cepas atenuadas de poliovírus tipo 1 (mVOP1) ou tipo 3 (mVOP3), conferindo proteção contra um único tipo de PV, dependendo da vacina, ao contrário da tVOP, não contém os outros dois tipos de poliovírus. A mVOP1 foi usada pela primeira vez na Índia, em abril de 2005, e, posteriormente, em muitas áreas, como adoção de uma estratégia para atingir principalmente o PV-1, o mais paralisante e que se espalha com mais facilidade. Já a mVOP3 foi introduzida na Índia e no Afeganistão, em 2005, para interromper cepas endêmicas de PV-3 em áreas específicas. Aproximadamente o dobro de crianças desenvolve imunidade contra o PV-1 após a primeira dose de mVOP1 em comparação com a primeira dose de tVOP. Com três doses de mVOP1, mais de 90% das crianças desenvolvem imunidade, enquanto nas mesmas doses a tOPV confere imunidade em apenas 70-75% das crianças. Além disso, cerca de 70% das crianças desenvolvem imunidade contra o PV-3, após a primeira dose de mVOP3 em comparação com aproximadamente 30% das crianças após a primeira dose de tVOP (GPEI, 2015).

Também há a vacina oral bivalente contra a poliomielite (bVOP), que consiste de cepas vivas atenuadas de poliovírus dos tipos 1 e 3. Destina-se simultaneamente aos dois tipos de poliovírus selvagens restantes e foi desenvolvida para melhorar a eficiência e o impacto das campanhas de vacinação em áreas onde os dois tipos de poliovírus estão em cocirculação. Essa vacina foi usada pela primeira vez no Afeganistão, em dezembro de 2009, em 2,8 milhões de crianças menores de cinco anos de idade. A bVOP é pelo menos 30% mais eficaz do que a tVOP e quase tão boa como as respectivas VOP monovalentes (GPEI, 2015).

Em 2012, o Plano Nacional de Imunização do Ministério da Saúde passou a adotar um esquema sequencial com VIP+VOP na vacinação infantil (duas doses de VIP administradas aos 2 e 4 meses e duas doses de VOP, aos 6 e 15 meses de idade). Anteriormente, o PNI recomendava a administração de 4 doses da VOP, com início aos 2 meses de idade, sendo as três primeiras dadas em intervalos de dois meses, com um reforço aos 15 meses, e a outra dose aos 5 anos de idade. Atualmente, o esquema sequencial VIP+VOP permite associar as vantagens das duas vacinas. Um risco maior de VAPP ocorre após as duas primeiras doses da VOP. Porém, duas doses de VIP são suficientes para induzir mais de 90% de imunidade contra os três tipos de poliovírus e permitem reduzir ou mesmo eliminar o risco de VAPP (BRASIL, 2012b).

Finalmente, algumas exigências devem ser cumpridas para a produção de vacinas bem-sucedidas. Elas devem ser seguras e é inaceitável qualquer tipo de toxicidade, devendo proporcionar proteção à maior parte das pessoas que receberam. Devido à dificuldade de aplicar doses de reforço a grandes populações, é recomendada a fabricação de vacinas que gerem proteção imunológica duradoura. Além disso, é importante que as vacinas tenham baixo custo para serem administradas ao maior número possível de indivíduos (HINDS; RUST; SCOVINO, 2008).

3.2.10 Tratamento

Os interferons são potentes mediadores seletivos de modificações celulares que induzem a uma série de efeitos antivirais, antiproliferativos e imunológicos, os quais coletivamente afetam a suscetibilidade da célula hospedeira às infecções virais (ROTBART, 2002). Os genes induzidos pelo interferon de tipo I incluem a serina/treonina proteína cinase ativada por RNA de fita dupla, que bloqueia a transcrição viral e os eventos de tradução e a 2', 5' oligoadenilato sintetase e a RNase L18 e 19, que promovem a degradação do RNA viral (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). Clinicamente, as crianças com meningite aguda por enterovírus têm elevações significativas nos níveis de interferon endógeno no líquido LCR, o que pode ser importante na resposta à infecção. Os interferons também podem trabalhar em conjunto com os anticorpos humorais e os macrófagos para eliminar as infecções por picornavírus (ROTBART, 2002).

Há relatos de sucesso clínico com soro ou plasma materno ou preparações comerciais de imunoglobulina contra uma variedade de sorotipos de enterovírus causando sepse neonatal. Portanto, anticorpos podem ser utilizados de forma profilática e terapêutica contra os enterovírus em duas situações clínicas: o recém-nato e o hospedeiro imunossuprimido. Eles agem se ligando aos enterovírus e impedindo a fixação e a ligação dos mesmos às células do hospedeiro (ROTBART, 2002). Apesar de a imunoglobulina intravenosa proteger esses pacientes da poliomielite e estabilizar e melhorar algumas das infecções, a doença pode progredir. A maioria destas infecções, contudo, cessa espontaneamente. Em alguns casos, a eficácia pode ser limitada por quantidades inadequadas do anticorpo relevante no pool de imunoglobulina (por exemplo, se a infecção envolve um

sorotipo incomum e raro de enterovírus), bem como problemas em alcançar os níveis adequados de anticorpo nas células infectadas (PALLANSCH; ROOS, 2007).

Os compostos inibidores do capsídeo bloqueiam a decapsidação e/ou adsorção viral nos seus receptores celulares. Vários compostos podem preencher as bolsas hidrofóbicas localizadas sobre os cânions, formados pela junção entre VP1 e VP3 na superfície viral, aumentando a estabilidade do capsídeo e tornando o vírus mais resistente à decapsidação. Por exemplo, o disoxaril demonstrou moderada atividade contra os rinovírus, *in vitro*, e foi muito ativo contra os enterovírus tanto *in vitro* como *in vivo* (ROTBART, 2002). O pleconaril demonstrou inibir a replicação de 90% dos rinovírus e mais de 99% dos enterovírus, além de ser altamente biodisponível por via oral (HAYDEN et al., 2003). Em camundongos com infecção de múltiplos órgãos, após a inoculação intracraniana de enterovírus, o pleconaril reduziu o título viral em todos os órgãos afetados e preveniu a morte dos animais (ROTBART, 2002). A droga enviroxime tem como alvo antiviral a proteína não estrutural 3A, levando a um bloqueio da síntese de cadeias adicionais de RNA viral. Embora este composto iniba os enterovírus e os rinovírus em infecções *in vitro*, ele é tóxico e ineficaz em seres humanos. A resistência à droga enviroxime é determinada por alterações no aminoácido na posição 30 na proteína 3A (PALLANSCH; ROOS, 2007).

A administração de pequenos RNAs de interferência (RNAsi) também foi analisada como uma possível estratégia para o controle de infecções por enterovírus. Esta abordagem tem sido usada para inibir, *in vitro*, as infecções dos poliovírus assim como dos coxsackievírus B3. O uso de um conjunto de RNAsi pode ser capaz de limitar o aparecimento de vírus resistentes resultantes de mutações (PALLANSCH; ROOS, 2007).

3.3 PRODUTOS NATURAIS

Há milhares de anos, o homem vem utilizando os recursos da flora no tratamento de diversas patologias. Há relatos, por exemplo, do uso de plantas com finalidades terapêuticas por volta de 3.000 a.C. na obra *Pen Ts'ao* do chinês Shen Nung. O isolamento da morfina da *Papaver somniferum*, em 1803, pelo farmacêutico Friedrich Wilhelm Adam Sertürner marcou o início do processo de extração de princípios ativos de plantas (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). Além da morfina, o

conhecimento etnofarmacológico acumulado ao longo do tempo culminou com o desenvolvimento de outros fármacos de grande importância na terapêutica atual, tais como o ácido salicílico, a atropina, a pilocarpina, o quinino, a artemisinina, o taxol e a digoxina (ALVES, 2001). As plantas medicinais desempenham, portanto, papel muito importante na medicina moderna. Primeiramente porque podem fornecer fármacos extremamente importantes, os quais dificilmente seriam obtidos via síntese química, como por exemplo, os alcalóides da *Papaver somniferum* e os glicosídeos cardiotônicos da *Digitalis* spp. Em segundo lugar, as fontes naturais fornecem compostos que podem ser levemente modificados, tornando-os mais eficazes ou menos tóxicos. Por fim, os produtos naturais podem ser utilizados como protótipos para obtenção de fármacos com atividades terapêuticas semelhantes a dos compostos originais (TUROLA; NASCIMENTO, 2006).

O Brasil apresenta uma das mais ricas biodiversidades em espécies vegetais, uma vez que detém 1/3 das espécies conhecidas, o que proporciona ao país o maior potencial para pesquisa com plantas medicinais (BELLA CRUZ, 2011). As espécies nativas brasileiras são amplamente empregadas na medicina popular de acordo com conhecimentos desenvolvidos inicialmente por comunidades indígenas (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2007). Aproximadamente 80% da população mundial utiliza a medicina tradicional para o atendimento de suas necessidades primárias de saúde (FEITOSA, 2014). Porém as pesquisas com plantas medicinais necessitam de investigações etnobotânicas, fitoquímicas e farmacológicas que contribuam para a utilização terapêutica de espécies da medicina tradicional (MACIEL; PINTO; JUNIOR, 2002). Estima-se que pelo menos 25% de todos os medicamentos modernos são derivados direta ou indiretamente de plantas medicinais, principalmente por meio da aplicação de tecnologias modernas ao conhecimento tradicional (BRASIL, 2012a).

O metabolismo primário das plantas é responsável pela produção de celulose, ligninas, proteínas, lipídeos, açúcares e outras substâncias, que realizam suas principais funções vitais. Já o metabolismo secundário é responsável pela biossíntese de moléculas muito diversificadas estruturalmente e a função delas é proteger as plantas de agentes nocivos, tais como microrganismos patogênicos, insetos fitófagos e herbívoros predadores (SANTOS, 2007). Esses produtos naturais podem ser considerados uma grande fonte de novas moléculas com efeitos farmacológicos (COS et al., 2006). Dentre os metabólitos bioativos encontram-se:

alcaloides, taninos, cumarinas, terpenos, polissacarídeos, ácidos fenólicos, flavonoides e saponinas triterpênicas (LÜCKEMEYER, 2009). Assim sendo, uma das estratégias na busca de novos fármacos antivirais derivados de produtos naturais baseia-se no estudo de extratos de plantas medicinais. Vários estudos têm sido realizados com o intuito de avaliar a atividade anti-HSV e anti-PV de extratos destas plantas (Tabela 3) e de compostos delas isolados (Tabela 4), utilizando informações etnofarmacológicas como base para a seleção das espécies.

Tabela 3 - Lista de extratos de plantas com atividade anti-HSV ou anti-PV

Planta de origem	Extrato	Atividade Antiviral	Fonte (Autores)
<i>Swertia chirata</i>	Aquoso	HSV-1	Verma et al., 2008
<i>Salvia officinalis</i>	Aquoso e Etanólico	HSV-1/HSV-2	Schnitzler et al., 2008
<i>Phyllanthus orbicularis</i>	Aquoso	HSV-1/HSV-2	Álvarez et al., 2009
<i>Rhus aromatica</i>	Aquoso	HSV-1/HSV-2	Reichling et al., 2009
<i>Calissia flagrans</i>	Etanólico	HSV-1/HSV-2	Yarmolinsky et al., 2010
<i>Gynura procumbens</i>	Etanólico	HSV-1/HSV-2	Jarikasem et al., 2013
<i>Passiflora edulis</i>	Etanólico	HSV-1/HSV-2	Jabareen; Huleihil; Huleihil, 2013
<i>Eupatorium buniifolium</i>	Orgânico	PV-1	Jaime et al., 2013
<i>Senna siamea</i>	Metanólico	PV-1	Ogbole et al., 2013
<i>Zephyranthes candida</i>	Metanólico	PV-1	Oluyemisi et al., 2014

Tabela 4 - Lista de compostos extraídos de plantas com atividade anti-HSV ou anti-PV

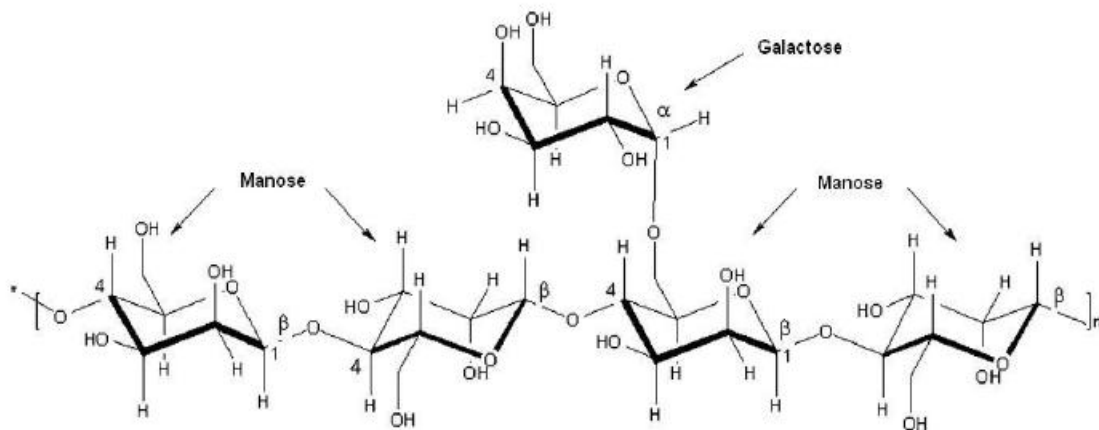
Planta de origem	Compostos extraídos	Atividade Antiviral para	Fonte (Autores)
<i>Terminalia arjuna</i>	Tanino	HSV-2	Cheng; Lin; Lin, 2002
<i>Solanum torvum</i>	Glicosídeos esteroides e isoflavonoides	HSV-1	Arthan et al., 2002
<i>Heteropteris aphrodisiaca</i>	Nitro-alifático	PV-1	Melo et al., 2008
<i>Mimosa scabrella</i>	Galactomanana	HSV-1	Chrestani et al., 2009
<i>Anagallis arvensis</i>	Saponina Triterpência	HSV-1	Lückemeyer, 2009
<i>Leucaena leucocephala</i>	Galactomanana	HSV-1	Ono, 2010
<i>Isatis indigotica</i>	Alcaloides	HSV-2	Sun et al., 2010
<i>Polygonatum cyrtonema</i>	Polissacarídeo	HSV-2	Liu et al., 2011
<i>Ocotea notata</i>	Flavonoide	HSV-1/HSV-2	Garrett et al., 2012
<i>Azadirachta indica</i>	Polissacarídeo	PV-1	Faccin-Galhardi et al., 2012
<i>Caesalpinia ferrea</i>	Polissacarídeo	PV-1/HSV-1	Lopes et al., 2013
<i>Adenantha pavonina</i>	Polissacarídeo	PV-1	Godoi et al., 2014
<i>Ferula assa-foetida</i>	Cumarinas	HSV-1	Ghannadi et al., 2014

3.3.1 Galactomananas

Os polissacarídeos de reserva da parede celular são classificados em três grupos distintos: as mananas, as xiloglucanas e as (arabino) galactanas. Esta classificação é baseada essencialmente na estrutura química desses polímeros, sendo as mananas subdivididas em mananas puras, glucomananas e galactomananas (MONTEIRO, 2009). Estas últimas são polissacarídeos neutros,

extraídos do endosperma de certas espécies de leguminosas, constituindo o segundo maior grupo de açúcares de reserva de energia nas plantas superiores (GEMIN, 2008). O papel fisiológico das galactomananas em sementes está relacionado com a manutenção e regulação da água durante a germinação, além de atuar no mecanismo de proteção contra alguns predadores (FERREIRA; BORGHETTI, 2004). Sua estrutura é dada por um esqueleto constituído de repetidas unidades de β -D-manose, que se encontram unidas por ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 4). As unidades de α -D-galactose apresentam-se presas à cadeia principal por ligações do tipo (1 \rightarrow 6), como substituintes (Figura 15) (GEMIN, 2008).

Figura 15 - Estrutura geral das galactomananas



Fonte: adaptado de Secouard, Grisel e Malhiac (2007).

Embora um grande número de espécies vegetais apresente estoques de galactomananas em suas sementes, a família *Fabacea* (*Leguminosae*) tem sido destacada pela sua abundância (ALVES, 2013). Além disso, esses polissacarídeos podem ser provenientes de algumas fontes microbiológicas, como fungos e líquens (MONTEIRO, 2009). Em particular, as galactomananas procedentes de fontes latino-americanas são pouco utilizadas industrialmente, apesar da rica biodiversidade da flora local e do clima favorável para a sua produção ou para o desenvolvimento das espécies nativas (AZERO; ANDRADE, 2002).

As galactomananas apresentam características moleculares distintas em solução, como diferentes conformações, fato muitas vezes atribuído ao resultado direto da massa molecular ou de diferenças de comprimento da cadeia polimérica, bem como de seus substituintes (POLLARD et al., 2010; SEMENOVA, 2007). Com

suas diferentes propriedades físico-químicas, elas são um material versátil, com muitas aplicações. Em sistemas aquosos simples, esses polissacarídeos são viscosificadores e espessantes eficazes e excelentes estabilizadores de emulsões. A ausência de toxicidade, também favorece a sua utilização na indústria têxtil, alimentícia, biomédica, cosmética e farmacêutica. Nesta última, elas têm sido utilizadas como veículo para agentes farmacêuticos, pois podem atuar como matriz na liberação controlada de drogas devido a sua biocompatibilidade e por produzir uma cinética de liberação de aproximadamente zero (VENDRUSCOLO et al., 2005).

A razão manose/galactose (M/G) varia dependendo da origem da planta e do processo de extração. A solubilidade em água está associada ao conteúdo de galactose substituinte (quanto mais galactose houver e, portanto, menor for a razão M/G, maior a solubilidade em água) (LUCYSZYN, 2004). Assim, as mananas, por exemplo, as quais não apresentam substituição, são insolúveis em água, ao contrário das galactomananas que são solúveis e formam dispersões viscosas e estáveis. As principais fontes comerciais desses polissacarídeos são: a goma guar (*Cyamopsis tetragonolobus*), a goma caroba ou locusta (*Ceratonia siliqua*) e a goma tara (*Caesalpinia spinosa*) (MONTEIRO, 2009).

3.3.2 *Dimorphandra gardneriana*

A *Dimorphandra gardneriana*, conhecida como fava d'anta ou faveira, é uma árvore nativa brasileira, pertencente à família *Fabaceae* (*Leguminosae*), ocorrendo naturalmente nos estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Bahia, Pará, Goiás, Mato Grosso e Minas Gerais (MONTANO et al., 2007). No interior da Floresta Nacional do Araripe, a *D. gardneriana* ocorre em áreas mais abertas e de luminosidade e possui um porte arbóreo que pode atingir entre 8 a 14 metros (MONTEIRO, 2009; SILVA, 2007). A anta (*Tapirus terrestris*) é considerada um importante consumidor natural de seus frutos e um dispersor potencial das sementes (BIZERRIL; RODRIGUES; HASS, 2005). Os frutos destas faveiras são vagens semideiscentes compridas, medindo até 15 cm de comprimento com mesocarpo farináceo, adocicado, muito procurado pelo gado. O período de maturação das vagens e formação das sementes é de julho a agosto, podendo estender-se, em algumas áreas, até setembro (MONTEIRO, 2009).

Os flavonoides, biossintetizados a partir da via dos fenilpropanoides, constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais (CARVALHO et al., 2003). Na caracterização de classes químicas no extrato etanólico dos frutos de *D. gardneriana*, Santos et al. (2006) observaram a presença de várias subclasses de flavonoides (flavonois, flavanonas, flavononois e/ou xantanas, livres ou seus heterosídeos) (LANDIM, 2012). Portanto, esse é o caso das espécies do gênero *Dimorphandra*, cujos frutos têm concentrações consideráveis de flavonoides, principalmente rutina e quercetina, tornando a planta economicamente importante para a indústria farmacológica (SUDRÉ et al., 2011). A exportação da rutina até outubro de 2014 representou cerca de US \$ 5,2 milhões (ABIQUIFI, 2014). Para extrair a rutina, cerca de 12000 toneladas por ano de frutos de *Dimorphandra gardneriana* Tul. e *Dimorphandra mollis* são usadas e, cerca de 600 toneladas por ano de sementes são descartadas. Destes descartes, cerca de 160 toneladas por ano de galactomananas poderiam ser produzidas aumentando o valor econômico destas plantações (CUNHA et al., 2009). As sementes são consideradas uma fonte produtora renovável, visto que elas advêm de frutos e isso não acarreta a destruição da árvore (GEMIN, 2008).

A rutina aumenta o tônus venoso, e acredita-se que tenha uma ação “impermeabilizante capilar”, devido à inibição da hialuronidase. Tal ação impediria a passagem de proteínas que contribuiriam para a formação do edema (ARAÚJO, 2003). Ela também atua ativando a enzima antioxidante superóxido dismutase, promovendo efeitos benéficos como elevação do colesterol HDL e diminuição dos fatores de risco para a aterosclerose e doenças cardiovasculares (RODRIGUES et al., 2003). Como atua no fortalecimento da estrutura da parede dos vasos sanguíneos é usada no tratamento e prevenção de pequenas varizes e, por estimular a circulação, é também usada em mesoterapia ou intradermoterapia nos tratamentos contra celulite. É empregada ainda para o preparo de cirurgias em pacientes afetados com icterícia e exerce uma influência benéfica sobre as hemorragias produzidas no tratamento profilático de trombose (SILVA, 2007).

A quercetina é outra substância extraída da faveira e de grande interesse da indústria farmacêutica. Quimicamente, é uma aglucona da rutina e de outros glicosídeos. Possui atividade cardiovascular, reduzindo o risco de morte por doenças das coronárias e diminuindo a incidência de infarto do miocárdio (SILVA, 2007). É

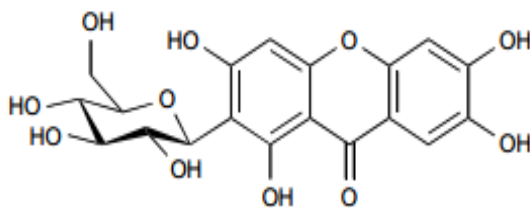
um poderoso antioxidante e antirradical livre (FILHO; SILVA; BOVERIS, 2001). Apresenta várias outras propriedades farmacológicas como atividades: anticarcinogênica (ANGST et al., 2013; KANEUCHI et al., 2003; LIN et al., 2002), antidiabética (GASPARIN et al., 2003; VESSAL; HEMMATI; VASEI, 2003), anti-inflamatória e imunomoduladora (CHO et al., 2003), antifibrótica (YOON et al., 2012), antiviral (CARVALHO et al., 2013), gastroprotetora (KAHRAMAN et al., 2003), hepatoprotetora (LEE et al., 2003) e neuroprotetora (DOK-GO et al., 2003).

Os frutos de *D. gardneriana* foram tradicionalmente usados para cura de coceiras pelos índios Paresi de Mato Grosso (SILVA, 2007). Na medicina popular brasileira a planta é usada contra câncer, conjuntivite, tosse, gripe (RIBEIRO et al., 2014), dor nas costas (LOZANO et al., 2014), hemorroidas, veias varicosas, hematomas, doenças vasculares (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007), picada de cobra (SILVA, 2013) e como estimulante (ALVES; POVH, 2013).

3.3.3 Mangiferina

A mangiferina (2-C- β -D-glicopiranosil-1,3,6,7-tetrahidroxi-xantona) é uma xantona glicosilada (Figura 16) isolada de várias plantas, tais como a *Mangifera indica* L. (mangueira), que pertence à família *Anacardiaceae* (BARRETO et al., 2008).

Figura 16 - Estrutura química da mangiferina



Fonte: Mirza, Chi e Chi (2013).

O pesquisador Singh (2006) relatou que a mangiferina desempenha importante papel fisiológico na indução do crescimento vegetativo da mangueira e na inibição da ocorrência de malformação. Empiricamente é usada contra gripe (ALVES; POVH, 2013), diarreia, coceira (WAUTHOZ et al., 2007), vômitos (BOULLARD, 2001), reumatismo (GRENARD; MORETTI; JACQUENIN, 2004), asma

e distúrbios gástricos (NÚÑEZ-SELLÉS, 2005). Também exerce efeito preventivo e terapêutico contra uma considerável gama de doenças, pois apresenta as seguintes atividades farmacológicas: neuroprotetora (AMAZZAL et al., 2007; GOTTLIEB et al., 2006), cardioprotetora (NAIR; DEVI, 2006; PRABHU et al., 2006), hepatoprotetora (YOSHIKAWA et al., 2002), antioxidante (ANDREU et al., 2005; CHEN et al., 2008), anti-inflamatória e imunomoduladora (LEIRO et al., 2004; SARKAR et al., 2004), anticarcinogênica (JAGETIA; VENKATESHA, 2006; RAJENDRAN; EKAMBARAM; SAKTHISEKARAN, 2008), antidiabética e antiaterogênica (MURUGANANDAN et al., 2005).

A atividade antimicrobiana já foi relatada contra sete bactérias (*Bacillus pumilus*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *S. citreus*, *Escherichia coli*, *Salmonella agona*, *Klebsiella pneumoniae*), uma levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), quatro fungos (*Thermoascus aurantiacus*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus flavus* e *A. fumigatus*) e um protozoário (*Cryptosporidium parvum*) (PERRUCCI et al., 2006; STOILOVA et al., 2005). Além disso, a atividade antiviral da mangiferina também já foi demonstrada contra o HIV-1 (WANG et al., 2011), o HSV-1 e o HSV-2 (YOOSOOK et al., 2000).

Em razão do grande número de estudos farmacológicos mostrando os efeitos benéficos da mangiferina para a saúde, há um interesse crescente por formulações contendo esta substância polifenólica (CANUTO, 2009). Em Cuba, por exemplo, o extrato aquoso da casca de *M. indica* é produzido em escala industrial e comercializado como suplemento nutricional (Vimang[®]), cujas inúmeras propriedades farmacológicas têm sido atribuídas em parte à mangiferina (MASIBO; HE, 2009). Este fitoterápico de origem cubana tem sido utilizado para diversas enfermidades, tais como lúpus eritematoso, asma, desordens do sistema urinário e da próstata, psoríase, entre outros (SILVA, 2011).

Enfim, considerando as perspectivas do uso industrial das galactomananas de *Dimorphandra gardneriana*, incluindo a incorporação de drogas a fim de melhorar a absorção e biodisponibilidade de compostos com baixa solubilidade e, sabendo do potencial farmacológico da mangiferina, inclusive com atividade anti-herpética já relatada em outros estudos, este trabalho avaliou a atividade antiviral desses compostos associados.

4 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

ABDEL-HAQ, N.; CHEARSKUL, P.; AL-TATARI, H.; ASMAR, B. New antiviral agents. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 73, n. 4, p. 313-321, 2006.

ABIQUIFI - Associação Brasileira da Indústria Farmacológica e de Insumos Farmacêuticos. **Exportações e importações mês a mês**. 2014. Disponível em: <<http://www.abiquifi.org.br>>. Acesso em: 09 fev. 2015.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

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

ÁLVAREZ, A. L.; DEL BARRIO, G.; KOURÍ, V.; MARTÍNEZ, P. A.; SUÁREZ, B.; PARRA, F. *In vitro* anti-herpetic activity of an aqueous extract from the plant *Phyllanthus orbicularis*. **Phytomedicine**, v. 16, n. 10, p. 960-966, 2009.

ALVES, G. S. P.; POVH, J. A. Estudo etnobotânico de plantas medicinais na comunidade de Santa Rita, Ituiutaba – MG. **Revista Biotemas**, v. 26, n. 3, p. 231-242, 2013.

ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v. 1, n. 3, p. 10-15, 2001.

ALVES, R. C. **Caracterização de gomas extraídas de seis tipos de sementes de leguminosas**. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

AMAZZAL, L.; LAPÔTRE, A.; QUIGNON, F.; BAGREL, D. Mangiferin protects against 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity mediated by oxidative stress in N2A cells. **Neuroscience Letters**, v. 418, n. 2, p. 159-164, 2007.

ANDREU, G. P.; DELGADO, R.; VELHO, J. A.; CURTI, C.; VERCESI, A. E. Iron complexing activity of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone, inhibits mitochondrial lipid peroxidation induced by Fe²⁺-citrate. **European Journal of Pharmacology**, v. 513, n. 1-2, p. 47-55, 2005.

ANGST, E.; PARK, J. L.; MORO, A.; LU, Q. Y.; LU, X.; LI, G.; KING, J.; CHEN, M.; REBER, H. A.; GO, V. L. W.; EIBL, G.; HINES, O. J. The flavonoid quercetin inhibits pancreatic cancer growth *in vitro* and *in vivo*. **Pancreas**, v. 42, n. 2, p. 223-229, 2013.

ARAÚJO, M. Farmacoterapia nas doenças vasculares periféricas. In: PITTA, G. B. B.; CASTRO, A. A.; BURIHAN, E. **Angiologia e cirurgia vascular: guia ilustrado**. 1 ed. Maceió: UNCISAL/ECMAL & LAVA, 2003. p. 1-13.

ARDUINO, P. G.; PORTER, S. R. Herpes simplex virus type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. **Journal of Oral Pathologic Medicine**, v. 37, n. 2, p. 107-121, 2008.

ARTHAN, D.; SVASTI, J.; KITTAKOOP, P.; PITTAYAKHACHONWUT, D.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Antiviral isoflavonoid sulfate and steroidal glycosides from the fruits of *Solanum torvum*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 4, p. 459-463, 2002.

AZERO, E. G.; ANDRADE, C. T. Testing procedures for galactomannan purification. **Polymer Testing**, v. 21, n. 5, p. 551-556, 2002.

BAKER, D. D.; CHU, M.; OZA, U.; RAJGARHIA, V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural Product Reports**, v. 24, n. 6, p. 1225-1244, 2007.

BANDYOPADHYAY, S. S.; NAVID, M. H.; GHOSH, T.; SCHNITZLER, P.; RAY, B. Structural features and in vitro antiviral activities of sulfated polysaccharides from *Sphacelaria indica*. **Phytochemistry**, v. 72, n. 2-3, p. 276-283, 2011.

BARRETO, J. C.; TREVISAN, M. T. S.; HULL, W. E.; ERBEN, G.; BRITO, E. S.; PFUNDSTEIN, B.; WÜRTELE, G.; SPIEGELHALDER, B.; OWEN, R. W. Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves and peel of mango. (*Mangifera indica* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 14, p. 5599-5610, 2008.

BELLA CRUZ, A. Potencial terapêutico de algumas plantas medicinais de flora catarinense. In: SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. **Farmacognosia – coletânea científica**. Ouro Preto: UFOP, 2011. p. 117-156.

BENDER, F. C.; WHITBECK, J. C.; LOU, H.; COHEN, G. H.; EISENBERG, R. J. Herpes simplex virus glycoprotein B binds to cell surfaces independently of heparan sulfate and blocks virus entry. **Journal of Virology**, v. 79, n. 18, p. 11588-11597, 2005.

BERTOL, J. W. **Avaliação da atividade anti-herpética de cardenólídeos e derivados**. 2011. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BIZERRIL, M. X. A.; RODRIGUES, F. H. G.; HASS, A. Fruit consumption and seed dispersal of *Dimorphandra mollis* Benth. (*Leguminosae*) by the lowland tapir in the cerrado of central Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 65, n. 3, p. 407-413, 2005.

BOULLARD, B. **Plantes Médicinales du Monde, Réalités et Croyances**. 1. ed. Paris: Estem, 2001. 645 p.

BRADY, R. C.; BERNSTEIN, D. I. Treatment of herpes simplex virus infections. **Antiviral Research**, v. 61, n. 2, p. 73-81, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde, secretaria de atenção à saúde, departamento de atenção básica. **Práticas integrativas e complementares – plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica**. 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2012a. 156 p.

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

BRASIL. Ministério da Saúde, secretaria de vigilância em saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 816 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação epidemiológica da poliomielite**. 2014. Disponível em: <portalsaude.saude.gov.br>. Acesso em: 09 fev. 2015.

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.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. São Paulo: McGraw-Hill, 2012. 272 p.

BUTEL, J. S. Herpesvírus. In: 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, 2012a. p. 433-455.

BUTEL, J. S. Picornavírus (grupo dos enterovírus e rinovírus). In: 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, 2012b. p. 491-505.

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

CARDONE, G.; HEYMANN, J. B.; CHENG, N.; TRUS, B. L.; STEVEN, A. C. Procapsid assembly, maturation, nuclear exit: dynamic steps in the production of infectious herpesvirions. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 726, n. 1, p. 423-439, 2012.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 519-536.

CARVALHO, L. H. F.; WECKX. Uso universal da vacina inativada contra poliomielite. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 3, p. 75-82, 2006.

CARVALHO, O. V.; OLIVEIRA, F. S.; SARAIVA, G. L.; BOTELHO, C. V.; FERREIRA, H. C. C.; SANTOS, M. R.; JÚNIOR, A. S.; ALMEIDA, M. R. Potencial antiviral da quercetina sobre o parvovírus canino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 2, p. 353-358, 2013.

CASAGRANDE, R. A. **Herpes simplex tipo 1 (HSV-1) em saguis (*Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata*) – Caracterização anatomopatológica e molecular**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Global Health Polio. **Our Progress Against Polio**, 2014.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Incidence, prevalence, and cost of sexually transmitted infections in the United States**, p. 1-4, 2013.

CHATTOPADHYAY, D.; CHAWLA-SARKAR, M.; CHATTERJEE, T.; DEY, R. S.; BAG, P.; CHAKRABORTI, S.; KHAN, M. T. H. Recent advancements for the evaluation of anti-viral activities of natural products. **New Biotechnology**, v. 25, n. 5, p. 347-368, 2009.

CHEN, Y. H.; CHANG, F. R.; LIN, Y. J.; HSIEH, P. W.; WU, M. J.; WU, Y. C. Identification of antioxidants from rhizome of *Davallia solida*. **Food Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 684-691, 2008.

CHENG, H. Y.; LIN, C. C.; LIN, T. C. Antiherpes simplex virus type 2 activity of casuarinin from the bark of *Terminalia arjuna* Linn. **Antiviral Research**, v. 55, n. 3, p. 447-455, 2002.

CHO, S. Y.; PARK, S. J.; KWON, M. J.; JEONG, T. S.; BOK, S. H.; CHOI, W. Y.; JEONG, W. I.; RYU, S. Y.; DO, S. H.; LEE, C. S.; SONG, J. C.; JEONG, K. S. Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF-kappa B pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 243, n. 1-2, p. 153-160, 2003.

CHRESTANI, F.; SIERAKOWSKI, M. R.; UCHOA, D. E. A.; NOZAWA, C.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A.; ONO, L. *In vitro* antiherpetic and antirotaviral activities of a sulfate prepared from *Mimosa scabrella* galactomannan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, n. 5, p. 453-457, 2009.

CLEMENT, C.; TIWARI, V.; SCANLAN, P. M.; VALYI-NAGY, T.; YUE, B. Y. J. T.; SHUKLA, D. A novel role for phagocytosis-like uptake in herpes simplex virus entry. **The Journal of Cell Biology**, v. 174, n. 7, p. 1009-1021, 2006.

COEN, D. M.; RICHMAN, D. D. Antiviral Agents. In: KNIFE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 448-485.

COS, P.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 290-302, 2006.

CUNHA, P. L. R.; VIEIRA, I. G. P.; ARRIAGA, A. M. C.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Isolation and characterization of galactomannan from *Dimorphandra gardneriana* Tul. seeds as a potential guar gum substitute. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 880-885, 2009.

DE CLERCQ, E. Antiviral drugs in current clinical use. **Journal of Clinical Virology**, v. 30, n. 2, p. 115-133, 2004.

DOK-GO, H.; LEE, K. H.; KIM, H. J.; LEE, E. H.; LEE, J.; SONG, Y. S.; LEE, Y. H.; JIN, C.; LEE, Y. S.; CHO, J. Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (1)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. **Brain Research**, v. 965, n. 1-2, p. 130-136, 2003.

DREAMSTIME. **Structure of the herpesvirus virion**. 2015. Disponível em: <www.dreamstime.com>. Acesso em: 09 fev. 2015.

DYKE, K. V.; WOODFORK, K. Fármacos antivirais. In: CRAIG, C. R.; STITZEL, R. E. **Farmacologia moderna: com aplicações clínicas**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

ELLERMANN-ERIKSEN, S. Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus. **Virology Journal**, v. 2, n. 59, p. 1-30, 2005.

FACCIN-GALHARDI, L. C.; YAMAMOTO, K. A.; RAY, B.; CARVALHO, R. E. L.; NOZAWA, C. The *in vitro* antiviral property of *Azadirachta indica* polysaccharides for poliovirus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 1, p. 86-90, 2012.

FEITOSA, L. G. P. **Caracterização dos alcaloides eritrínicos de *Erythrina verna***. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

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

FILHO, D. W.; SILVA, E. L.; BOVERIS, A. Flavonoides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. 1. ed. São Paulo: Universitária, 2001.

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

GARRETT, R.; ROMANOS, M. T. V.; BORGES, R. M.; SANTOS, M. G.; ROCHA, L.; SILVA, A. J. R. Antiherpetic activity of a flavonoid fraction from *Ocotea notata* leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 2, p. 306-313, 2012.

GASPARIN, F. R.; SPITZNER, F. L.; ISHII-IWAMOTO, E. L.; BRACHT, A.; CONSTANTIN, J. Actions of quercetin on gluconeogenesis and glycolysis in rat liver. **Xenobiotica**, v. 33, n. 9, p. 903-911, 2003.

GEMIN, E. **Determinação da atividade antiviral de galactomananas sulfatadas contra o vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1)**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

GHANNADI, A.; FATTAHIAN, K.; SHOKOOHINIA, Y.; BEHBAHANI, M.; SHAHNOUSH, A. Anti-viral evaluation of sesquiterpene coumarins from *Ferula assafoetida* against HSV-1. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 2, p. 523-530, 2014.

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

GODOI, A. M.; FACCIN-GALHARDI, L. C.; LOPES, N.; RECHENCHOSKI, D. Z.; ALMEIDA, R. R.; RICARDO, N. M. P. S.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Antiviral activity of sulfated polysaccharide of *Adenantha pavonina* against poliovirus in HEp-2 cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2014.

GOMES, M. C. C. **Triagem da potencial atividade antiviral de peptídeos antimicrobianos e da hemolinfa de ostras**. 2005. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

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

GOTTLIEB, M.; LEAL-CAMPANARIO, R.; CAMPOS-ESPARZA, M. R.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, M. V.; ALBERDI, E.; ARRANZ, A.; DELGADO-GARCÍA, J. M.; GRUART, A.; MATUTE, C. Neuroprotection by two polyphenols following excitotoxicity and experimental ischemia, **Neurobiology of Disease**, v. 23, n. 2, p. 374-386, 2006.

GPEI - Global Polio Eradication Initiative. **Annual report 2015**. WHO press, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2015.

GRECARD, P.; MORETTI, C.; JACQUENIN H. **Pharmacopée Traditionnelle em Guyane**. 1. ed. Paris: IRD, 2004. 103 p.

GUPTA, R.; WARREN, T.; WALD, A. Genital herpes. **The Lancet**, v. 370, n. 9605, p. 2127-2137, 2007.

HANCOCK, M. H.; CORCORAN, J. A.; SMILEY, J. R. Herpes simplex virus regulatory proteins VP16 and ICP0 counteract an innate intranuclear barrier to viral gene expression. **Virology**, v. 352, n. 1, p. 237-252, 2006.

- HAYDEN, F. G.; HERRINGTON, D. T.; COATS, T. L.; KIM, K.; COOPER, E. C.; VILLANO, S. A.; LIU, S.; HUDSON, S.; PEVEAR, D. C.; COLLETT, M.; MCKINLAY, M. Efficacy and safety of oral pleconaril for treatment of colds due to picornaviruses in adults: results of 2 double-blind, randomized, placebo-controlled trials. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 12, p. 1523-1532, 2003.
- HELDWEIN, E. E.; LOU, H.; BENDER, F. C.; COHEN, G. H.; EISENBERG, R. J.; HARRISON, S. C. Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. **Science**, v. 313, n. 5784, p. 217- 220, 2006.
- HINDS, L. B. A.; RUST, N. M.; SCOVINO, A. M. Resposta do Hospedeiro às Viroses. In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à Virologia Humana**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 59-82.
- JABAREEN, A.; HULEIHIL, M.; HULEIHEL, M. Effect of extracts of *Passiflora edulis* leaves on herpes viruses infection. **Journal of Virology & Antiviral Research**, v. 2, n. 2, p. 1-6, 2013.
- JAGETIA, G. C.; VENKATESHA, V. A. Mangiferin protects human peripheral blood lymphocytes against γ -radiation-induced DNA strand breaks: a fluorescence analysis of DNA unwinding assay. **Nutrition Research**, v. 26, n. 6, p. 303-311, 2006.
- JAIME, M. F. V.; CAMPOS, R. H.; MARTINO, V. S.; CAVALLARO, L. V.; MUSCHIETTI, L. V. Antipoliiovirus activity of the organic extract of *Eupatorium buniifolium*: isolation of euparin as an active compound. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2013.
- JARIKASEM, S.; CHARUWICHITRATANA, S.; SIRITANTIKORN, S.; CHANTRATITA, W.; ISKANDER, M.; FRAHM, A. W.; JIRATCHARIYAKUL, W. Antiherpetic effects of *Gynura procumbens*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2013.
- JOHNSON, D.; WEBB, M.; WISNER, T. W.; BRUNETTI, C. Herpes simplex virus gE/gI sorts nascent virions to epithelial cell junctions, promoting virus spread. **Journal of Virology**, v. 75, n. 2, p. 821-833, 2001.
- KAHRAMAN, A.; ERKASAP, N.; KÖKEN, T.; SERTESER, M.; AKTEPE, F.; ERKASAP, S. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. **Toxicology**, v. 183, n. 1-3, p. 133-142, 2003.
- KANEUCHI, M.; SASAKI, M.; TANAKA, Y.; SAKURAGI, N.; FUJIMOTO, S.; DAHIYA R. Quercetin regulates growth of Ishikawa cells through the suppression of EGF and cyclin D1. **International Journal of Oncology**, v. 22, n. 1, p. 159-164, 2003.
- KIM, J. **Herpes simplex virus type 1 glycoprotein gm and the membrane associated protein U_L11 are required for virus-induced cell fusion and efficient virus entry**. 2011. Dissertation (Doctorate in Philosophy) - Konkuk University, Seul.
- KIMBERLIN, D. W. Herpes simplex virus infections of the central nervous system. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v.14, n. 2, p. 83-89, 2003.

KNIPE, D. M.; CLIFFE, A. Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 211-221, 2008.

KOELLE, D. M.; COREY, L. Recent progress in herpes simplex virus immunobiology and vaccine research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 1, p. 96-113, 2003.

KUCHENBECKER, R. S. Antivirais. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia Clínica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

LANDIM, L. P. **Quantificação de flavonóides em extratos de *Dimorphandra gardneriana* Tulasne e avaliação de propriedades antioxidantes e fotoestabilidade**. 2012. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) – Universidade Regional do Cariri (URCA), Ceará.

LEE, E. S.; LEE, H. E.; SHIN, J. Y.; YOON, S.; MOON, J. O. The flavonoid quercetin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 55, n. 8, p. 1169-1174, 2003.

LEGOFF, J.; PÉRE, H.; BÉLEC, L. Diagnosis of genital herpes simplex virus infection in the clinical laboratory. **Virology Journal**, v. 11, n. 83, p. 1-17, 2014.

LEIRO, J.; ARRANZ, J. A.; YÁÑEZ, M.; UBEIRA, F. M.; SANMARTÍN, M. L.; ORALLO, F. Expression profiles of genes involved in the mouse nuclear factor-kappa signal transduction pathway are modulated by mangiferin. **International Immunopharmacology**, v. 4, n. 6, p. 763-778, 2004.

LIAW, F. Y.; HUANG, C. F.; HSUEH, J. T.; CHIANG, C. P. Eczema herpeticum: a medical emergency. **Case report of canadian family physician**, v. 58, n. 12, p. 1358-1361, 2012.

LIN, S. Y.; TSAI, S. J.; WANG, L. H.; WU, M. F.; LEE, H. Protection by quercetin against cooking oil fumes-induced DNA damage in human lung adenocarcinoma CL-3 cells: role of COX-2. **Nutrition and Cancer**, v. 44, n. 1, p. 95-101, 2002.

LIU, X. X.; WAN, Z. J.; SHI, L.; LU, X. X. Preparation and antiherpetic activities of chemically modified polysaccharides from *Polygonatum cyrtonema* Hua. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 737-742, 2011.

LOOKER, K. J.; GARNETT, G. P.; SCHMID, G. P. An estimate of the global prevalence and incidence of herpes simplex virus type 2 infection. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 86, n. 10, p. 805– 812, 2008.

LOPES, N. **Avaliação da atividade antiviral de um polissacarídeo sulfatado de *Caesalpinia ferrea* e do flavonoide quercetina contra o vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

LOPES, N.; FACCIN-GALHARDI, L. C.; ESPADA, S. F.; RICARDO, N. M. P. S.; LINHARES, R. E. C.; NOZAWA, C. Sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplex virus and poliovirus. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, n. 1, p. 93-99, 2013.

LOZANO, A.; ARAÚJO, E. L.; MEDEIROS, M. F. T.; ALBUQUERQUE, U. P. The apparency hypothesis applied to a local pharmacopoeia in the Brazilian northeast. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 10, n. 2, p. 1-17, 2014.

LU, W. W.; SUN, J. R.; WU, S. S.; LIN, W. H.; KUNG, S. H. A dual reporter cell assay for identifying serotype and drug susceptibility of herpes simplex virus. **Analytical Biochemistry**, v. 415, n. 2, p. 97-104, 2011.

LÜCKEMEYER, D. D. **Avaliação da ação anti-herpética de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliacea (erva-mate)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

LUCYSZYN, N. **Aplicação de galactomananas como substitutas parciais do ágar no cultivo de tecidos vegetais**. 2004. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

LUPI, O. Imunoprofilaxia anti-herpética utilizando vírus geneticamente modificado: vacina DISC. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 3, p. 345-353, 2003.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; JUNIOR, V. F. V. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MASIBO, M.; HE, Q. Mango bioactive compounds and related nutraceutical properties - a review. **Food Reviews International**, v. 25, n. 4, p. 346–370, 2009.

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, n. 2, p. 136-139, 2008.

METTENLEITER, T. C. Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: The herpesvirus assembly puzzle. **Veterinary Microbiology**, v. 113, n. 3-4, p. 163-169, 2006.

MINOR, P. D. Polio eradication, cessation of vaccination and re-emergence of disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 6, p. 473-482, 2004.

MIRZA, R. H.; CHI, N.; CHI, Y. Therapeutic potential of the natural product mangiferin in metabolic syndrome. **Journal of Nutritional Therapeutics**, v. 2, n. 2, p. 74-79, 2013.

MONTANO, H. G.; SILVA, G. S.; ROCHA, R. C.; JIMENEZ, N. Z. A.; PEREIRA, R. C.; BRIOSO, P. S. T. Phytoplasma in “fava d’anta” tree (*Dimorphandra gardneriana*) in Brazil. **Bulletin of Insectology**, v. 60, n. 2, p. 147-148, 2007.

MONTEIRO, A. A. S. **Síntese e caracterização de géis de galactomanana de fava d'anta (*Dimorphandra gardneriana*) para aplicação biológica.** 2009. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MOSTAFA, H. H.; DAVIDO, D. J. Herpes simplex virus 1 ICP22 but not U_S 1.5 is required for efficient acute replication in mice and VICE domain formation. **Journal of Virology**, v. 87, n. 24, p. 13510-13519, 2013.

MUELLER, S.; WIMMER, E.; CELLO, J. Poliovirus and poliomyelitis: a tale of guts, brains and na accidental event. **Virus Research**, v. 111, n. 2, p. 175-193, 2005.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica.** 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2009. 948 p.

MURUGANANDAN, S.; SRINIVASAN, K.; GUPTA, S.; GUPTA, P. K.; LAL, J. Effect of mangiferin on hyperglycemia and atherogenicity in streptozotocin diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 3, p. 497-501, 2005.

NAIR, P. S.; DEVI, C. S. S. Efficacy of mangiferin on serum and heart tissue lipids in rats subjected tp isoproterenol induced cardiotoxicity. **Toxicology**, v. 228, n. 2-3, p. 135-139, 2006.

NATHANSON, N.; KEW, O. M. From emergence to eradication: the epidemiology of poliomyelitis deconstructed. **American Journal of Epidemiology**, v. 172, n. 11, p. 1213-1229, 2010.

NEWCOMB, W. W.; THOMSEN, D. R.; HOMA, F. L.; BROWN, J. C. Assembly of the herpes simplex virus capsid: identification of soluble scaffold-portal complexes and their role in formation of portal-containing capsids. **Journal of Virology**, v. 77, n. 18, p. 9862-9871, 2003.

NICOLA, A. V.; STRAUS, S. E. Cellular and viral requirements for rapid endocytic entry of herpes simplex virus. **Journal of Virology**, v. 78, n. 14, p. 7508-7517, 2004.

NÚÑEZ-SELLÉS, A. J. Antioxidant therapy: myth or reality? **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 4, p. 699-710, 2005.

OGBOLE, O.; ADENIJI, J.; AJAIYEoba, E.; KAMDEM, R.; CHOUDHARY, M. Anthraquinones and triterpenoids from *Senna siamea* (*Fabaceae*) Lam inhibit poliovirus activity. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 31, p. 2955-2963, 2013.

OJIMA, I. Modern natural products chemistry and drug discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 2587-2588, 2008.

OLIVEIRA, M. C. M. **Atividade antiviral de polissacarídeo e frações de *Agaricus brasiliensis* contra o herpesvírus bovino tipo 1.** 2007. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

OLESKY, M.; MCNAMEE, E. E.; ZHOU, C.; TAYLOR, T. J.; KNIPE, D. M. Evidence for a direct interaction between HSV-1 ICP27 and ICP8 proteins. **Virology**, v. 331, n. 1, p. 94-105, 2005.

OLUYEMISI, O. O.; ORIABURE, A. E.; ADEKUNLE, A. J.; RAMSAY, K. S.; SHYYAULA, S.; CHOUDHARY, M. I. Bioassay-guided isolation of poliovirus-inhibiting constituents from *Zephyranthes candida*. **Pharmaceutical Biology**, v. 28, n. 1, p. 1-6, 2014.

ONO, L. *In vitro* antiherpetic activity of a chemically sulfated galactomannan from *Leucaena leucocephala* seeds. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 2, p. 165-170, 2010.

PALLANSCH, M.; ROOS, R. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enteroviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 840-893.

PAOLI, P. Human herpesvirus 8: na update. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 3, p. 328-335, 2004.

PENELLO, A. M.; CAMPOS, B. C.; SIMÃO, M. S.; GONÇALVES, M. S.; SOUZA, P. M. T.; SALLES, R. S.; PELLEGRINI, E. Herpes Genital. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, n. 2, p. 64-72, 2010.

PERRUCCI, S.; FICHI, G.; BUGGIANI, C.; ROSSI, G.; FLAMINI, G. Efficacy of mangiferin against *Cryptosporidium parvum* in a neonatal mouse model. **Parasitology Research**, v. 99, n. 2, p. 184-188, 2006.

POLLARD, M. A.; EDER, B.; FISCHER, P.; WINDHAB, E. J. Characterization of galactomannans isolated from legume endosperms of *Caesalpinioideae* and *Faboideae* subfamilies by multidetection aqueous SEC. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 1, p. 70-84, 2010.

PRABHU, S.; JAINU, M.; SABITHA, K. E.; DEVI, C. S. S. Role of mangiferin on biochemical alterations and antioxidant status in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 1, p. 126-133, 2006.

PROPROFS FLASHCARDS. **Virology**. 2011. Disponível em: <www.proprofs.flashcards>. Acesso em: 09 fev. 2015.

RACANIELLO, V. R. One hundred years of poliovirus pathogenesis. **Virology**, v. 344, n. 1, p. 9-16, 2006.

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.

RAJENDRAN, P.; EKAMBARAM, G.; SAKTHISEKARAN, D. Protective role of mangiferin against benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in experimental animal. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 6, p. 1053-1058, 2008.

REICHLING, J.; NEUNER A.; SHARAF M.; HARKENTHAL, M.; SCHNITZLER, P. Antiviral activity of *Rhus aromatica* (fragrant sumac) extract against two types of herpes simplex viruses in cell culture. **Pharmazie**, v. 64, n. 8, p. 538-541, 2009.

REIL, H.; BARTLIME, A.; DRERUP, J.; GREWING, T.; KORN, K. Clinical validation of a new triplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection and discrimination of herpes simplex virus types 1 and 2. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 10, n. 4, p. 361-367, 2008.

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

RHISTON, G. M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. **The American Journal of Cardiology**, v. 101, n. 10, p. 43-49, 2008.

RIBEIRO, D. A.; OLIVEIRA, L. G. S.; MACÊDO, D. G.; MENEZES, I. R. A.; COSTA, J. G. M.; SILVA, M. A. P.; LACERDA, S. R.; SOUZA, M. M. A. Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 3, p. 1522-1533, 2014.

RIEDER, E.; BRUM, M. C. *Picornaviridae*. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. 1. ed. Rio Grande do Sul: UFSM, 2007. p. 537-562.

RODRIGUES, H. G.; DINIZ, Y. S.; FAINE, L. A.; ALMEIDA, J. A.; FERNANDES, A. A. H.; NOVELLI, E. L. B. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rotina na concentração de colesterol-HDL. **Revista de Nutrição**, v.16, n. 3, p. 315-320, 2003.

ROIZMAN, B.; KNIPE, D. M. Herpes simplex viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 2400-2459.

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.

ROTBART, H. A. Treatment of picornavirus infections. **Antiviral Research**, v. 53, n. 2, p. 83-98, 2002.

SAFRIN, S. Agentes antivirais. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

SANTOS, N. K. A.; ANGÉLICO, E. C.; RODRIGUES, F. F. G.; CALDAS, G. F.; MOTA, M. L.; SILVA, M. R.; PEREIRA, C. K. B.; SOUSA, E. O.; FONSECA, A. M.; LEMOS, T. L. G.; COSTA, J. G. M. Avaliação dos constituintes químicos e atividades antioxidante e toxicidade de *Dimorphandra gardneriana* (*Leguminosae*). **Cadernos de Cultura e Ciência (URCA)**, v. 1, n. 1, p. 69-73, 2006.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007. p. 404-434

SARKAR, A.; SREENIVASAN, Y.; RAMESH, G.T.; MANNA, S. K. Beta-D-glucoside suppresses tumor necrosis factor-induced activation of nuclear transcription factor κ B but potentiates apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 32, p. 33768-33781, 2004.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 6 ed. Florianópolis: USFC, 2007. p. 371-400.

SCHNITZLER, P.; NOLKEMPER, S.; STINTZING, F. C.; REICHLING, J. Comparative *in vitro* study on the anti-herpetic effect of phytochemically characterized aqueous and ethanolic extracts of *Salvia officinalis* grown at two different locations. **Phytomedicine**, v. 15, n. 1-2, p. 62-70, 2008.

SCOLARO, M. J.; GUNNILL, L. B.; POPE, L. E.; KHALIL, M. H.; KATZ, D. H.; BERG, J. E. The antiviral drug docosanol as a treatment for Kaposi's sarcoma lesions in HIV type 1-infected patients: a pilot clinical study. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 17, n. 1, p. 35-43, 2001.

SECOUARD, S.; GRISEL, M.; MALHIAC, C. Flavour release study as a way to explain xanthan-galactomannan interactions. **Food hydrocolloids**, v. 21, n. 8, p. 1237-1244, 2007.

SEMENOVA, M.G. Thermodynamic analysis of the impact of molecular interactions on the functionality of food biopolymers in solution and in colloidal systems. **Food hydrocolloids**, v. 21, n. 1, p. 23-45, 2007.

SHUKLA, D.; SPEAR P. G. Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 4, p. 503-510, 2001.

SILVA, E. P. **Novos alquenil benzofuranos e perfil de ácidos graxos presentes nas sementes e folhas de tapirira guianensis (Anacardiaceae)**. 2011. Dissertação (Mestre em Química Orgânica) – Universidade Federal da Bahia, Salvador.

SILVA, N. F. **Contribuição do saber local na identificação de plantas medicinais prioritárias para a conservação *in situ* na Floresta Nacional do Araripe, nordeste do Brasil**. 2013. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SILVA, S. R. **Ecologia de população e aspectos etnobotânicos de *Dimorphandra gardneriana* Tullasne (Leguminosae - Mimosaceae) na chapada do Araripe, Ceará-CE**. 2007. Tese (Doutorado em Ecologia) - Universidade de Brasília, Brasília.

SILVA, S.; BOWERS, W. J. Herpes virus amplicon vectors. **Viruses**, v. 1, n. 3, p. 594-629, 2009.

SIMMONS, A. Clinical manifestations and treatment considerations of herpes simplex virus infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 1, p. 71-77, 2002.

SINGH, A.; PREIKSAITIS, J.; FERENCZY, A.; ROMANOWSKI, B. The laboratory diagnosis of herpes simplex virus infections. **The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 92-98, 2005.

SINGH, V. K. Physiological and biochemical changes with special reference to mangiferin and oxidative enzymes level in malformation resistant and susceptible cultivars of mango (*Mangifera indica* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 1, p. 43-48, 2006.

SPEAR, P. G. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 5, p. 401-410, 2004.

STOILOVA, I.; GARGOVA, S.; STOYANOVA, A.; HO, L. Antimicrobial and antioxidant activity of the polyphenol mangiferin. **Herbal Polonica**, v. 51, n. 1, p. 37-44, 2005.

SUDRÉ, C. P.; RODRIGUES, R.; GONÇALVES, L. S. A.; MARTINS, E. R.; PEREIRA, M. G.; SANTOS, M. H.; Genetic divergence among *Dimorphandra* spp. accessions using RAPD markers. **Ciência Rural**, v. 41, n. 4, p. 608-613, 2011.

SUN, D. D.; DONG, W. W.; LI, X.; ZHANG, H. Q. Indole alkaloids from the roots of *Isatis ingigotica* and their antiherpes simplex virus type 2 (HSV-2) activity *in vitro*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 46, n. 5, p. 763-766, 2010.

SWISS INSTITUTE OF BIONFORMATICS. **Enterovirus**. 2008. Disponível em: <http://viralzone.expasy.org/all_by_species/97.html>. Acesso em: 09 fev. 2015.

TAFURI, N. F. **Atividade antiviral de extratos vegetais e flavonoides contra o *bovine herpesvirus 1* (BoHV1)**. 2011. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

TAYLOR, T. J.; BROCKMAN, M. A.; MCNAMEE, E. E.; KNIPE, D. M. Herpes simplex virus. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, n. 1, p. 752-764, 2002.

TIWARI, V.; O' DONNELL, C. D.; OH, M. J.; NAGY, T. V.; SHUKLA, D. A role for 3-O-sulfotransferase isoform-4 in assisting HSV-1 entry and spread. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, n. 2, p. 930-937, 2005.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 718 p.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

TYRING, S. K.; BAKER, D.; SNOWDEN, W. Valacyclovir for herpes simplex virus infection: long-term safety and sustained efficacy after 20 years' experience with acyclovir. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 1, p. 40-46, 2002.

VENDRUSCOLO, C. W.; ANDREAZZA, I. F.; GANTER, J. L. M. S.; FERRERO, C.; BRESOLIN, T. M. B. Xanthan and galactomannan (from *M. scabrella*) matrix tablets for oral controlled delivery of theophylline. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 296, n. 1-2, p. 1-11, 2005.

VERMA, H.; PATIL, P. R.; KOLHAPURE, R. M.; GOPALKRISHNA, V. Antiviral activity of the Indian medicinal plant extract, *Swertia chirata* against herpes simplex viruses: a study by *in-vitro* and molecular approach. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 322-326, 2008.

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

VESSAL, M.; HEMMATI, M.; VASEI, M. Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 135C, n. 3, p. 357-364, 2003.

VIANNA, R. A. O.; PEREIRA, S. B.; ROCHA, A. L. C.; PEREIRA, A. C. M.; OLIVEIRA, S. A. Manifestações clínicas associadas ao herpesvírus humano tipo 6, incluindo aspectos da infecção na síndrome da imunodeficiência adquirida. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 14, n. 1, p. 49-53, 2002.

WAKIMOTO, H.; JOHNSON, P. R.; KNIPE, D. M.; CHIOCCA, E. A. Effects of innate immunity on herpes simplex virus and its ability to kill tumor cells. **Gene Therapy**, v. 10, n. 11, p. 983-990, 2003.

WANG, R. R.; GAO, Y. D.; MA, C. H.; ZHANG, X. J.; HUANG, C. G.; HUANG, J. F.; ZHENG, Y. T. Mangiferin, an anti-HIV-1 agent targeting protease and effective against resistant strains. **Molecules**, v. 16, n. 5, p. 4264-4277, 2011.

WAUTHOZ, N.; BALDE, A.; BALDE, E. S.; DAMME, M. V.; DUEZ, P. Ethnopharmacology of *Mangifera indica* L. Bark and pharmacological studies of its main C-glucosylxanthone, mangiferin. **International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 2, p. 112-119, 2007.

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

WHO - World Health Organization. **Poliomyelitis**, n. 114, 2014.

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

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

WYSOCKA, J.; HERR, W. The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, n. 6, p. 294-304, 2003.

YAMAMOTO, K. A. **Atividade antiviral de polissacarídeo e frações obtidos de produtos naturais na replicação do poliovírus e herpesvírus**. 2011. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

YARMOLINSKY, L.; ZACCAI, M.; BEN-SHABAT, S.; HULEIHEL, M. Anti-herpetic activity of *Callissia fragrans* and *Simmondsia chinensis* leaf extracts *in vitro*. **The Open Virology Journal**, v. 4, n. 1, p. 57-62, 2010.

YE, G. J.; VAUGHAN, K. T.; VALLEE, R. B.; ROIZMAN, B. The herpes simplex virus 1 U(L)34 protein interacts with a cytoplasmic dynein intermediate chain and targets nuclear membrane. **Journal of Virology**, v. 74, n. 3, p. 1355-1363, 2000.

YEH, R. W.; COEN, D. M. Farmacologia das Infecções Virais. In: GOLAN, D. E.; TASHJIAN, A. H.; ARMSTRONG, E. J.; ARMSTRONG, A. W. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 609-630.

YOON, J. S.; CHAE, M. K.; JANG, S. Y.; LEE, S. Y.; LEE, E. J. Antifibrotic effects of quercetin in primary orbital fibroblasts and orbital fat tissue cultures of graves' orbitopathy. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 53, n. 9, p. 5921-5929, 2012.

YOOSOOK, C.; BUNYAPRAPHATSARA, N.; BOONYAKIAT, Y.; KANTASUK, C. Antiherpes simplex virus activities of crude water extracts of Thai medicinal plants. **Phytomedicine**, v. 6, n. 6, p. 411–419, 2000.

YOSHIKAWA, M.; NINOMIYA, K.; SHIMODA, H.; NISHIDA, N.; MATSUDA, H. Hepatoprotective and antioxidative properties of *Salacia reticulata*: preventive effects of phenolic constituents on CCl₄-induced liver injury in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 1, p. 72-76, 2002.

ZHU, W.; CHIU, L. C. M.; OOI, V. E. C.; CHAN, P. K. S.; ANG, P. O. Antiviral property and mechanisms of a sulphated polysaccharide from the brown alga *Sargassum patens* against herpes simplex virus type 1. **Phytomedicine**, v. 13, n. 9, p. 695-701, 2006.

ZOLINI, G. P. P. **Ativação da resposta imune inata mediada por receptores do tipo toll na infecção com vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) em modelo murino**. 2012. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Fiocruz, Belo Horizonte.

5 ARTIGO

Galactomannan isolated from *Dimorphandra gardneriana* associated with mangiferin inhibits replication of herpes simplex virus and poliovirus.

Daniele Zendrini Rechenchoski¹, Samantha Fernandes Espada¹, Ananda Marques de Godoi¹, Nayara Lopes¹, Ligia Carla Faccin-Galhardi¹, Raimundo Rafael de Almeida², Maria Teresa Salles Trevisan², Nágila Maria Pontes Silva Ricardo², Carlos Nozawa¹, Rosa Elisa Carvalho Linhares¹.

¹ Departamento de Microbiologia, CCB, Universidade Estadual de Londrina, CEP 86051-990, Londrina, Paraná, Brazil.

² Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, CEP 60020-181, Fortaleza, Ceará, Brazil.

ABSTRACT

Dimorphandra gardneriana is a Brazilian native leguminous tree, popularly known as *faveira* or *fava-d'anta* and its fruits are exploited to obtain rutin and quercetin, both bioflavonoids. Many authors have shown potential applications for *D. gardneriana* galactomannans, such as vehicles for pharmaceutical agents. Mangiferin is the major constituent obtained from *Mangifera indica* and has multiple pharmacological activities, including anti-herpetic activity already reported in other studies. This work evaluated the activity of galactomannan isolated from *Dimorphandra gardneriana* associated with mangiferin (GLMDg) against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and poliovirus type 1 (PV-1), in HEp-2 cell cultures. The cytotoxicity of the compound was evaluated by the MTT method and the antiviral activity by the plaque reduction assay, immunofluorescence and polymerase chain reaction. GLMDg exhibited a cytotoxic concentration (CC₅₀) > 2000 µg/mL. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) for HSV-1 was of 287.5 µg/mL and for PV-1 of 206.2 µg/mL, with selectivity index (SI) > 6.95 and > 9.69, respectively. The analysis of GLMDg effect in different stages of HSV-1 replication showed a maximum inhibition at the concentration of 500 µg/mL, when added concomitantly with viral infection and at the time 1 h post infection (pi.). While for PV-1 greatest inhibition was observed concomitantly with viral infection and at the times 4 and 8 h pi. The inhibition was also demonstrated by the decrease of fluorescent cells and/or of the genomic viral. These results suggested that the compound inhibited PV-1 and HSV-1 replication and therefore represents a potential candidate for antiviral, requiring further studies.

Keywords: *Dimorphandra gardneriana*; galactomannan; herpesvirus; mangiferin; poliovirus.

1 INTRODUCTION

The herpes simplex virus (HSV), member of the *Herpesviridae* family and *Simplexvirus* genus, is an enveloped virus with double-stranded DNA genome (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007). There are two distinct HSV serotypes (HSV-1 and HSV-2) that cause similar clinical infections in the mucosal epithelia, although HSV-1 is typically associated with infections of the oral mucosa while HSV-2 is more frequently attributed to genital mucosa infections (BLOOM; GIORDANI, 2008). The spectrum of HSV infections in humans is vast and includes oropharyngeal disease, genital infections, neonatal disease, encephalitis, ocular disease and cutaneous infections (KIMBERLIN, 2003). The seroprevalence in adults is about 80 to 90% for HSV-1 and approximately 90% of people aged between 20 and 40 years have antibodies against HSV-1 (REIL et al., 2008; WU et al., 2005). These infections are efficiently treated with antiviral drugs such as acyclovir (ACV). However, resistance has been reported, mainly among immunocompromised and transplant patients, and is associated with mutations in one of the two viral enzymes involved in the ACV mechanism of action: thymidine kinase and DNA polymerase (MORFIN; THOUVENOT, 2003). Therefore, it is desirable to develop new anti-HSV agent, with different mechanism of action, which could be a substitute or a complement for acyclovir (CHATTOPADHYAY; KHAN, 2008).

Poliovirus (PV), the etiologic agent of poliomyelitis, member of the *Enterovirus* genus and *Picornaviridae* family, is a non-enveloped virus with a positive single-stranded RNA genome (PLIAKA et al., 2010; RACANIELLO, 2007). There are three poliovirus serotypes (PV-1, PV-2 and PV-3), but the infection with one serotype does not confer protection against a different serotype (MINOR, 2004; PLIAKA et al., 2010). Poliomyelitis is an acute disease of the central nervous system that may result in permanent paralysis and death (ALMOND, 1991). The global incidence of the disease cases has decreased by 99%: in 2013, 416 cases were reported for the entire year as opposed to over 350.000 in 1988. Currently the poliomyelitis is under control in most part of the world, due to massive vaccination program. However, despite intensive efforts to eradicate the virus, the disease remains endemic in Afghanistan, Nigeria and Pakistan (297 cases were recorded in these endemic countries, year to date 2014) and, therefore, represents a major threat for the world (GPEI, 2014). Beyond its medical and epidemiological importance, PV is one of the

most studied and best-understood viral models, including for the development of new drugs and it replicates efficiently in various types of cultured cells, achieving high viral titers (MUELLER; WIMMER; CELLO, 2005).

A wide array of natural products, used by diverse medicinal systems throughout the world, showed high level of antiviral activity and many of them have complementary and overlapping mechanism of action, either by inhibiting viral replication or viral genome synthesis (CHATTOPADHYAY; KHAN, 2008). Moreover, the increasing incidence of viral diseases, the selection of resistant strains to therapeutically available antiviral, as well as, the development of highly selective drugs and with low toxicity are the main reasons to search for new drugs (CHATTOPADHYAY; CHAKRABORTY; BHATTACHARYA, 2010). Tropical environments, such as Brazilian biomes, offer particularly rich potential for biologically active compounds with unique structures and that contribute toward new drug discovery (BOLZANI et al., 2012).

Dimorphandra gardneriana is a Brazilian native leguminous tree, popularly known as *faveira* or *fava-d'anta* and belongs to the *Fabaceae* family. The plant is widely distributed in the Brazilian Cerrado and its fruits are exploited to obtain rutin and quercetin, both bioflavonoids (LANDIM; COSTA, 2012; SUDRÉ et al., 2011). Several studies have reported that flavonoids, including quercetin, exhibit antiviral activity (EVERS et al., 2005; ORHAN et al., 2010; SAVI et al., 2010). The plant is used in Brazilian folk medicine against cancer, conjunctivitis, cough, influenza (RIBEIRO et al., 2014), back pain (LOZANO et al., 2014), hemorrhoids, varicose veins, haematom, vascular diseases (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007), snakebite (SILVA, 2013) and also is used as stimulant (ALVES; POVH, 2013).

Mangiferin is a xanthone glucoside obtained from various plants such as *Mangifera indica* L. (BARRETO et al., 2008) and multiple pharmacological activities have been scientifically demonstrated, such as: antitumor (JAGETIA; VENKATESHA, 2006; RAJENDRAN; EKAMBARAM; SAKTHISEKARAN, 2008), immunomodulatory (SARKAR et al., 2004), antidiabetic (MURUGANANDAN et al., 2005), antioxidant (LEIRO et al., 2003; STOILOVA et al., 2005), antiviral (GUHA; GHOSAL; CHATTOPHADHYAY, 1996; ZHENG; LU, 1990), antibacterial (SRINIVASAN et al., 1982; STOIVOLA, GARGOVA; STOYANOVA, 2005), antifungal (STOIVOLA et al., 2005), antiparasitic (PERRUCCI et al., 2006), antiallergic (RIVERA et al., 2006), anti-inflammatory and antinociceptive (BELTRÁN et al., 2004; GARRIDO et al., 2004).

Empirically, it is used against diarrhea (ROSS, 1999), vomiting (BOULLARD, 2001), rheumatism (GRENARD; MORETTI; JACQUENIN, 2004), itch (SCHMEDA-HIRSCHMANN; ARIAS, 1992), asthma and gastric disorders (NÚÑEZ-SELLÉS, 2005). The aim of this work was report the activity, *in vitro*, of a galactomannan isolated from *Dimorphandra gardneriana* associated with mangiferin (GLMDg) against HSV-1 and PV-1.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 COMPOUNDS

Dimorphandra gardneriana seeds were collected in the semi-arid zone of the Northeastern region of Brazil (Caatinga biome) in August-September 2006. The process of galactomannan isolation from the endosperm of *D. gardneriana* seeds was based on the method reported by Vieira et al. (2007). The sulfation procedure of galactomannan from *D. gardneriana* (GLDgS) was performed according to Ono et al. (2003) with a few modifications and the mangiferin was isolated and purified as described in Barreto et al. (2008). The galactomannan solution was prepared by dissolving 1 mg of polysaccharide in 100 mL of distilled water. Mangiferin was then dissolved in the gum solution to obtain a weight ratio of polymer to mangiferin of 10:1 (ALMEIDA et al., 2015).

2.2 CELLS AND VIRUS

HEp-2 cells (epithelial human larynx carcinoma cells, ATCC CCL-23) were grown at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen - Gibco, USA), 2 mM glutamine (Sigma Chem. Co., USA) and treated with 100 µg/mL streptomycin, (Gibco BRL, USA), 100 IU/mL penicillin (Sigma Chem. Co., USA), and 2.5 µg/mL of amphotericin B (Meizler Biopharma S/A, BR). Herpes simplex virus type 1 (HSV-1), isolated from clinical specimens, provided by the Departamento de Virologia (IMPPG/UFRJ, BR) and poliovirus type 1 (PV-1), VR-58, an ATCC strain, were propagated in HEp-2 cells and stored at -20°C with 10% glycerol. The virus titers were determined by plaque assay.

2.3 CYTOTOXICITY ASSAY

The cytotoxicity of the compounds in HEp-2 cells was evaluated by MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) kit assay (Sigma Chem. Co., USA), according to manufacturer's specifications. Briefly, HEp-2 cell cultures grown at approximately 70% confluence in 96-well microplates (TPP, Switzerland) were treated with varying concentrations of the compounds (31.25 to 2000 µg/mL) in maintenance medium, with appropriated controls and maintained at 37°C with 5% CO₂, during 72 h. The overlay medium was replaced with 10 µL of the MTT reagent (1.25 µg/mL) and incubated, under same conditions, for 3 h. This was followed by the addition of 90 µL of the MTT solubilization solution (10% Triton X-100 in acidic isopropanol - 0,1N HCl) and after 15 min, under agitation, the absorbance was read at wavelengths of 570 and 690 nm. The percentage of cell viability (% CV) was calculated by the formula $\% CV = (At/Ac) \times 100$, where At and Ac refer to the absorbance of test substance and control (untreated cells), respectively (GODOI et al., 2014). The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) was calculated by linear regression analysis, as the concentration of the substance capable of reducing the optical density (OD) of MTT product by 50% in comparison to control.

2.4 PLAQUE REDUCTION ASSAY

The antiviral activity of GLMDg was determined by plaque reduction assay (PRA) according to Lopes et al. (2013). Briefly, HEp-2 cells grown at approximately 100% confluence in 24-well plates (TPP, Switzerland) were infected with HSV-1 or PV-1 (50 to 100 plaque forming unit, PFU) and treated with varying concentrations of the compound (62.5, 125, 250 and 500 µg/mL), under different protocols (time-of-addition assay, inhibition of adsorption assay, the virucidal effect and virus release assay). These cell cultures were overlaid with nutrient agarose (DMEM 2x/1.8% agarose [v/v]) containing 25 mM MgCl₂. After 40 h of incubation at 37°C in 5% CO₂, the cells were fixed with 20% formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.3, for 24 h and stained with 0.5% crystal violet in 20% ethanol. The plaques were counted and the percent of viral inhibition (%VI) was calculated as: $\%VI = [1 - (PFU \text{ in treated cells} / PFU \text{ in control cells})] \times 100$ (NISHIMURA; TOKU; FUKUYASU, 1977). The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was determined as the concentration of the

substance capable of reducing the number of PFU in 50%, by regression analysis. The selectivity index (SI) was expressed as the ratio of CC_{50}/IC_{50} .

2.4.1 Time-of-Addition Assay

It was performed according to Faccin-Galhardi et al. (2012). Varying concentrations of the compound (62.5 to 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were added to the cell cultures before (-1 and -2 h), simultaneously (0 h) and after (1, 2, 4 and 8 h) the infection, followed by PRA.

2.4.2 Inhibition of Adsorption Assay

The cell cultures were pre-incubated at 4°C for 30 min and submitted at the varying concentrations of the GLMDg (62.5 to 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), simultaneously with viral infection. The cells were again incubated at 4°C for 1 h followed by PRA, according to Minari et al. (2011), with minor modifications.

2.4.3 Virucidal Effect

For the virucidal assay, virus suspension was incubated with the same concentrations of the compound (v/v), as before, for 1 h at 37°C in water bath, inoculated and followed by PRA (RINCÃO et al., 2012).

2.4.4 Virus Release Assay

It was performed according to Su et al. (2008), with minor modifications. A HEp-2 cell monolayer was infected with HSV-1 or PV-1 for 1 h. Compound-containing maintenance medium, at the same concentrations, was added into wells after DMEM wash. After 20 h of incubation for HSV-1 and 15 h for PV-1 at 37°C, supernatant and cell pellet were collected, respectively. The cell pellet was frozen and thawed three times before titration by PRA. Virus titers of supernatant and cell pellet were determined according to Rovozzo and Burke (1973).

2.4.5 The Synergistic Potential of GLMDg Combined with ACV for HSV-1

The test was performed according to Gong et al. (2004), with minor modifications. The GLMDg was tested separately for four concentrations: $0.25 \times IC_{50}$, $0.5 \times IC_{50}$, $1.0 \times IC_{50}$ and $2.0 \times IC_{50}$, and the ACV was also tested separately for four concentrations: $0.25 \times IC_{50}$, $0.5 \times IC_{50}$, $1.0 \times IC_{50}$ and $2.0 \times IC_{50}$. The mixture of varying concentrations of GLMDg and ACV in a fixed ratio, i.e., $0.25 \times IC_{50}$ of GLMDg combined with $0.25 \times IC_{50}$ of ACV, added concomitantly to infection, was submitted to PRA. The degree of GLMDg and ACV interaction was found by the combination index (CI) = $C_A/IC_{50A} + C_B/IC_{50B}$, where C_A and C_B are the concentrations of the substances A and B used in combination to achieve 50% effect, and IC_{50A} and IC_{50B} are the inhibitory concentrations for the agents alone to cause the same effect. A CI less than, equal to or greater than 1 indicates synergism, additivity and antagonism, respectively (ZHAO; WIENTJES; AU, 2004).

2.5 IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY (IFA)

The assay was performed according Faccin et al. (2007). Briefly, HEp-2 cell cultures grown on coverslips, in 24-well plates, were infected with HSV-1 or PV-1, and simultaneously treated with varying concentrations of the compound (62.5, 125, 250 and 500 $\mu\text{g/mL}$). Cultures of infected and untreated cells and cultures of untreated and noninfected cells were maintained for controls. Approximately 24 h post infection, the cells were washed with 0.05% Tween-20 PBS (0.1 M, pH 7.3), fixed with cold acetone (-20°C) for 20 min and blocked with 2% powdered skim milk PBS during 30 min. After, the cells were incubated for 30 min at 37°C either with mouse anti-HSV-1 (Santa Cruz Biotechnol., USA) or rabbit anti-PV-1 serum (INCQS, Fiocruz, BR), followed by three washings with 0.05% Tween-20 PBS and incubated for an additional 30 min at 37°C with goat anti-mouse IgG (HSV-1) or goat anti-rabbit IgG (PV-1) conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC - Sigma Chem. Co., USA). The cells were examined in a Zeiss fluorescence microscope (Zeiss Axio Imager A1). A total of 100 cells/coverslip were randomly chosen and the percentage of viral inhibition was calculated with respect to untreated infected cells.

2.6 POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

The effect of GLMDg in the synthesis of viral DNA was performed as described by Lopes et al. (2013), with minor modifications. Viral DNA of infected cells and treated with varying concentrations of the compound (500, 250, 125 and 62.5 µg/mL) was extracted with commercial kit (QIAamp[®] DNA Mini Kit - Qiagen, USA). Viral DNA from infected cells treated with acyclovir (3 mg/mL) (Zynvir - Novafarma Indústria Farmacêutica, BR), viral DNA of infected cells without GLMDg treatment and DNA from noninfected cells and without treatment were used as controls. The primer pairs used for *TK2* were *TK2F* (5' ACGATGTTTGTGCCGGGCAAGGTC 3') and *TK2R* (5' CGAGCGACCCTGCAGCGACCCGCT 3'), according to Sauerbrei et al. (2010). The reaction was carried out in a final volume of 30 µL containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 pmol of each specific primer (*Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK), 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (*) and 5 µL of extracted DNA. The program consisted of denaturation at 95°C for 3 min and 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 58°C for 1 min, and polymerization at 72°C for 90 sec, followed by a final extension for 7 min at 72°C. Ten microliters of the PCR products were resolved on 12% polyacrylamide gel, which was stained with silver nitrate. The expected size for *TK2* is 716 pb.

The effect of GLMDg in PV-1 RNA synthesis was performed by RT-PCR, as described by Lopes et al. (2013), with minor modifications. RNA of cells infected and treated with varying concentrations of the compound (500, 250, 125 and 62.5 µg/mL) was extracted with commercial kit (QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit - Qiagen, USA). Viral RNA from infected cells and treated with human alfa-2B interferon (10.000 IU/mL) (Meizler Biopharma S/A, BR), viral RNA of infected cells without GLMDg treatment and RNA from noninfected cells and without treatment were used as controls. Initially, the reverse transcription was performed with a final volume of reaction of 60 µL. The first reaction mixture consisting of 5 pmol of random primers (*), 1 mM dNTP (*) and RNase-free water up to a volume of 26 µL was prepared. Twenty six microliters of the first reaction was mixed with 10 µL of the extracted viral RNA and incubated for 5 min at 65°C. Afterwards, a second reaction mixture consisting of 100U M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transcriptase (*), 1x M-MLV reaction buffer, 0.01 M DTT (dithiothreitol) and RNase-free water up to a volume 24 µL was prepared. Twenty four microliters of second reaction mixture was

added to each sample and sequentially incubated for 10 min at 25°C, 50 min at 37°C and 15 min at 70°C. The PCR reaction was carried out at a final volume of 25 µL containing 0.4 mM of each dNTP, 2 pmol of each specific primer, 2.5 U Taq DNA polymerase with PCR buffer and cDNA. Specific primers for PV capsid gene (*VP1-VP4*): 5' AGTTTCACCGAAGGCGGA 3'(F) and 5' CGCTGACACAAAACCAAGGA 3'(R) were used, resulting in a 102 bp amplified product. The PCR program consisted of denaturation at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles by denaturation for 15 sec at 95°C, annealing at 60°C for 1 min, and extension for 1 min at 72°C. The final cycle of extension was 7 min at 72°C. Ten-microliter aliquots of the PCR products were resolved in 12% polyacrylamide gel electrophoresis, which was stained with silver nitrate.

2.7 STATISTICAL ANALYSIS

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

3 RESULTS

3.1 CYTOTOXICITY ASSAY

The Table 1 shows the CC_{50} of GLMDg indicated as higher than 2000 µg/mL. Thus a very low or no toxicity can be assumed for this compound. While the sulfated derivatives (GLMDgS) and the only galactomannan (GLDg) exhibited CC_{50} of 257.5 µg/mL and > 500 µg/mL, respectively.

3.2 ANTIVIRAL ACTIVITY

The GLMDg inhibited HSV-1 and PV-1 with IC_{50} of 287.5 µg/mL and 206.2 µg/mL and selectivity index (SI) > 6.95 and > 9.69, respectively. While the GLMDgS and the GLDg exhibited IC_{50} higher than 250 µg/mL and of 910 µg/mL, with SI < 1.03 and > 0.54, respectively. According to Cos et al. (2006), a value of selectivity index greater than 4 is considered good (Table 1).

3.2.1 Anti-Herpetic Activity

The maximum inhibitory effect against HSV-1 was found when the compound was added, at the highest concentration (500 µg/mL), concomitantly with viral infection (time 0 h) and 1 h post infection (pi.). Time 2 h pi. also demonstrated high %VI of 75.5%. However, when GLMDg was added at 4 and 8 h pi. no significant inhibition was observed. In addition, the pre-treatment inhibited 28.5% when the compound was added 2 h before the infection while no inhibition was observed for the time 1 h before the infection ($p > 0.05$). For virucidal assay, GLMDg demonstrated an inhibition around 5.7% and 12.8%, and for the inhibition of adsorption showed a %VI of 13.9% and 16.2%, at the concentrations of 500 µg/mL and 250 µg/mL, respectively, suggesting a non-dose-dependent inhibition (Figure 1).

To determine whether GLMDg could have any effect on virus release, the intracellular and extracellular virus titers in the presence or absence of GLMDg were compared. In the presence of 500 µg/mL GLMDg, the titer of intracellular virus was significantly reduced (1.2×10^7 PFU/mL vs. 9.65×10^7 PFU/mL), but the titer of extracellular virus remained approximately constant (5.45×10^7 PFU/mL vs. 5.4×10^7 PFU/mL). Therefore, the GLMDg not inhibited the release of HSV-1 (Figure 2).

The IFA was carried out to evaluate the effect of GLMDg in the expression of viral protein. It was performed with cells treated at the time 0 h of infection and the inhibition of fluorescent cells found was of 24.6%, 42.5% and 58.1% for the concentrations of 125 µg/mL, 250 µg/mL and 500 µg/mL, respectively. However, no inhibition was observed at 62.5 µg/mL (Table 2).

Experiment to determine whether the compound could inhibit HSV DNA synthesis was conducted to amplify HSV-1 *TK2* by PCR. Figure 3A shows reduction of the viral genomic DNA in the presence of compound at the concentration 125 µg/mL and a significant reduction, because the qualitative technique revealed no bands in the gel, at the concentrations 250 µg/mL and 500 µg/mL.

The synergistic potential of the GLMDg with ACV for HSV-1 was performed using four different combinations of GLMDg/ACV concentrations, 71.8/500; 143.7/1000; 287.5/2000 and 575/4000 µg/mL. The IC_{50} found or each compound was greater when they were combined in comparison when were used separately. A CI > 1 was found, characterizing an antagonistic effect.

3.2.2 Antipoliiovirus Activity

The compound showed high antiviral activity, for PV-1, when added concomitantly with viral infection, at the highest concentration, with inhibition rate of 77.8%. Times 1 and 2 h pi. demonstrated %VI of 45.1% and 54.1%, respectively. A slight increase was observed, for the times 4 and 8 h pi., which exhibited inhibition of 70.6% and 65.2%, respectively. The direct effect of GLMDg on PV-1 (virucidal activity) resulted in inhibition of 26.2%, 30% and 9.5%, respectively, at 500 µg/mL, 250 µg/mL and 125 µg/mL, however, no inhibition was observed at 62.5 µg/mL. The inhibition of adsorption assay presented the following values of inhibition: 65%, 27.5%, 16.2%, and 10%, respectively, for the same concentrations. We also found that GLMDg showed a prophylactic effect, when added 1 h and 2 h before of PV-1 infection, the percentage of inhibition was of 46.8% and 61.5%, respectively, at the highest concentration (500 µg/mL) (Figure 4). In addition, GLMDg was not able to inhibit release of PV-1 particles, in all tested concentrations.

By IFA, GLMDg demonstrated percentages of the inhibition of fluorescent cells that varied from 28% to 68.6%, at the concentrations of 62.5 µg/mL to 500 µg/mL, when treatment was performed at the time 0 h of infection (Table 2).

RT-PCR demonstrated that GLMDg caused no inhibition of viral RNA synthesis, as shown in figure 3B. The replicon was visualized, in all tested concentrations.

4 DISCUSSION

Galactomannans are heterogeneous polysaccharides widely distributed in nature (SRIVASTA; KAPOOR, 2005). Generally, they possess fundamental structure consisting of a main chain of β -(1→4)-D-mannopyranose units substituted by single α -D-galactopyranose units at O-6 (AZERO; ANDRADE, 2002). According to Cerqueira et al. (2011), β -glucans are predominant, to which the antiviral activity may be attributed. The β -glucans can decrease viral nucleic acid levels in cells infected and stimulate the immune system by binding to Toll-like receptors and dectins and causes the induction of various cytokines, among them the interferon (YAMAMOTO et al., 2013).

Commonly, the sulfation provides a higher charge density in the molecule interfering efficiently with electrostatic interactions between the positively charged region of a viral glycoprotein and the negatively charged heparan sulfate chains of the cell-surface glycoprotein receptor (SAHA et al., 2010). Therefore, the antiviral activity might be mainly attributed to the polyanionic character of sulfated polysaccharides. However, in this work, the GLMDg exhibited lower cytotoxicity and greater viral inhibition in comparison to GLMDgS. An increase of cytotoxicity by sulfated form was also observed in other studies (ALI et al., 2014; CARDOZO et al., 2013; CHEN et al., 2010; STEVAN et al.; 2001).

We also demonstrated that the association of galactomannan from *D. gardneriana* with mangiferin (GLMDg) exhibited greatest antiviral effect for HSV-1 and PV-1, in comparison to the galactomannan not associated (GLDg), resulting in a high SI, one of the features sought for a potential candidate for antiviral. Therefore, this work evaluated the activity of the GLMDg in HSV-1 and PV-1 replication.

The HSV lytic cycle involves the temporally regulated expression of three sets of viral genes: immediate early (IE), early (E), and late (L) and the HSV-1 biosynthesis cycle occur approximately between 18 to 20 h (HANCOCK; CORCORAN; SMILEY, 2006; WIGG; MIRANDA, 2008). The analysis of GLMDg effect in different stages of HSV-1 replication showed the maximum inhibition at the concentration of 500 µg/mL, concomitantly with viral infection and at the time 1 h pi. and high inhibition at the time 2 h pi. The period from 2 - 4 h pi. roughly coincides with the expression of immediate early genes and synthesis of α protein, suggesting the GLMDg action in these initial steps. Next, the IE gene products induce the expression of the early genes required for the replication of viral DNA. When GLMDg was added at 4 and 8 h pi. no significant inhibition was observed. However, the PCR showed a significant reduction of the viral DNA genomic, at the concentrations 250 µg/mL and 500 µg/mL, revealing no bands in the gel, but the technique is qualitative. The inhibition of viral protein synthesis was shown by IFA.

The polysaccharides can induce interferon and, consequently, the antiviral state by stimulation of intracellular signaling pathways (YAMAMOTO et al., 2013). In order to evaluate whether GLMDg binding to cell membrane receptor could be triggered similar effect, the pre-treatment assay was performed. GLMDg showed a prophylactic effect, when added 2 h before of HSV-1 infection, with %VI of 28.5%, at the concentration 500 µg/mL.

The virucidal activity may be caused by the disintegration of the entire HSV particles, the solubilization of the virus envelope, or the chemical modification, degradation or masking of some of the essential envelope proteins (ZHU et al., 2004). We analyzed the GLMDg effect directly on viral particles (virucidal assay) and its interaction with cell receptors (inhibition of adsorption assay), however, both tests showed low antiviral activity.

For the virus release assay, the titer of intracellular virus was significantly reduced, but the titer of extracellular virus remained approximately constant, indicating that the compound was not able to inhibit release of HSV-1, but that could inhibit some step before the release.

Regarding the synergistic effect of GLMDg and ACV against HSV-1, the results demonstrated an antagonistic effect suggesting that they bind to the same site on the same receptor. Therefore, GLMDg alone has a better antiviral activity than the combination with ACV for the treatment of infection.

The entire time required for the PV-1 replication cycle ranges from 5 to 10 hours, depending on many variables (RACANIELLO, 2007). The time-of-addition assay was performed to investigate the possible steps of the GLMDg action mechanism in the replication of PV. The compound used at the times 0 and 1, 2, 4, and 8 h pi. showed that greatest inhibition was observed concomitantly with viral infection and at the times 4 and 8 h pi., suggesting that the compound inhibits mainly the final stages of viral infection, but our study demonstrated that GLMDg did not interfere with release stage of PV-1.

For virucidal assay and inhibition of adsorption assay, the percentages of viral inhibition, at the highest concentration, were of 26.2% and 65%, respectively, indicating that may be some effect direct of GLMDg on viral particles or also an interaction with cell receptors. Poliovirus is a non-enveloped virus and therefore the virucidal effect is not associated with changes in the envelope, but in the capsid. The integrity of viral capsid structure, including antigenic sites, is a prerequisite for the virus maintain the infectivity (IMAI et al., 2011).

We found that the polysaccharide showed a prophylactic effect, when added 1h and 2 h before of PV-1 infection, with percentage of inhibition of 46.8% and 61.5%, respectively, at the concentration 500 µg/mL, suggesting some interference in intracellular signaling pathways. In addition, the GLMDg demonstrated an inhibition

of viral protein synthesis ranging from 28 - 68.6%. On the other hand, the RT-PCR no demonstrated an inhibition of viral RNA synthesis, in all tested concentrations.

Finally, we demonstrated that GLMDg is an inhibitor of HSV-1 and PV-1 replication with low toxicity and high selectivity, and therefore is a potential candidate for further experiments for the control of these infections.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there is no conflict of interests.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank CNPq, CAPES, and Fundação Araucária for financial support.

REFERENCES

- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.
- ALI, M. M.; MAHMOUD, A. E.; ABDEL-HALIM, A. H.; FYIAD, A. A. Anti-cancer effect of some prepared sulfated oligosaccharides on three different human cancer cell lines. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 7, n. 1, p. 168-176, 2014.
- ALMEIDA, R. R.; MAGALHÃES, H. S.; SOUZA, J. R. R.; TREVISAN, M. T. S.; VIEIRA, I. G. P.; FEITOSA, J. P. A.; ARAÚJO, T. G.; RICARDO, N. M. P. S. Exploring the potential of *Dimorphandra gardneriana* galactomannans as drug delivery systems. **Industrial Crops and Products**, v. 69, n. 1, p. 284-289, 2015.
- ALMOND, J. W. Poliovirus neurovirulence. **Seminars in Neuroscience**, v. 3, n. 2, p. 101-108, 1991.
- ALVES, G. S. P.; POVH, J. A. Estudo etnobotânico de plantas medicinais na comunidade de Santa Rita, Ituiutaba - MG. **Revista Biotemas**, v. 26, n. 3, p. 231-242, 2013.
- AZERO, E. G.; ANDRADE, C. T. Testing procedures for galactomannan purification. **Polymer Testing**, v. 21, n. 5, p. 551-556, 2002.
- BARRETO, J. C.; TREVISAN, M. T. S.; HULL, W. E.; ERBEN, G.; BRITO, E. S.; PFUNDSTEIN, B.; WÜRTELE, G.; SPIEGELHALDER, B.; OWEN, R. W.

Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves and peel of mango (*Mangifera indica* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 14, p. 5599-5610, 2008.

BELTRÁN, A. E.; ALVAREZ, Y.; XAVIER, F. E.; HERNANZ, R.; RODRIGUEZ, J.; NÚÑEZ, A. J.; ALONSO, M. J.; SALAICES, M. Vascular effects of the *Mangifera indica* L. extract (Vimang). **European Journal of Pharmacology**, v. 499, n. 3, p. 297-305, 2004.

BLOOM, D. C.; GIORDANI, N. V. The herpes simplex viruses. In: REISS, C. S. **Neurotropic Viral Infections**. 1 ed. São Paulo: Cambridge University Press. 2008. p. 212-223.

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

BOULLARD, B. **Plantes Médicinales du Monde, Réalités et Croyances**. Paris: Estem, 2001. 645 p.

CARDOZO, F. T.; CAMELINI, C. M.; CORDEIRO, M. N.; MASCARELLO, A.; MALAGOLI, B. G.; LARSEN, I. V.; ROSSI, M. J.; NUNES, R. J.; BRAGA, F. C.; BRANDER, C. R.; SIMÕES, C. M. Characterization and cytotoxic activity of sulfated derivatives of polysaccharides from *Agaricus brasiliensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 57, n. 1, p. 265-272, 2013.

CERQUEIRA, M. A.; SOUZA, B. W.; SIMÕES, J.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, M. R. M.; COIMBRA, M. A.; VICENTE, A. A. Structural and thermal characterization of galactomannans from non-conventional sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 1, p. 179-185, 2011.

CHATTOPADHYAY, D.; DAS, S.; CHAKRABORTY, S.; BHATTACHARYA, S. K. Ethnomedicines for the development of anti-herpesvirus agents. In: CHATTOPADHYAY, D. **Ethnomedicine: A Source of Complementary Therapeutics**, 2010. p. 117-147.

CHATTOPADHYAY, D.; KHAN, M. T. H. Ethnomedicines and ethnomedicinal pythophores against herpesviruses. In: EL-GEWELY, M. R. **Biotechnology Annual Review**. Amsterdam: Elsevier, 2008. p. 297-348.

CHEN, T.; WANG, J.; LI, Y.; SHEN, J.; ZHAO, T.; ZHANG, H. Sulfated modification and cytotoxicity of *Portulaca oleracea* L. polysaccharides. **Glycoconjugate Journal**, v. 27, n. 6, p. 635-642, 2010.

COS, P.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 290-302, 2006.

EVERS, D. L.; CHAO, C. F.; WANG, X.; ZHANG, Z.; HUONG, S. M.; HUANG, E. S. Human cytomegalovirus inhibitory-flavonoids: studies on antiviral activity and mechanism of action. **Antiviral Research**, v. 68, n. 3, p. 124-134, 2005.

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, n. 1, p. 24-28, 2007.

FACCIN-GALHARDI, L. C.; YAMAMOTO, K. A.; RAY, B.; CARVALHO, R. E. L.; NOZAWA, C. The *in vitro* antiviral property of *Azadirachta indica* polysaccharides for poliovirus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 1, p. 86-90, 2012.

GARRIDO, G.; GONZÁLEZ D.; LEMUS, Y.; GARCÍA, D.; LODEIRO, L.; QUINTERO, G.; DELPORTE, C.; NÚÑEZ-SELLÉS, A. J.; DELGADO, R. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (Vimang®). **Pharmacological Research**, v. 50, n. 2, p. 143-149, 2004.

GLOBAL POLIO ERADICATION INICIATIVE (GPEI). **Annual report 2014**. WHO press, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2014.

GODOI, A. M.; FACCIN-GALHARDI, L. C.; LOPES, N.; RECHENCHOSKI, D. Z.; ALMEIDA, R. R.; RICARDO, N. M. P. S.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Antiviral activity of sulfated polysaccharide of *Adenanthera pavonina* against poliovirus in HEp-2 cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2014.

GONG, Y.; RAJ, K. M.; LUSCOMBE, C. A.; GADAWSKI, I.; TAM, T.; CHU, J.; GIBSON, D.; CARLSON, R.; SACKS, S. L. The synergistic effects of betulin with acyclovir against herpes simplex viruses. **Antiviral Research**, v. 64, n. 2, p. 127-130, 2004.

GRECARD, P.; MORETTI, C.; JACQUENIN H. **Pharmacopée traditionnelle em Guyane**. Paris: IRD, 2004, 103 p.

GUHA, S.; GHOSAL, S.; CHATTOPHADHYAY, U. Antitumor, immunomodulatory and anti-HIV effect of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone. **Chemotherapy**, v. 42, n. 6, p. 443-451, 1996.

HANCOCK, M. H.; CORCORAN, J. A.; SMILEY, J. R. Herpes simplex virus regulatory proteins VP16 and ICP0 counteract an innate intranuclear barrier to viral gene expression. **Virology**, v. 352, n. 1, p. 237-252, 2006.

IMAI, T.; SANO, D.; MIURA, T.; OKABE, S.; WADA, K.; MASAGO, Y.; OMURA, T. Adsorption characteristics of a enteric virus-binding protein to norovirus, rotavirus and poliovirus. **BMC Biotechnology**, v. 11, n. 123, p. 1-11, 2011.

JAGETIA, G. C.; VENKATESHA, V. A. Mangiferin protects human peripheral blood lymphocytes against γ -radiation-induced DNA strand breaks: a fluorescence analysis of DNA unwinding assay. **Nutrition Research**, v. 26, n. 6, p. 303-311, 2006.

KIMBERLIN, D. W. Herpes simplex virus infections of the central nervous system. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 83-89, 2003.

LANDIM, L. P.; COSTA, J. G. M. *Dimorphandra gardneriana* Tulasne (Fava d' anta) – Uma abordagem etnobotânica e riscos de extinção. **Revista da Biologia**, v. 9, n. 1, p. 6-11, 2012.

LEIRO, J. M.; ALVAREZ, E.; ARRANZ, J. A.; SISO, I. G.; ORALLO, F. *In vitro* effects of mangiferin on superoxide concentrations and expression of the inducible nitric oxide synthase, tumour necrosis factor- α and transforming growth factor- β genes. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 8, p. 1361-1371, 2003.

LOPES, N.; FACCIN-GALHARDI, L. C.; ESPADA, S. F.; RICARDO, N. M. P. S.; LINHARES, R. E. C.; NOZAWA, C. Sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplex virus and poliovirus. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, n. 1, p. 93-99, 2013.

LOZANO, A.; ARAÚJO, E. L.; MEDEIROS, M. F. T.; ALBUQUERQUE, U. P. The apparency hypothesis applied to a local pharmacopoeia in the Brazilian northeast. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 10, n. 2, p. 1-17, 2014.

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, n. 3, p. 255-259, 2011.

MINOR, P. D. Polio eradication, cessation of vaccination and re-emergence of disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 473-482, 2004.

MORFIN, F.; THOUVENOT, D. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. **Journal Clinical Virology**, v. 26, n. 1, p. 29-37, 2003.

MUELLER, S.; WIMMER, E.; CELLO, J.; Poliovirus and poliomyelitis: a tale of guts, brains and an accidental event. **Virus Research**, v. 111, n. 2, p. 175-193, 2005.

MURUGANANDAN, S.; SRINIVASAN, K.; GUPTA, S.; GUPTA, P. K.; LAL, J. Effect of mangiferin on hyperglycemia and atherogenicity in streptozotocin diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 3, p. 497-501, 2005.

NISHIMURA, T.; TOKU, H.; FUKUYASU, H. 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**, v. 50, n. 1-2, p. 39-46, 1977.

NÚÑEZ-SELLÉS, A. J. Antioxidant therapy: myth or reality? **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 4, p. 699-710, 2005.

ONO, L.; WOLLINGER, W.; ROCCO, I. M.; COIMBRA, T. L.; GORIN, P. A.; SIERAKOWSKI, M. R. In vitro and in vivo antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). **Antiviral Research**, v. 60, n. 3, p. 201-208, 2003.

ORHAN, D. D.; ÖZÇELİK, B.; ÖZGEN, S.; ERGUN, F. Antibacterial, antifungal and antiviral activities of some flavonoids. **Microbiological Research**, v. 165, n. 6, p. 496-504, 2010.

PERRUCCI, S.; FICHI, G.; BUGGIANI, C.; ROSSI, G.; FLAMINI, G. Efficacy of mangiferin against *Cryptosporidium parvum* in a neonatal mouse model. **Parasitology Research**, v. 99, n. 2, p. 184-188, 2006.

PLIAKA, V.; DEDEPSIDIS, E.; KYRIAKOPOULOU, Z.; MPIRLI, K.; TSAKOGIANNIS, D.; PRATTI, A.; LEVIDIOTOU-STEFANOY, S.; MARKOULATOS, P. A new RT-PCR assay for the identification of the predominant recombination types in 2C and 3D genomic regions of vaccine-derived poliovirus strains. **Molecular and Cellular Probes**, v. 24, n. 3, p. 115-123, 2010.

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.

RAJENDRAN, P.; EKAMBARAM, G.; SAKTHISEKARAN, D. Protective role of mangiferin against benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in experimental animals. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 6, p. 1053-1058, 2008.

REIL, H.; BARTLIME, A.; DRERUP, J.; GREWING, T.; KORN, K. Clinical validation of a new triplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection and discrimination of herpes simplex virus types 1 and 2. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 10, n. 4, p. 361-367, 2008.

RIBEIRO, D. A.; OLIVEIRA, L. G. S.; MACÊDO, D. G.; MENEZES, I. R. A.; COSTA, J. G. M.; SILVA, M. A. P.; LACERDA, S. R.; SOUZA, M. M. A. Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 3, p. 1522-1533, 2014.

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, n. 37, p. 1-6, 2012.

RIVERA, D. G.; BALMASEDA, I. H.; LEÓN, A. A.; HERNÁNDEZ, B. C.; MONTIEL, L. M.; GARRIDO, G. G.; CUZZOCREA, S.; HERNÁNDEZ, R. D. Anti-allergic properties of *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and contribution of its glucosylxanthone mangiferin. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, n. 3, p. 385-392, 2006.

ROIZMAN, B.; KNIPE, D. M.; WHITLEY, R. J. Herpes simplex virus. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

ROSS, I. A. **Medicinal plants of the world, chemical constituents, traditional and modern medicinal uses**. Totowa: Humana Press, 1999. 623 p.

ROVOZZO, G. C.; BURKE, C. N. **A manual basic virological techniques**. New Jersey: Prentice-Hall, 1973. 287 p.

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, n. 5, p. 640-645, 2010.

SARKAR, A.; SREENIVASAN, Y.; RAMESH, G. T.; MANNA, S. K. Beta-D-Glucoside suppresses tumor necrosis factor-induced activation of nuclear transcription factor kB but potentiates apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 32, p. 33768-33781, 2004.

SAUERBREI, A.; DEINHARDT, S.; ZELL, R.; WUTZLER, P. Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant clinical isolates of herpes simplex virus. **Antiviral Research**, v. 86, n. 3, p. 246-252, 2010.

SAVI, L. A.; CAON, T.; OLIVEIRA, A. P.; SOBOTTKA, A. M.; WERNER, W.; REGINATTO, F. H.; SCHENKEL, E. P.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. Evaluation of antirotavirus activity of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1142-1146, 2010.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; ARIAS, A. R. A screening method for natural products on triatomine bugs. **Phytotherapy Research**, v. 6, n. 2, p. 68-73, 1992.

SILVA, N. F. **Contribuição do saber local na identificação de plantas medicinais prioritárias para a conservação *in situ* na Floresta Nacional do Araripe, nordeste do Brasil**. 2013. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SRINIVASAN, K. K.; SUBRAMANIAN, S. S.; KOTIAN, K. M.; SHIVANANDA, P. G. Antibacterial activity of mangiferin. **Arogya**, v. 8, n. 1, p. 178-180, 1982.

SRIVASTAVA, M.; KAPOOR, V. P. Seeds galactomannans: an overview. **Chemistry Biodiversity**, v. 2, n. 3, p. 295-317, 2005.

STEVAN, F. R.; OLIVEIRA, M. B.; BUCCHI, D. F.; NOSEDA; IACOMINI, M.; DUARTE, M. E. Cytotoxic effects against HeLa cells of polysaccharides from seaweeds. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 33, n. 4, p. 477-484, 2001.

STOILLOVA, I.; GARGOVA, S.; STOYANOVA, A.; HO, L. Antimicrobial and antioxidant activity of the polyphenol mangiferin. **Herbal Polonica**, v. 51, n. 1, p. 37-44, 2005.

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, n. 1, p. 62-70, 2008.

SUDRÉ, C. P.; RODRIGUES, R.; GONÇALVES, L. S. A.; MARTINS, E. R.; PEREIRA, M. G.; SANTOS, M. H. Genetic divergence among *Dimorphandra spp.* accessions using RAPD markers. **Ciência Rural**, v. 41, n. 4, p. 608-613, 2011.

VIEIRA, I. G. P.; MENDES, F. N. P.; GALLÃO, M. I.; BRITO, E. S. NMR study of galactomannans from the seeds of mesquite tree (*Prosopis juliflora* (Sw) DC). **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 70-73, 2007.

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

WU, J. J.; PANG, K. R.; HUANG, D. B.; TYRING, S. K. Advances in antiviral therapy. **Dermatologic Clinics**, v. 23, n. 2, p. 313-322, 2005.

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 sulphated derivate and fractions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 52, n. 1, p. 9-13, 2013.

ZHAO, L.; WIENTJES, M. G.; AU, J. L. Evaluation of combination chemotherapy: integration of nonlinear regression, curve shift, isobologram, and combination index analyses. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 23, p. 7994-8004, 2004.

ZHENG, M. S.; LU, Z. Y. Antiviral effect of mangiferin and isomangiferin on herpes simplex virus. **Chinese Medical Journal**, v. 103, n. 2, p. 160-165, 1990.

ZHU, W.; CHIU, L. C.; OOI, V. E.; CHAN, P. K.; ANG, P. O. J. Antiviral property and mode of action of a sulphated polysaccharide from *Sargassum patens* against herpes simplex virus type 2. **International Journal of Antimicrobials Agents**, v. 24, n. 3, p. 279-283, 2004.

Table 1 - The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) the galactomannan from *D. gardneriana* associated with magiferin (GLMDg), the sulfated derivatives (GLMDgS) and only the galactomannan from *D. gardneriana* (GLDg) for HSV-1 and PV-1 in HEp-2 cells, by plaque assay. The 50% cytotoxic concentrations (CC_{50}) and the selectivity index (SI), for each compound, are also shown.

	CC_{50} ^a	HSV-1		PV-1	
		IC_{50}	SI	IC_{50}	SI
GLMDg	> 2000	287.5	> 6.95	206.2	> 9.69
GLMDgS	257.5	> 250	< 1.03	NT	NT
GLDg	> 500	910	> 0.54	> 500	≤ ou > 1

NT – not tested.

^a μ g/mL.

Figure 1 - The inhibition of HSV-1 by *D. gardneriana* galactomannan with mangiferin (GLMDg) (%) for the following protocols: (a) time-of-addition (-2 to +8); (b) inhibition of adsorption (IA) and (c) virucida (V) in HEp-2 cell cultures by plaque reduction assay, at the indicated concentrations. 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.

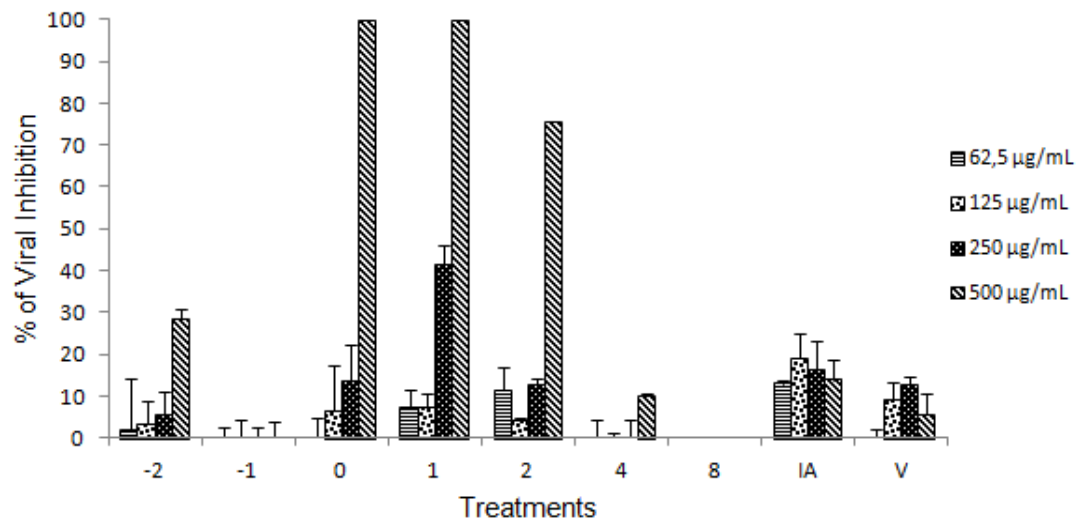


Figure 2 - Virus release assay. The HEp-2 cell monolayer in 24-well plate was infected with HSV-1 for 1 h. The infected cell monolayer was then washed and compound-containing maintenance medium was added. After 20 h incubation at 37°C, supernatant and cell pellet were separately collected, and the virus titer was determined by plaque assay. Virus titer of extracellular (supernatant) and intracellular (cell pellet), in the presence of compound, at the indicated concentrations, are shown in graphic.

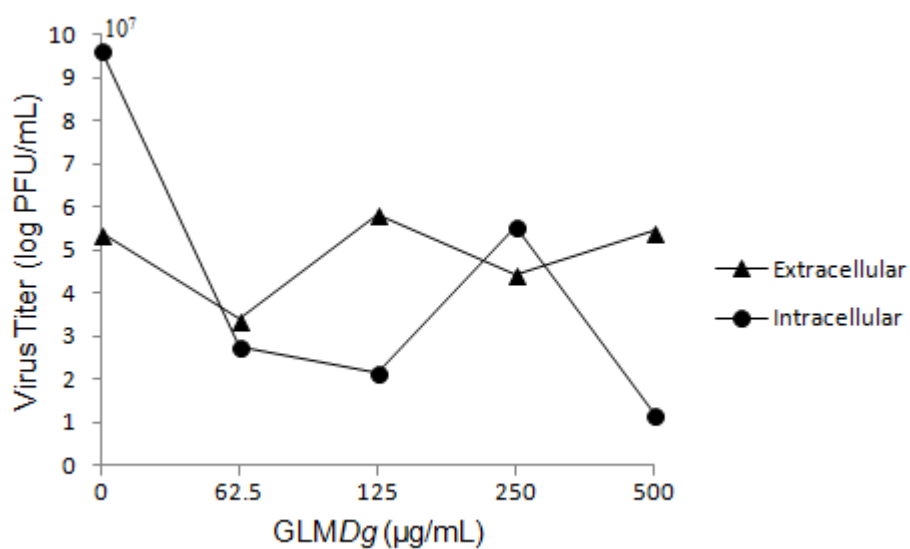


Table 2 - The effect of the galactomannan from *D. gardneriana* associated with magiferin (GLMDg) in the synthesis of HSV-1 and PV-1 protein by immunofluorescence assay. The GLMDg was used at the time 0 h of the infection at the indicated concentrations. The percentage of viral inhibition (%VI) was calculated with respect to untreated infected cells.

GLMDg	HSV-1	PV-1
Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	% of viral inhibition	
0	–	–
62.5	nil	28
125	24.6	28.4
250	42.5	43.8
500	58.1	68.6

Figure 3 - The effect of the *D. gardneriana* galactomannan with mangiferin (GLMDg) in the syntheses of HSV-1 and PV-1 nucleic acids, at the indicated concentrations. Polyacrilamide gel electrophoresis of (A) PCR amplicon for HSV-1 *TK2* (716 bp) and (B) RT-PCR amplicon for PV-1 *VP1–VP4* (102 bp). Negative control (BLK); MW marker (Mw); cell control (CC); virus control (VC); positive inhibitor: aciclovir (ACV) or interferon (INF) and treatments with GLMDg at the indicated concentrations (62.5-500 µg/mL).

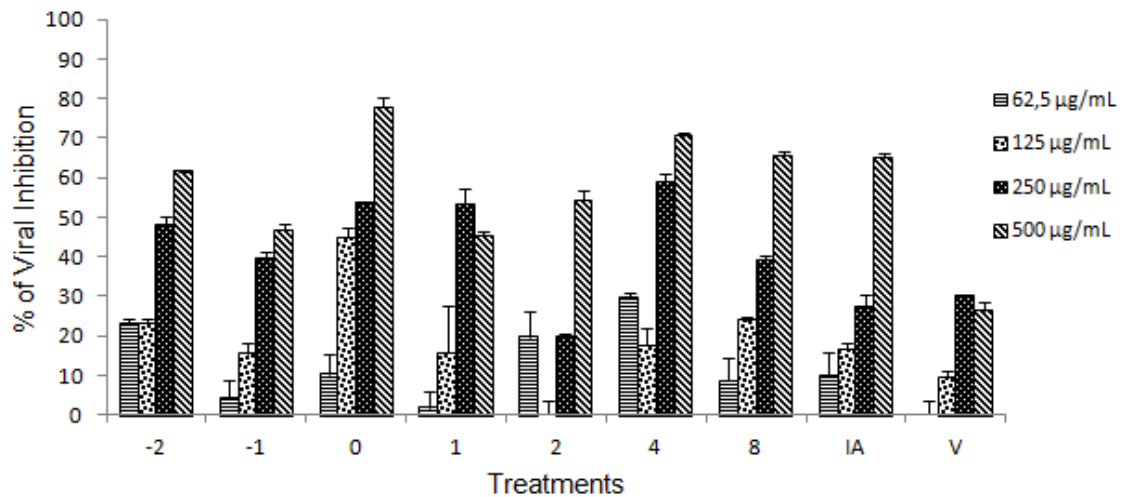
(A) PCR – GLMDg x HSV-1:



(B) RT-PCR – GLMDg x PV-1:



Figure 4 - The inhibition of PV-1 by *D. gardneriana* galactomannan with mangiferin (GLMDg) (%) for the following protocols: (a) time-of-addition (-2 to +8); (b) inhibition of adsorption (IA); and (c) virucida (V) in HEp-2 cell cultures by plaque reduction assay, at the indicated concentrations. 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.



6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi demonstrada a atividade anti-herpesvírus e antipoliiovírus da galactomanana isolada de *Dimorphandra gardneriana* associada com mangiferina em células HEp-2. A substância apresentou um bom índice de seletividade, o que possibilitaria um tratamento efetivo e seguro.

Uma vez que um número significativo de substâncias pode ser encontrado nas plantas, parece plausível concluir que, provavelmente, existem muitos potenciais antivirais e a caracterização desses ativos poderá revelar compostos muito úteis no combate às infecções causadas por vírus. Portanto, diversas estratégias, baseadas em observações etnofarmacológicas, ecológicas ou toxicológicas, juntamente com triagens randomizadas, têm sido usadas na investigação desta enorme biodiversidade com o intuito de continuar contribuindo para o aumento do arsenal terapêutico.

Desta forma, diversos produtos naturais, que apresentam atividade antiviral, *in vitro*, são potenciais candidatos a agentes terapêuticos ou profiláticos das infecções virais, desde que estudos subsequentes (*in vivo* e clínicos) confirmem os achados iniciais.