



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NAYARA LOPES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE UM
POLISSACARÍDEO SULFATADO DE *Caesalpinia ferrea* E
DO FLAVONÓIDE QUERCETINA CONTRA O VÍRUS
HERPES SIMPLEX TIPO 1 (HSV-1) E POLIOVÍRUS TIPO 1
(PV-1)**

NAYARA LOPES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE UM
POLISSACARÍDEO SULFATADO DE *Caesalpinia ferrea* E
DO FLAVONÓIDE QUERCETINA CONTRA O VÍRUS
HERPES SIMPLEX TIPO 1 (HSV-1) E POLIOVÍRUS TIPO 1
(PV-1)**

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

Orientador: Prof. Carlos Nozawa

Londrina
2012

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

L864a Lopes, Nayara.

Avaliação da atividade antiviral de um polissacarídeo sulfatado de *Caesalpinia ferrea* e do flavonóide quercetina contra o vírus Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1) e Poliovírus tipo 1 (PV-1) / Nayara Lopes. – Londrina, 2012.
76 f. : il.

Orientador: Carlos Mitihiko Nozawa.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2012.
Inclui bibliografia.

1. Vírus do herpes – Teses – 2. Herpes simplex – Teses. 3. Poliovírus – Teses.
4. Agentes antivirais – Teses. 5. Polissacarídeos – Teses. 6. Flavonóides – Teses.
7. *Caesalpinia ferrea* – Teses. I. Nozawa, Carlos Mitihiko. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 578.7

NAYARA LOPES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE UM POLISSACARÍDEO
SULFATADO DE *Caesalpinia ferrea* E DO FLAVONÓIDE
QUERCETINA CONTRA O VÍRUS HERPES SIMPLEX TIPO 1 (HSV-1)
E POLIOVÍRUS TIPO 1 (PV-1)**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Carlos Nozawa
UEL – Londrina - PR

Profa. Eliana Carolina Vespero
UEL – Londrina - PR

Prof. Gerson Nakazato
UEL – Londrina - PR

Londrina, ____ de _____ de 2012.

*Aos meus pais, minha família e meus
amigos... presentes de Deus em minha
vida!!!*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Carlos Nozawa, pelos ensinamentos, atenção, paciência e amizade no decorrer desta trajetória;

À Profa. Rosa Elisa C. Linhares, pelo apoio e incentivo;

Aos meus pais, José Roberto Lopes e Neusa Maria R. Lopes, pela confiança, motivação e por estarem sempre ao meu lado;

À minha família, pelo entusiasmo e vibração em relação a esta jornada;

A todos os meus amigos, pelo companheirismo de todas as horas;

Aos professores e colegas de curso, em especial a amiga Ana Carolina Polano Vivan, pois trilhamos juntos uma etapa importante de nossas vidas;

Aos amigos, Lígia C. Faccin Galhardi e Vinícius P. Rincão, pelos conhecimentos compartilhados, pela amizade e atenção de sempre;

Aos meus colegas de laboratório, pela colaboração para a execução e finalização deste trabalho;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste sonho.

*"Sábio é o ser humano que tem coragem de ir diante do espelho da sua alma para reconhecer seus erros e fracassos, e utilizá-los para plantar as mais belas sementes no terreno de sua inteligência."
(Augusto Cury)*

LOPES, Nayara. **Avaliação da atividade antiviral de um polissacarídeo sulfatado de *Caesalpinia ferrea* e do flavonóide quercetina contra o vírus Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1) e Poliovírus tipo 1 (PV-1)**. 2012. 76 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

Apesar dos contínuos avanços em terapia antiviral, as doenças virais se tornaram uma das principais causas de morte no mundo. O vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) infecta 70-90% da população no geral, sendo comumente relacionado a infecções da pele ou das mucosas. O Poliovírus é o agente causador da poliomielite, uma doença aguda do sistema nervoso central, que embora raramente encontrada nos países desenvolvidos, ainda representa uma ameaça à população mundial. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antiviral de um polissacarídeo sulfatado de *Caesalpinia ferrea*, uma espécie arbórea nativa do Brasil, e do flavonóide quercetina contra o vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e o poliovírus tipo 1 (PV-1). A citotoxicidade dos compostos em células HEp-2 foi avaliada através do teste do MTT. A ação antiviral foi analisada pelo ensaio de redução de plaque, através de diferentes protocolos de tratamentos, como tempo de adição (-2, -1, 0, +1 e +2h), inibição da adsorção, inibição da penetração e virucida. Adicionalmente, ensaio de imunofluorescência (IF) avaliou a interferência dos compostos na síntese proteica viral. As substâncias foram analisadas também, quanto ao seu potencial sinérgico ao aciclovir contra o HSV-1. Ambas as substâncias demonstraram resultados satisfatórios quanto a suas propriedades antivirais. O polissacarídeo se mostrou ativo em várias etapas do ciclo replicativo de ambos os vírus, principalmente em estágios iniciais da replicação viral, e atividade sinérgica ao aciclovir. E a quercetina apresentou potente atividade virucida, além da sua ação nas etapas precoces da replicação do HSV-1 e PV-1, porém se mostrou antagônica ao aciclovir. Considerando a importância das pesquisas de novos antivirais, este trabalho evidencia a relevância dos compostos naturais no controle das viroses.

Palavras-chave: Herpesvírus. Poliovírus. *Caesalpinia ferrea*. Quercetina. Antiviral.

LOPES, Nayara. **Antiviral activity of a sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* and the flavonoid quercetin for herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and poliovirus type 1 (PV-1)**. 2012. 76 f. Manuscript (Master's degree in Science in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

Despite continuous advances in antiviral therapy, viral diseases, for many reasons, have become important cause of death worldwide. The herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infects 70-90% of the population in general, being often related to skin or mucous infections. Poliovirus is the causative agent of poliomyelitis, an acute disease of the central nervous system. Although it's a rare disease nowadays in the developed countries, it remains a significant threat for the rest of the world. This study aimed to evaluate the antiviral activity of a sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea*, a native tree to Brazil, and of the flavonoid quercetin for herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and poliovirus type 1 (PV-1). The cytotoxicity of the compounds in Hep-2 cells was evaluated by MTT assay. The antiviral action was investigated by plaque reduction assay, using different protocols, as following, the time of addition (-2, -1, 0, +1 and +2h), inhibition of adsorption, inhibition of penetration and virucidal activity. Additionally, immunofluorescence assay evaluated the interference of the compounds in viral protein syntesis. The substances were also analyzed for their potential synergistic to acyclovir against HSV-1. Both substances demonstrated satisfactory results. The polysaccharide being active at various stages of the replicative cycle for both virus, in particular early stages, and synergistic activity to acyclovir. And quercetin showed potent virucidal activity, beyond its action at the early stages of the replication also for both HSV-1 and PV-1, but proved antagonistic to acyclovir. Considering the importance of research into new antiviral drugs, this study highlights the role of natural compounds in the control of virus.

Keywords: Herpesvirus. Poliovirus. *Caesalpinia férrea*. Quercetin. Antiviral.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	12
2.1	OBJETIVO GERAL	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1	VÍRUS HERPES SIMPLEX	13
3.1.1	Introdução e História	13
3.1.2	Estrutura Viral	14
3.1.3	Replicação Viral	16
3.1.4	Latência	18
3.1.5	O HSV e a Resposta Imunológica do Hospedeiro	20
3.1.6	Patogênese da Infecção pelo HSV	21
3.1.7	Manifestações Clínicas da Infecção por HSV	23
3.1.8	Diagnóstico Laboratorial das Infecções Herpéticas	25
3.1.9	Controle e Tratamento das Infecções Herpéticas	25
3.1.9.1	Desenvolvimento de vacinas	25
3.1.9.2	Medicamentos antivirais	26
3.1.10	Epidemiologia do Vírus Herpes Simplex	28
3.2	POLIOVÍRUS	30
3.2.1	Introdução e História	30
3.2.2	Estrutura Viral	31
3.2.3	Replicação Viral	32
3.2.4	Patogênese da Infecção	33
3.2.5	Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo Poliovírus	34
3.2.6	Prevenção, Controle e Tratamento da Infecção pelo Poliovírus	34
3.2.7	Epidemiologia da Poliomielite no Brasil e no Mundo	37
3.3	PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE NOVAS DROGAS	40
3.3.1	Caesalpinia Ferrea	41
3.3.2	Quercetina	42
	REFERÊNCIAS	44

4	ARTIGO A – SULFATED POLYSACCHARIDE OF CAESALPINIA FERREA INHIBITS HERPES SIMPLEX VIRUS AND POLIOVIRUS.....	50
5	ARTIGO B – QUERCETIN INHIBITS HERPES SIMPLEX AND POLIOVIRUS.....	65
	CONCLUSÃO.....	76

1 INTRODUÇÃO

Os vírus são entidades ultramicroscópicas, metabolicamente inertes, estruturalmente caracterizados como partículas providas de material genético formado por DNA ou RNA, incluído em um capsídeo protéico, sendo ou não envolvidos por um envelope lipoprotéico. Cada grupo de vírus é único em sua estrutura antigênica de superfície, seus receptores nas células hospedeiras e seu ciclo replicativo. Como consequência, os vírus mostram uma extensa variedade no modo de transmissão, replicação e capacidade de persistir no hospedeiro. Desta forma, estes agentes têm se adaptado para atingir diversas formas de vida na biosfera e têm ocupado numerosos nichos ecológicos, podendo causar doenças em seres humanos, animais ou plantas. Atualmente, apesar dos contínuos avanços em terapia antiviral, as doenças virais se tornaram uma das principais causas de morte em humanos no mundo (CHATTOPADHYAY et al., 2009).

Encontrar propriedades curativas nas plantas é, na verdade, uma idéia antiga. Populações em todos os continentes, desde muito tempo, aplicam emplastos e infusões embebidas em chás de centenas, senão de milhares de plantas, um hábito que remete à pré-história. Existem evidências de que os Neandertais, que viveram há 60 mil anos atrás no atual Iraque, usavam plantas que são ainda hoje amplamente utilizadas na etnomedicina em todo o mundo. Historicamente, os resultados terapêuticos envolvem tanto a cura quanto o alívio de sintomas, porém envenenamentos também ocorreram em uma taxa elevada. Microbiologistas têm se interessado cada vez mais em explorar fontes naturais no desenvolvimento de novos antimicrobianos. Laboratórios do mundo todo têm encontrado milhares de compostos naturais com efeitos inibitórios sobre diversos microrganismos *in vitro*, fornecendo o embasamento necessário para estudos posteriores *in vivo* (COWAN, 1999; CHATTOPADHYAY et al., 2009).

A versatilidade genética e fenotípica crescente do vírus da imunodeficiência humana (HIV), a incidência constante de várias infecções virais, tais como as do vírus herpes simplex (HSV), vírus da varicela-zoster (VZV), citomegalovírus (CMV), o vírus Epstein-Barr (EBV), o vírus influenza, o vírus da Dengue, os vírus gastroentéricos, os vírus das hepatites virais, dentre outras tantas importantes, bem como as suas interrelações e as repercussões em pacientes

imunocomprometidos, têm representado um elevado impacto socioeconômico mundial. Deve ser considerada ainda a emergência de doenças desconhecidas e o ressurgimento de viroses exóticas, além da seleção de mutantes por circunstâncias naturais e/ou induzidas que são também fatores de grande preocupação mundial. Todas estas condições devem ser consideradas, assim como os esforços e os incentivos para o desenvolvimento de novos e eficazes antivirais. Há também a necessidade de novas substâncias com atividade virucida, uma vez que muitos dos antissépticos e desinfetantes existentes têm falhado no combate aos vírus em ambiente de modo geral. Tais compostos seriam muito úteis para diminuir a transmissibilidade dos vírus (VLIETINCK; BERGHE, 1991; CHATTOPADHYAY et al., 2010).

Produtos naturais selecionados com base em dados etnofarmacológicos têm estado entre os programas mais bem sucedidos de triagem de plantas para testes de atividade antiviral. 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 para o meio extracelular, o que pode resultar em mecanismos de ação complementares às drogas antivirais existentes (VLIETINCK; BERGHE, 1991).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Analisar a atividade antiviral de um polissacarídeo sulfatado de *Caesalpinia ferrea* e do flavonóide quercetina contra HSV-1 e PV-1 *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade das substâncias em células HEp-2;
- Verificar o efeito dos compostos nas etapas da replicação de ambos os vírus, através de diferentes protocolos de tratamento;
- Avaliar o potencial sinérgico das substâncias ao Aciclovir contra o HSV-1.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 VÍRUS HERPES SIMPLEX

3.1.1 Introdução e História

Vários fatos presentes na literatura revelam que lesões semelhantes às causadas pelo vírus herpes simplex (HSV) aparecem na história da humanidade desde milênios atrás. Assim, descrições de lesões genitais foram encontradas em tábuas sumerianas por volta de 3000 a.C., e também no papiro de Ebers (por volta de 1500 a.C.). Hipócrates (460/377 a.C.), médico da Grécia antiga, usou a palavra grega *herpes* para descrever lesões vesiculares na pele. Porém, em todos os casos, as lesões descritas poderiam ser atribuídas a diversas etiologias além da viral, como fúngicas ou parasitárias, infecções simultâneas por vários patógenos, ou mesmo doenças malignas cutâneas. Celsius pode ter sido o primeiro a descrever uma lesão herpética real, relatando-a inicialmente redonda e que depois se difunde, porém esta descrição seria mais aplicável ao vírus varicela-zoster do que ao HSV. O historiador grego Heródoto (484/425 a.C.) descreveu a infecção herpética como capaz de causar febre, pequenas vesículas na boca e ulcerações nos lábios, denominando-a *herpes febrilis*. Galeno (129/204 a.C.), farmacêutico e médico grego, dizia que as lesões eram uma maneira do corpo liberar os humores malignos em forma de bolhas, e observou que tais lesões se repetiam no mesmo local anatômico. No decorrer dos séculos, a partir da descrição de Galeno até o século 17, o termo *herpes* foi usado para descrever inúmeras enfermidades da pele, não necessariamente produzidas por herpesvírus. Coube a Vidal, em 1873, a comprovação de que o herpes era infeccioso e podia ser transmitido de pessoa a pessoa (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

O primeiro isolamento do HSV reconhecido pela comunidade científica foi no ano de 1919 por Lowenstein. Porém, trabalhos anteriores realizados por Gruter já mostravam este isolamento em córnea de coelho. Na década de 1930, um dos marcos da biologia do HSV foi a observação feita por Andrews e Carmichael, de que infecções recorrentes ocorriam somente em adultos que traziam anticorpos neutralizantes, o que contrasta com o comportamento de outros agentes

infecciosos conhecidos na época. Em 1968, Nahmias e Dowdle demonstraram que havia dois sorotipos de herpesvírus, HSV-1 e HSV-2, com base em suas diferenças antigênicas e biológicas (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

O HSV foi o primeiro herpesvírus humano a ser descoberto e está entre os mais intensamente estudados. O vírus apresenta características peculiares, como a capacidade de causar uma variedade de infecções, estabelece latência por toda a vida do hospedeiro e reativa-se causando lesões no local inicial da infecção ou próximas a este. Eles servem como modelo e ferramenta para estudos de translocação de proteínas, conexões sinápticas no sistema nervoso, estrutura de membrana, regulação gênica, terapia gênica, terapia contra o câncer e outros inúmeros problemas biológicos a serem decifrados (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007). Devido a sua capacidade de infectar vários tipos celulares, juntamente com o conhecimento abrangente a respeito da sua organização do genoma e biologia, o HSV-1 tem sido alvo de interesse no desenvolvimento de várias ferramentas de transferência gênica (SILVA; BOWERS, 2009). Na área médica, apesar de infecções graves por HSV serem raras, constituem uma preocupação significativa, dada as altas taxas de soropositividade na população (KOELLE; COREY, 2003).

Os vírus HSV-1 e HSV-2 fazem parte da família *Herpesviridae*, subfamília *Alfaherpesvirinae*, gênero *Simplexvirus*. Embora os dois sorotipos sejam geneticamente muito semelhantes, diferem em vários aspectos. O HSV-1 é mais frequentemente associado às infecções não-genitais e o HSV-2 àquelas que causam lesões genitais. Apesar de um considerável grau de neutralização cruzada, eles podem ser distinguidos sorologicamente, pela diferença antigênica das glicoproteínas do envelope (KOELLE; COREY, 2003; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007; FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007).

3.1.2 Estrutura Viral

O HSV é um vírus de DNA dupla fita linear que é transcrito e replicado no núcleo. O virion é constituído também pelo capsídeo, uma estrutura protéica amorfa chamada tegumento e um envelope glicolipoprotéico. Estudos definem a partícula viral como sendo esférica com diâmetro aproximado de 186 nm,

o qual se estende a 225 nm incluindo as espículas (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008; LACASSE; SCHANG, 2010).

O DNA do HSV possui cerca de 85 sequências abertas de leitura (*open reading frames* – ORF), que codificam aproximadamente 100 proteínas que constituem o capsídeo, componentes do envelope, tegumento, além de outras proteínas geradas somente durante o ciclo de replicação do vírus, denominadas proteínas não estruturais ou funcionais. A nomenclatura mais comumente utilizada para designar proteínas virais é VP (*virion protein*) ou ICP (*infected cell protein*). As proteínas do HSV também têm sido nomeadas com base nas sequências abertas de leitura que as codificam (por exemplo, U_L8) (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

Estudos baseados na caracterização física do genoma do HSV estimaram originalmente ser de aproximadamente 150 kbp, com 68% G/C para HSV-1 e 69% para HSV-2 (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007). O genoma do HSV é constituído de dois componentes que são formados por sequências únicas (U) covalentemente ligadas, chamadas de L (*long*) e S (*short*), com relação ao tamanho do fragmento genômico que será lido, utilizando as siglas U_L ou U_S. Pode ser feita uma divisão do genoma em seis importantes regiões: 1) **Sequências “a”** – As terminações da molécula linear, chamadas de sequências “a”, são importantes na circularização do DNA viral e no empacotamento do DNA no vírion; 2) **R_L** – Sequência longa repetida (R_L) de 9kpb, codifica a proteína regulatória inicial $\alpha 0$ e contém também o promotor e a maioria dos genes relacionados aos transcritos associados à latência (LATs – *latency-associated transcripts*); 3) **U_L** – Região longa única (U_L) de 108kpb, codifica pelo menos 56 proteínas diferentes; 4) **R_S** – Região de repetições curtas (R_S) de 6,6 kpb, codifica a mais importante proteína precoce imediata, que é uma poderosa ativadora transcricional; 5) **Ori_L** – Origem de replicação (Ori_L), está no meio da região U_L, enquanto a Ori_S está em R_S, sendo que todo o conjunto de Ori_S funciona durante a infecção para gerar um complexo de replicação; 6) **U_S** – Região curta única (U_S), codifica 12 ORF_S, várias das quais são glicoproteínas importantes na formação do vírus e nos mecanismos de defesa do organismo (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

O material genético viral está protegido no interior de uma capa protéica chamada capsídeo. Este é composto por 162 capsômeros arranjados em

simetria icosaédrica. A camada externa do capsídeo é composta por 4 proteínas virais: VP5, VP26, VP23 e VP19C. O capsídeo também contém a proteína U_L6, que forma um dodecâmero para formar um portal através do qual o DNA viral é empacotado; e a VP24, protease que desempenha um apoio durante a encapsidação do DNA. A proteína U_L16 também pode estar associada ao capsídeo, já que ela desempenha um papel importante na encapsidação do DNA (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007).

O espaço entre a superfície do capsídeo e a superfície interna do envelope é designado como tegumento, o qual é em grande parte não-estruturado, e composto por, pelo menos, 20 proteínas virais (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007). As principais proteínas constituintes do tegumento são: α -TIF, também chamada VP16, envolvida na regulação da transcrição de genes precoces imediatos, e a proteína VHS (*host shut-off protein* ou VP22), relacionada a regulação da transcrição de genes da célula hospedeira, estabilização de certas proteínas virais, como a gE, gD e ICP0, além de estar relacionada a disseminação viral durante a infecção lítica (SILVA; BOWERS, 2009).

Por fim, o envelope consiste em uma bicamada lipídica com aproximadamente 11 glicoproteínas virais diferentes incorporadas a esta. Tais glicoproteínas estão envolvidas na interação com receptores celulares que facilitam a entrada do vírus na célula no início da infecção. Dentre estas, a glicoproteína B (gB), gC, gD, gH e gL são importantes para a adsorção, fusão com a membrana celular e internalização do vírus (SILVA; BOWERS, 2009).

3.1.3 Replicação Viral

O HSV estabelece uma infecção lítica em células epiteliais e infecção latente em neurônios *in vivo*. Durante a infecção lítica, todos os seus genes são expressos e o genoma é replicado. Já durante a infecção latente, a expressão gênica viral é restrita e o seu genoma não é replicado (LACASSE; SCHANG, 2010).

Para iniciar a infecção de uma célula, é necessária a adsorção do vírus através da ligação de glicoproteínas do envelope viral às glicosaminoglicanas presentes na superfície celular, tais como moléculas de sulfato de heparana (HS), sulfato de condroitina (CS) e sulfato de dermatana (DS). A fusão do envelope com a

membrana plasmática segue rapidamente a ligação inicial. A estrutura tegumento-capsídeo desenvolvida é então transportada para os poros nucleares onde o DNA é liberado para o núcleo. A transcrição do genoma viral, a replicação do DNA viral e a montagem de novos capsídeos são realizadas no núcleo. O genoma é acompanhado da proteína α -TIF (proteína do tegumento) complexada com as proteínas do hospedeiro, HCF (*host cell factor*) e OCT-1, as quais funcionam como ativadores da transcrição dos genes precoces imediatos via fatores de transcrição celulares. A proteína VHS permanece no citoplasma, onde causa a desagregação de polirribossomas e a degradação de RNAs celulares, parando a síntese de proteínas da célula hospedeira. O DNA viral é transcrito durante toda a infecção produtiva por RNA polimerase II (pol II) do hospedeiro, mas com a participação de fatores virais em todas as fases da infecção. A síntese dos produtos de genes virais é estreitamente regulada: a expressão é coordenadamente regulada e sequencialmente ordenada em uma forma de cascata (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008). Ou seja, a expressão de genes ocorre de forma que os produtos de cada classe de genes são necessários para a expressão dos genes da classe subsequente. A primeira classe de genes a ser transcrito e traduzido são precoces imediatos (genes *alfa*), que além de proporcionar transativação e funções de exportação/transporte, são necessários para a transcrição dos genes precoces (genes *beta*). Os genes precoces codificam várias proteínas importantes na replicação do DNA viral, e são pré-requisitos para a expressão dos genes tardios (genes *gama*), os quais estão relacionados produção de proteínas estruturais (BLOOM; GIORDANI; KWIATKOWSKI, 2010).

A montagem das novas partículas virais ocorre em várias etapas. O empacotamento do DNA viral em capsídeos pré-sintetizados forma os nucleocapsídeos, os quais sofrem maturação e adquirem infecciosidade, saindo do núcleo por brotamento da lamela externa ou passagem pelo poro nuclear (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007). A transição do nucleocapsídeo no espaço entre a membrana externa do núcleo chegando à membrana citoplasmática ainda não está bem estabelecida. A hipótese mais recente sugere que ele sofre um primeiro envelopamento na lamela interna da membrana nuclear e perde este envelope na membrana externa do núcleo. Depois, sofre um segundo envelopamento em vesículas da membrana plasmática onde a fusão da vesícula

com a membrana plasmática libera os virions para o meio extracelular. Outro mecanismo foi proposto por Epstein, em 1962, em 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. Há ainda, um terceiro mecanismo em que o nucleocapsídeo sai do núcleo através de poros nucleares aumentados e torna-se envelopado em vesículas derivadas do Golgi e sai por fusão da membrana da vesícula com a membrana citoplasmática. No entanto, independentemente da rota utilizada para sair da célula infectada, evidências mostram que o envelope viral tem natureza bioquímica de constituição lipídica compatível com estruturas de membranas citoplasmáticas e não de membrana nuclear. Em células permissivas, o ciclo de biossíntese do HSV dura aproximadamente 18 a 20 horas (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

3.1.4 Latência

A capacidade de estabelecer infecção persistente do tipo latente é uma característica de toda a família *Herpesviridae*, variando o sítio de latência de acordo com a subfamília. A principal característica da subfamília *Alfaherpesvirinae* é estabelecer latência nos nervos sensoriais (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

A infecção latente é caracterizada por um desligamento das funções de replicação do vírus e pela incapacidade de detectar vírus infeccioso. A reativação periódica da infecção permite a posterior transmissão a outros hospedeiros. Durante a latência, o genoma do vírus é mantido em várias cópias na forma de epissoma circular dentro do núcleo da célula na qual se estabelece a latência (BLOOM; GIORDANI; KWIATKOWSKI, 2010).

No período de latência, o DNA não está totalmente silencioso. Nenhum dos genes virais expressos durante a fase lítica é detectado, mas alguns RNAs, denominados transcritos relacionados à latência (*latency-associated transcripts* – LATs), podem ser encontrados em níveis elevados. A razão para que haja a transcrição contínua de genes LAT não é conhecida em detalhes, mas essa é uma característica da latência do HSV nos neurônios. Somente uma pequena quantidade de neurônios, no gânglio, é infectada. Eles abrigam múltiplas cópias do genoma viral, mas nem todos expressam LAT. Este fato leva a constatação de que,

uma vez estabelecida a infecção latente, mecanismos de repressão do hospedeiro ajudam na manutenção da latência, independentemente da expressão de LAT. Por outro lado, existem evidências de que a síntese dos LATs pode facilitar a reativação espontânea dos vírus latentes (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

Embora existam relatos da existência de genoma de HSV após a resolução das infecções agudas nas células da pele ou córnea, é provável que estes representem genomas residuais de eventos recentes de reativação. Geralmente, os neurônios sensoriais são vistos como o principal reservatório de HSV durante os períodos de latência (BLOOM; GIORDANI; KWIATKOWSKI, 2010).

Uma série de mecanismos tem sido propostos para explicar a infecção não-permissiva ou latente dos HSV. Porém, é provável que esses vários mecanismos se combinem para compor os eventos que levam a esse tipo de infecção nos neurônios sensoriais por este vírus:

1. Repressão da expressão de genes líticos virais por fatores da célula hospedeira: evidências mostram que o fator Oct-2 do hospedeiro reprime a expressão de genes precoces imediatos, por meio de sua interação com determinados sítios gênicos, bloqueando a ativação de Oct-1. Entretanto, outros pesquisadores não detectaram a expressão de Oct-2 em neurônios sensoriais e, mesmo quando Oct-2 foi expresso em grande quantidade nas células, ele não reduziu a expressão do promotor de genes precoces imediatos. Por outro lado, tem sido postulado recentemente que fatores específicos dos neurônios bloqueiam a ativação de promotores de genes precoces imediatos através da interação com sítios de ligação em Oct-1.

2. Diversos estudos levantaram a hipótese de que os neurônios sensoriais exibem uma escassez de fatores essenciais para a expressão de genes do HSV, explicando assim a infecção latente nessas células.

3. Embora nenhum gene viral é isoladamente essencial para a infecção latente, existem evidências de que os genes LAT faz aumentar o número de neurônios latentemente infectados. Alguns estudos mostram que os genes LAT levam a uma repressão da expressão gênica lítica durante a infecção aguda.

4. Inibição da replicação viral pela resposta imune do hospedeiro: tem sido relatado que células T CD8⁺ ou INF podem bloquear a expressão de genes virais e sua replicação (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007).

O processo de reativação da latência é desencadeado por um estímulo local, tal como injúria ao tecido enervado por neurônios infectados pelo vírus ou por estímulo sistêmico como estresse físico ou emocional, febre, exposição à luz ultravioleta, menstruação, desequilíbrio hormonal, assim como por outros sinais que possam reativar o vírus simultaneamente em neurônios de diversos gânglios. Esses estímulos podem estar associados à elevação local de prostaglandinas das classes E e F, que são rapidamente sintetizadas na membrana plasmática em resposta à injúria tissular e são liberadas nos espaços extracelulares, ativando a liberação intracitoplasmática de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) que, por sua vez, ativa proteíno-cinases celulares, as quais fosforila outras proteínas, causando a ativação da expressão de genes virais. A explicação para isso é que um ou vários neurônios infectados latentemente repliquem somente uns poucos genomas e gerem poucos vírus infecciosos durante a reativação inicial. Isso pode acontecer com ou sem dano celular intenso ou com a morte de apenas poucas células (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

3.1.5 O HSV e a Resposta Imunológica do Hospedeiro

A história natural das infecções pelo HSV tipos 1 e 2 é influenciada por mecanismos de defesa específica e/ou inespecífica do hospedeiro. A resposta inicial do hospedeiro é do tipo inflamatória inespecífica e surge paralelamente à replicação viral na célula. Ao mesmo tempo, ocorre a indução da resposta específica, com recrutamento de mais células efetoras ao local de infecção inicial (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

O HSV evoluiu durante um longo período de tempo juntamente com seu hospedeiro humano, por isso teve tempo para se adaptar e adquirir mecanismos que possibilitassem a evasão do sistema imune de seu hospedeiro e também para que o hospedeiro pudesse evoluir buscando anular estes mecanismos de evasão do vírus. Este impasse, de alguma forma alcançou um estado de equilíbrio, já que o HSV é capaz de persistir por meio de uma infecção latente e a sua infecção lítica pode ser controlada pela resposta imune do hospedeiro imunocompetente. Além da evasão óbvia desempenhada pelo HSV ao estabelecer latência, vários produtos gênicos virais desempenham um papel ativo na redução ou bloqueio da resposta

imune do hospedeiro ou dos seus efeitos. Um exemplo disso é a glicoproteína C do HSV que se liga à componente C3b do complemento e impede a ativação da cascata do complemento. Desta forma, gC evita a neutralização viral pelo anticorpo natural IgM mediada pelo complemento (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007).

Um dos primeiros mecanismos de evasão do HSV refere-se, indiretamente, ao bloqueio da apresentação de antígenos pelo MHC I, pela proteína viral ICP47. Desta forma, evita-se a função efetora das células T CD8⁺, além de inibir a ativação de células T CD8⁺ HSV-específicas. Além disso, a proteína ICP22 inibe as células B de apresentarem antígenos às células T CD4⁺ através do MHC classe II. A passagem do vírus de célula-célula é também um eficiente mecanismo de evasão à neutralização pelos anticorpos (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

A evasão ao efeito antiviral do INF é um mecanismo desconhecido, porém, supostamente levado a cabo pelas proteínas U_L41, ICP0 e a proteína tardia 34.5. Finalmente, o vírus é considerado inibidor da apoptose, e nestas condições perpetua a atividade metabólica das células infectadas, facilitando a replicação viral (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007).

3.1.6 Patogênese da Infecção pelo HSV

A transmissão do HSV depende do contato íntimo entre um indivíduo suscetível e o infectado que esteja excretando o vírus. Após a infecção oral, geralmente causada pelo HSV-1, o gânglio trigêmeo se torna colonizado, sendo o local de manutenção do vírus em estado de latente. A aquisição da infecção pelo HSV-2 é geralmente consequência da transmissão pelo contato genital e o vírus estabelece latência nos gânglios sacrais. O vírus também pode ser transmitido por gotículas de secreções respiratórias ou exposição às secreções mucocutâneas de uma pessoa com infecção assintomática (FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

O princípio fundamental da patogênese da doença é, portanto, a capacidade do vírus se replicar na superfície das mucosas e se tornar latente nos gânglios. Após estabelecer infecção lítica nas células do sítio da primeira infecção, na mucosa ou epiderme, os vírus penetram pelas terminações nervosas e são

transportados pelos axônios, em um sentido retrógrado ao estímulo nervoso, para os gânglios onde a latência pode ser estabelecida. A replicação pode levar a doença e raramente resultar em infecção do SNC, porém, há o predomínio de infecção latente. A infecção primária pode se disseminar além dos gânglios, tornando-se sistêmica. Evidências clínicas de doença generalizada são encontradas acometendo neonatos, gestantes e pacientes imunocomprometidos. Portanto, o envolvimento de órgãos de forma generalizada é associado à viremia em hospedeiros incapazes de limitar a replicação do vírus em superfícies mucosas (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

Após a infecção primária, o HSV latente é reativado periodicamente, com migração dos vírus dos gânglios sensoriais para causar a doença oral ou genital recorrente. A suscetibilidade genética de um indivíduo, estado imunológico, idade, localização anatômica da infecção, dose inicial do inoculo e subtipo viral parecem influenciar a frequência de recorrência. Normalmente, a infecção primária é mais invasiva que a recorrente, devido à inexistência de imunidade celular e humoral. A infecção primária por HSV-1 ou HSV-2 dura de duas a três semanas, mas a dor pode persistir por até seis semanas. Os surtos recorrentes podem ocorrer em intervalos de dias, semanas ou anos. Para a maioria das pessoas, as recorrências são mais frequentes nos primeiros anos após o primeiro ataque. Durante esse tempo, a resposta imunológica do indivíduo faz com que progressivamente as recorrências sejam mais brandas e menos frequentes. Porém, o sistema imunológico não é capaz de erradicar o vírus do organismo (FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

Após o começo do ciclo replicativo, as células infectadas sofrem uma alteração profunda em sua organização estrutural e bioquímica, resultando em sua morte. Essas mudanças são a combinação de morte celular induzida pela replicação do vírus e a resposta inflamatória mediada pelas respostas específica e inespecífica do hospedeiro. Com a lise celular, um fluido líquido e claro (líquido vesicular), contendo grande quantidade de vírus, aparece entre a epiderme e a derme. Esse fluido contém também restos celulares e células inflamatórias. Quando ocorre a remissão da lesão, o fluido torna-se purulento, com o recrutamento de mais células inflamatórias, seguido do aparecimento de crosta, e entra em remissão sem deixar cicatriz (KOELLE; COREY, 2003; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

3.1.7 Manifestações Clínicas da Infecção por HSV

A gengivoestomatite herpética é a manifestação mais comum da infecção orofacial pelo HSV e é caracterizada por lesões vesiculares e/ou ulcerativas orais ou periorais. Febre e outros sintomas não específicos também podem ocorrer. No hospedeiro imunocompetente, os sintomas são auto-limitados e o tratamento não é recomendado de rotina, embora a terapia antiviral iniciada nas primeiras 72h pode diminuir a duração das manifestações clínicas e a excreção viral. A primeira infecção ocorre mais comumente em crianças entre 1 e 5 anos de idade, porém alguns casos em adultos também são relatados (FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007; WILSON; FAKIOGLU; HEROLD, 2009). Geralmente, na infecção primária pelo HSV-1, ocorre o acometimento da orofaringe que pode ser caracterizado por febre, úlceras na garganta, lesões vesiculares e ulcerativas, gengivoestomatite, edema, linfadenopatia localizada, anorexia e dor. Em adultos a faringite pode estar relacionada a sintomas semelhantes à mononucleose. (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

A infecção genital pelo HSV, em particular pelo HSV-2, é a causa mais comum de lesões ulcerativas genitais de transmissão sexual no mundo. A infecção primária é precedida por um período prodromático de dor localizada, formigamento ou sensação de queimação, com duração de até 24 horas. Dentro de alguns dias do ato sexual, aparecem vesículas de tamanhos variados nos órgãos genitais, que se rompem formando lesões com crosta (FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007). A prevenção ou supressão do herpes genital é especialmente importante durante a gravidez. A maioria das mães cujos bebês desenvolvem infecção perinatal por HSV não tem histórico clínico prévio da doença. O risco de transmissão para o recém-nascido é maior entre mulheres que adquirem a infecção primária próxima ao parto (30-50%), em comparação a mulheres que têm imunidade pré-existente (<1%). Além disso, resultados epidemiológicos mostram que as lesões genitais aumentam a aquisição e a transmissão do HIV, o que enfatiza a necessidade da prevenção e tratamento destas infecções pelo HSV (WILSON; FAKIOGLU; HEROLD, 2009).

Uma infecção também bastante comum causada pelo HSV é o nódulo herpético, ou panarício herpético, resultante da direta inoculação do HSV-1 ou HSV-2 nas falanges dos dedos. Afeta principalmente profissionais de saúde e, crianças com herpes oral primária e adultos com infecção genital por HSV, por

autocontaminação (FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

A infecção ocular pelo HSV manifesta-se mais comumente como ceratite, e estima-se que existam 59.000 episódios novos e recorrentes anualmente nos Estados Unidos. A maioria destas infecções oculares estão associadas ao HSV-1 e pode ocorrer em associação a lesões orais (WILSON; FAKIOGLU; HEROLD, 2009). O HSV-1 ocular, geralmente se apresenta primeiramente como conjuntivite, que pode então evoluir à ceratite epitelial ou à infecção mais profunda da córnea. Em cada episódio de doença recorrente o dano da córnea pode aumentar, resultando em envolvimento do estroma, opacificação da córnea e neovascularização. O dano maior observado em infecções posteriores mais intensas é, provavelmente, devido ao aumento da imunidade ao vírus, uma vez que esta forma da doença é claramente resultado de uma resposta imunopatológica (BRANDT, 2005).

A encefalite é uma das infecções mais devastadoras dentre todas as outras causadas pelos herpesvírus. A maioria dos casos em adultos está relacionada ao HSV-1, enquanto em neonatos é mais frequentemente associada ao HSV-2. Se a encefalite é devida a reativação viral ou a uma infecção primária ainda não está totalmente esclarecida, visto que ela ocorre em apenas uma pequena minoria de indivíduos infectados pelo HSV-1. As manifestações clínicas em adultos e crianças mais velhas variam desde encefalite focal com febre, até alteração de consciência e comportamento, desordem mental e alterações neurológicas. A terapia antiviral deve ser introduzida o quanto antes, depois de descartado outro agente infeccioso (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008; WILSON; FAKIOGLU; HEROLD, 2009).

Infecções neonatais podem resultar da exposição direta do bebê a lesões ou secreções maternas infectadas, ou em manifestações assintomáticas durante o parto. A transmissão do HSV ao bebê também pode ocorrer por via transplacentária ou através do contato com profissionais de saúde infectados ou familiares após o parto. Quase 10% das infecções por HSV são atribuídas à exposição pós-natal. Infecções por HSV adquiridas no nascimento são frequentemente sintomáticas e se manifestam de maneiras diferenciadas, com prognósticos variados. Estes incluem a doença neonatal limitada a pele, olhos e

boca, encefalite neonatal e doença disseminada envolvendo pulmão, fígado e outros órgãos. A infecção congênita por HSV é rara e pode levar a microcefalia, hidrocefalia, retinite e erupções cutâneas vesiculares (FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007).

3.1.8 Diagnóstico Laboratorial das Infecções Herpéticas

Embora a forma recorrente seja relativamente fácil de identificar pelo tipo de lesão e histórico da doença, nas infecções primárias de manifestações clínicas atípicas e nas reativações assintomáticas (*shedding*) é necessário que se faça o diagnóstico laboratorial da infecção (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

Os métodos laboratoriais utilizados incluem o isolamento viral em cultura de células, esfregaço citológico do conteúdo vesicular, análises por imunofluorescência (IF), biópsia de tecido, detecção de DNA viral por PCR e testes sorológicos (FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007).

O isolamento do vírus ainda é o método de diagnóstico de escolha. Se a lesão está presente é feita uma escarificação das vesículas com um *swab*, ou retirada do líquido da vesícula. O isolamento viral é mais comumente realizado em cultura de células (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

Quando necessário, na ausência clínica da lesão, os testes sorológicos devem ser empregados para identificar a pessoa infectada, e devem ser realizados de 12 a 16 semanas após a exposição ao vírus. Os testes sorológicos mais empregados são *western blotting*, ELISA e IF. Atualmente, os métodos moleculares têm sido de grande valia. A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido a mais empregada, e em um futuro próximo, talvez a técnica de hibridização em microarranjos seja utilizada em rotina de diagnóstico.

3.1.9 Controle e Tratamento das Infecções Herpéticas

3.1.9.1 Desenvolvimento de vacinas

A vacinação continua sendo o método ideal para a prevenção das infecções virais, no entanto, a prevenção da infecção por HSV apresenta problemas

únicos por causa da recorrência, mesmo na presença de imunidade humoral. Porém, a proteção contra a infecção potencialmente fatal pode ser alcançada em modelos animais com vacinas atenuadas, inativadas ou de subunidades glicoprotéicas (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007).

Durante a última década houve um ressurgimento da pesquisa de vacinas contra o HSV. Estes esforços recentes têm se concentrado na aplicação de técnicas moleculares para a preparação e desenvolvimento de antígenos, bem como, a utilização de alguns adjuvantes (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007). As glicoproteínas do envelope gB, gD e o complexo gH-gL são necessárias para a ligação com a membrana celular e sequente entrada do vírus na célula. Sendo assim, a atividade neutralizante de anticorpos dirigidos contra essas proteínas foi uma das principais razões para o uso destas como imunógenos em vacinas de subunidades glicoprotéicas (KOELLE; COREY, 2003).

Ferimentos na pele ajudam o HSV a obter acesso às células abaixo da camada de queratina da pele. Teoricamente, anticorpos locais poderiam neutralizar o vírus antes da entrada na célula. Neste caso, não ocorreria a replicação inicial, impedindo tanto a infecção aguda quanto a transmissão ao neurônio, que provocaria a infecção latente. Esta forma de imunidade foi alcançada em camundongos, mas requer imunização com o vírus ativo. Ou seja, vacinas que protejam plenamente da morbidade e mortalidade em animais, ainda assim permitiriam a replicação inicial no local da inoculação vacinal. Desta forma, se anticorpos específicos contra o HSV são detectáveis nas secreções de pessoas infectadas, da mesma forma que naquelas imunizadas pela vacinação, torna-se duvidosa a atividade da vacina em humanos (KOELLE; COREY, 2003).

3.1.9.2 Medicamentos antivirais

Nenhum quimioterápico desenvolvido até o momento é capaz de curar a infecção herpética. O paciente pode ter recorrências mesmo sob tratamento e continua a transmitir o vírus. No entanto, as drogas anti-herpes reduzem os sintomas e diminuem o tempo da manifestação clínica.

Os primeiros agentes antivirais desenvolvidos para as infecções herpéticas foram os análogos halogenados de nucleosídeos, como a

iododesoxiuridina (IDU) e a trifluridina. Seu mecanismo de ação consiste na sua incorporação na forma trifosfatada ao DNA viral, com consequente inibição da replicação do vírus. Não têm ação seletiva por serem fosforilados por enzimas celulares, conseqüentemente, comprometem também o DNA celular, sendo muito tóxicos para serem administrados por outra via que não a tópica.

Na década de 1970, a vidarabina (adenina arabinosídeo) tornou-se o primeiro antiviral licenciado para o tratamento de encefalite e infecções neonatais por HSV, bem como para as infecções por varicela-zoster. No entanto, a vidarabina foi substituída pelo aciclovir para o tratamento de todas as infecções por este vírus. Hoje, o aciclovir e o penciclovir, e as respectivas pró-drogas, valaciclovir e famciclovir são os fármacos mais amplamente utilizados para o tratamento destas infecções (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007).

O aciclovir e o ganciclovir, análogos de nucleosídeos, ativam-se farmacologicamente por fosforilação a trifosfatos e inibem etapas do ciclo de replicação viral, com afinidade aumentada pela polimerase viral em comparação a polimerases celulares. Estes fármacos necessitam da indução pela timidina quinase viral, sendo fosforilados a monofosfatos, diferindo de outros antivirais como vidarabina, fosfonofórmico e ribavirina que prescindem de enzimas virais. A partir desse processo, são convertidos a di- e trifosfatos por enzimas celulares humanas. Os vírus que não produzem timidina quinase (vírus Epstein Barr) ou mutantes com deficiência dessa enzima não são sensíveis ao aciclovir e ao ganciclovir. O aciclovir foi o primeiro antiviral dotado de atividade seletiva, persistindo como referência mesmo após aproximadamente trinta anos da sua descoberta (SCHAECHTER et al., 2002). Possui o melhor índice terapêutico (dose tóxica/dose efetiva) de todos os antivirais sendo praticamente desprovido de toxicidade, pois sua atuação se dá quase que exclusivamente nas células infectadas (KUCHENBECKER, 2006).

O fosfonoformato é o sal sódico do ácido fosfonofórmico, um análogo do pirofosfato, que inibe a DNA polimerase viral ao ligar-se diretamente ao sítio de ligação do pirofosfato e não requer fosforilação pelas quinases virais (RANG et al., 2004; WILSON; FAKIOGLU; HEROLD, 2009). Assim, é ativo contra HSV ou citomegalovírus (CMV) com mutações na timidino-quinase ou U_L97, respectivamente. Resistência ao fosfonoformato é rara, mas pode ocorrer como

resultado de mutações na DNA polimerase viral (WILSON; FAKIOGLU; HEROLD, 2009).

Apesar dos avanços no desenvolvimento de novos medicamentos, as doenças virais continuam sendo um grave problema epidemiológico no mundo. Portanto, a busca por drogas mais eficientes (atividade seletiva e/ou de baixa toxicidade) contra o herpesvírus, assim como para outros vírus é urgente. Além disto, há de se considerar os problemas de resistência aos agentes disponíveis, a baixa eficácia no tratamento de doença recorrente e os problemas com pacientes imunocomprometidos (CHATTOPADHYAY et al., 2009; CHATTOPADHYAY et al., 2010).

3.1.10 Epidemiologia do Vírus Herpes Simplex

Infecções pelo HSV são muito comuns na população em geral, sendo que a soroprevalência em adultos é de cerca de 80-90% para o HSV-1 e varia entre 10 e 25% para o HSV-2 na maioria dos estudos. A infecção pelo HSV em indivíduos imunocompetentes normalmente não gera grandes problemas de saúde. No entanto, uma reativação atingindo o SNC pode ocasionar meningite e encefalite grave, com uma taxa de mortalidade de até 70% na ausência de terapia. E a infecção primária em recém-nascidos ou a reativação em indivíduos imunocomprometidos podem ser associadas a uma maior incidência de meningite, encefalite grave e infecções oculares (REIL et al., 2008).

O HSV tipos 1 e 2 estão entre as co-infecções mais comuns observadas em indivíduos infectados com HIV-1. A maioria das pesquisas sobre a co-infecção HSV-HIV tem se concentrado no HSV-2, principalmente com relação ao seu impacto na transmissão do HIV (TAN; KAUL; WALSMLEY, 2009). Manifestações clínicas de uma infecção crônica por HSV (tipo 1 ou 2) entre pacientes com HIV têm sido consideradas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um importante fator na progressão da doença de HIV/AIDS (LIN et al., 2011).

O HSV-1 permanece também como uma das principais causas de cegueira unilateral da córnea de etiologia infecciosa no mundo. Excluindo os casos de herpes ocular neonatal, que são em grande parte causadas pelo HSV-2, mais de

95,5% dos episódios de herpes oculares são causados pelo HSV-1. Entretanto, a incidência do HSV-2 nesse tipo de infecção herpética vêm aumentando. Nos Estados Unidos e na França, a incidência de infecção ocular por HSV tem sido estimada em 8,4-13,2 novos casos por 100.000 pessoas/ano, e uma incidência total, incluindo as recorrências, de 20,7-31,5 episódios por 100.000 pessoas/ano (KNICKELBEIN et al., 2009).

O HSV-1 causa a maioria das infecções não genitais em humanos, representando 45-98% da população mundial e 40-63% da população dos EUA. O HSV-2 é a causa mais comum do herpes genital, no entanto, um número crescente de episódios primários na região genital tem sido atribuído ao HSV-1. A ocorrência de herpes genital por HSV-1 varia geograficamente, sendo responsável por quase metade dos casos novos em alguns países europeus. Infecções genitais primárias por HSV-1 são mais frequentes em mulheres e na maioria das vezes são sintomáticas, levando a uma maior consciência do quadro infeccioso (FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007).

A prevalência do HSV-1 no mundo varia de acordo com a idade, raça e condição socioeconômica; sendo que uma maior taxa de soropositivos tem sido relatada em países menos industrializados. Por volta dos 60 anos, 60-85% das pessoas apresentam anticorpos contra HSV-1. A incidência não se apresenta de forma sazonal (FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007).

Nos Estados Unidos, a primeira infecção pelo HSV-1 é fortemente influenciada pela raça, com 35% de crianças negras de 5 anos de idade apresentando anticorpos anti-HSV-1 versus 18% de crianças brancas da mesma idade. Em populações de baixa renda, este vírus afeta quase 33% das crianças até 5 anos e 70-80% até o final da puberdade. Em contraste, as crianças norte-americanas que vivem em condições socioeconômicas melhores adquirem a infecção mais tarde na vida, com uma soroprevalência de cerca de apenas 20% antes dos 5 anos de idade e 40-60% até o início da idade adulta (FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007).

Em um estudo desenvolvido recentemente na China, a soroprevalência do HSV-1 foi de 92%, sendo que quando foi realizada uma comparação por sexo, obteve-se que esta prevalência foi de 89,1% para o sexo masculino e 94,2% entre mulheres. Altas taxas de infecção pelo HSV-1 foram

encontradas na infância, com uma soropositividade de 61,6% entre crianças de 5-9 anos. A soroprevalência aumentou para 90,3% entre aqueles com idade entre 25 e 29 anos, e gradualmente aumentou até cerca de 100% em indivíduos com idade superior a 40 anos (LIN et al., 2011).

No mesmo estudo, Lin et al. (2011) detectaram uma soroprevalência de 13,2% para o HSV-2, sendo 10,5% para o sexo masculino e 15,3% para o sexo feminino. Não foram detectadas pessoas infectadas com HSV-2 entre de 5-14 anos de idade. E a prevalência do HSV-2 entre 15-19 anos foi de 7,1%, subindo para 24,3% entre indivíduos com idade entre 45-49 anos.

3.2 POLIOVÍRUS

3.2.1 Introdução e História

O poliovírus (PV) é classificado como um enterovírus (EV) e se apresenta sob 3 sorotipos (PV-1, PV-2 e PV-3). Faz parte da família *Picornaviridae*, uma família que compreende vários patógenos humanos e animais (RACANIELLO, 2006; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

A história dos EV é, em grande parte, a história do PV. De fato, muitas das descobertas a respeito do PV são marcos nos estudos sobre os EV. Acredita-se que a poliomielite seja uma doença antiga, o que é sugerido pela representação em hieróglifos de um jovem egípcio com sequelas típicas desta doença, que data do segundo milênio a.C. (PALLANSCH; ROOS, 2007; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008). Outros registros de mesmo caráter foram resgatados relatando paralisia aguda em crianças, que deixara flacidez permanente. Apresentações marcantes da doença retratavam crianças previamente saudáveis que foram atingidas por uma doença febril aguda seguida de paralisia localizada. No entanto, poucos casos foram relatados até o final do século 19 (NATHANSON; KEW, 2010).

No início do século 20, epidemias de uma doença aguda do SNC conhecida com poliomielite começaram a ocorrer nos Estados Unidos e na Europa. Estes surtos vieram como uma surpresa para a comunidade médica, que viam a doença como uma raridade. O agente causal, o vírus da poliomielite (mais tarde

chamado de poliovírus), foi identificado em 1908 por Landsteiner e Popper. Pesquisas sobre o vírus ao longo dos próximos 40 anos forneceram informações sobre os tipos antigênicos, patogênese, imunidade, o que em última instância levaram ao desenvolvimento de duas vacinas eficazes no início dos anos 1960 (RACANIELLO, 2006).

Na família *Picornaviridae* se encontram, além dos vírus da poliomielite, o vírus da hepatite A e da febre aftosa. Devido à sua importância econômica e médica, os picornavírus tiveram um papel destacado na virologia moderna (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008). Esta família é parte de uma grande ordem chamada *Picornavirales*. O PV é o mais extensamente estudado nesta ordem, constituindo um importante sistema modelo, que contribui para a compreensão coletiva da biologia celular e molecular, bioquímica, evolução e patogênese destes vírus (CAMERON; SUK OH; MOUSTAFA, 2010). Ele foi o primeiro vírus animal completamente clonado e sequenciado, o primeiro vírus de RNA animal para o qual foi construído um clone infeccioso e o primeiro vírus humano que teve sua estrutura tridimensional resolvida por cristalografia de raios-x (PALLANSCH; ROOS, 2007).

3.2.2 Estrutura Viral

O PV é um pequeno vírus com diâmetro de 25 a 30 nm, não envelopado, composto de RNA de fita-simples de polaridade positiva, com aproximadamente 7500 nucleotídeos e cujo capsídeo é constituído de 60 capsômeros. Cada capsômero é formado por 4 proteínas estruturais denominadas VP1, VP2, VP3 e VP4, sendo o VP1 o mais superficial e nela se localiza o sítio antigênico mais importante, que é possivelmente o sítio de reconhecimento do receptor celular. O VP4 é o mais interno, associado ao ácido nucléico. A estrutura do PV e dos rinovírus mostra que a superfície do virion tem uma topografia enrugada, formada pela presença de um platô proeminente em forma de estrela, circundado por uma profunda depressão (cânion), supostamente, sítio de ligação ao receptor celular, no caso do vírus da poliomielite e dos rinovírus (BELOV; FOGG; EHRENFELD, 2005; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008; RACANIELLO, 2006).

O RNA genômico dos picornavírus possui a característica de estar ligado covalentemente a uma proteína chamada VPg (proteína do virion ligada ao genoma), no terminal 5'. A VPg dos diversos picornavírus varia de 22 a 24 aminoácidos e é codificada por um único gene viral. A VPg não é encontrada no RNAm, que é associado aos ribossomos celulares. A VPg está presente nas cadeias nascentes de RNA replicativo intermediário (RI) e nas fitas negativas, o que faz supor que é um iniciador para a síntese do RNA do vírus da poliomielite (BELOV; FOGG; EHRENFELD, 2005; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

3.2.3 Replicação Viral

O receptor celular para o poliovírus é o CD155, uma glicoproteína membro da superfamília das imunoglobulinas. Após a adsorção ao receptor e internalização do virion, o RNA é decapsidado, por um processo que envolve mudanças estruturais no capsídeo. Uma vez no citoplasma o RNA viral é traduzido para formar as proteínas virais essenciais para a replicação do genoma e proteínas estruturais. As proteínas são originadas de uma poliproteína precursora que é clivada, principalmente, por duas proteinases virais, 2A^{pro} e 3C^{pro} ou 3CD^{pro}. Entre as proteínas sintetizadas estão a RNA polimerase viral dependente de RNA e proteínas acessórias necessárias para a replicação do genoma e síntese de RNAm. O primeiro passo na replicação do genoma é a cópia do filamento positivo do RNA para formar uma fita intermediária negativa. Esta etapa é seguida pela produção de fitas complementares positivas. Estes eventos ocorrem em pequenas vesículas membranosas que são induzidas por várias proteínas do vírus. Uma vez que o pool de proteínas do capsídeo é suficientemente grande, a encapsidação começa. A proteína P1, precursora do capsídeo, é clivada para produzir protômeros imaturos (VP0, VP3 e VP1), que depois se unem formando pentâmeros, que formarão os provírus. As fitas positivas de RNA recém sintetizadas se juntam aos provírus para formar a partícula viral completa. Para o vírus se tornar infeccioso, a proteína VP0 tem que ser clivada em VP2 e VP4 (RACANIELLO, 2007; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

O tempo necessário para um ciclo de replicação completo varia de 5 a 10 horas, dependendo da cepa viral, temperatura, pH, célula hospedeira e a

multiplicidade de infecção. A progênie viral é liberada pela lise celular (RACANIELLO, 2007).

3.2.4 Patogênese da Infecção

Apesar do nome, os EV não são comumente associados a sinais e sintomas entéricos, como náusea, vômito e diarreia. Esse nome reflete simplesmente o fato de o trato gastrointestinal humano ser o sítio principal de replicação e de eles terem sido isolados inicialmente de espécimes entéricos. Os vírus são, contudo, conhecidos como causadores de poliomielite parálitica, meningite viral, encefalite, doença das mãos, pés e boca, conjuntivite e outras síndromes associadas a órgãos alvos extra-intestinais. A maioria das infecções (90-95%) causadas por vírus deste gênero são assintomáticas. É interessante notar que uma mesma síndrome pode ser causada por vários vírus e que um vírus pode causar diferentes síndromes (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

A patogênese do PV pode ser adequadamente discutida como um protótipo para outros EV, que também penetram no hospedeiro por via oral. Os padrões de disseminação do PV e as rotas de transmissão são semelhantes aos observados em outros EV. O PV é resistente à acidez do estômago e a replicação viral ocorre no intestino delgado, após ingestão de alimentos contaminados. Na fase inicial da infecção, o vírus pode ser encontrado na saliva, e acredita-se que em países desenvolvidos a transmissão oral-oral seja a mais importante (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008). A eliminação fecal do vírus ocorre por um período prolongado, às vezes por mais de 6 semanas. A disseminação pode ser intermitente e é influenciado pelo estado imunológico do indivíduo. A quantidade e a duração da disseminação do vírus podem ser reduzidas significativamente como resultado da imunidade de uma infecção natural prévia com PV selvagem, por vacinação ou por competir com outras infecções entéricas (PALLANSCH; ROOS, 2007).

O PV é produzido inicialmente nas células da 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 cervicais e mesentéricos profundos, levando a viremia primária, com invasão subsequente do sistema reticuloendotelial, incluindo nódulos linfáticos,

medula espinhal e baço. Em 25% de todas as infecções ocorre uma fase virêmica muito curta, mas os níveis de vírus são muito baixos e transitórios. Nessa fase, o SNC pode ser invadido, mas este tipo de infecção ocorre geralmente após amplificação no sistema reticuloendotelial seguida por viremia secundária. A maioria dos indivíduos infectados com PV e outros EV controlam a infecção antes da segunda fase virêmica, o que leva à infecção assintomática (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008). Na ocorrência de infecção do SNC, a destruição de neurônios motores (aqueles que controlam os movimentos musculares) pelo vírus resulta em paralisia (COLLETT; NEYTS; MODLIN, 2008).

3.2.5 Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo Poliovírus

O diagnóstico laboratorial do PV é realizado através da detecção do vírus, nas fezes ou secreção de garganta. A propagação em cultura de células humanas ou de macaco é bastante utilizada, e o efeito citopático observado é bastante característico. Testes como neutralização, imunofluorescência e técnicas imunoenzimáticas, além de ferramentas moleculares, como a PCR, são utilizadas para a identificação e diferenciação do tipo sorológico do vírus.

Além de identificar o sorotipo de PV é muito importante diferenciar as amostras selvagens das vacinais, que são amplamente disseminadas após vacinação em massa. Para esta finalidade pode-se utilizar técnicas, como marcadores genéticos (marcadores de temperatura, sorodiferenciação e anticorpos monoclonais) e diferenciação das sequências gênicas (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

3.2.6 Prevenção, Controle e Tratamento da Infecção pelo Poliovírus

Grande esforço tem sido realizado para a erradicação global da poliomielite, através de programas de vacinação em massa para a prevenção e controle da forma paralítica da doença.

A vacina do PV inativado (IPV – Salk), inicialmente desenvolvida, induz níveis adequados de anticorpos séricos, conferindo imunidade humoral. Nesta vacina os três sorotipos de PV são inativados com formol. É administrada em quatro

doses, por via intramuscular, a partir dos seis meses de idade, devendo ser aplicadas doses de reforço, a cada cinco anos para a manutenção de níveis detectáveis de anticorpos séricos. Não induz anticorpos do tipo IgA secretora. Tem a vantagem de poder ser aplicada em indivíduos imunodeficientes e naqueles em que a vacina atenuada não é recomendada (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

A vacina oral (OPV) vem sendo mais utilizada pela maior facilidade de administração (gotas orais), menor custo para a aplicação, capacidade de induzir anticorpos séricos e também anticorpos secretores (IgA) e pela rapidez no aparecimento de imunidade duradoura. A vacina oral é preparada com amostras dos três tipos sorológicos atenuados pela passagem seriada em células humana ou de macaco. A vacina oral é segura, no entanto, em casos raros, ela pode causar paralisia nas crianças ou nos seus contatos. Nos Estados Unidos, segundo informação do CDC, ocorreu um caso de poliomielite parálitica associado à vacina para dois a três milhões de doses aplicadas. Assim, houve nos EUA, no período em que se usou apenas a OPV, uma média de 8 a 10 casos de poliomielite parálitica associada à vacina (VAPP), principalmente após a primeira dose. No Brasil, no período de 1989 a 2006 foram constatados 11 casos de poliomielite associados à vacina (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

Apesar de todos os esforços, novas abordagens são necessárias para a prevenção de disseminação da doença, a partir das áreas endêmicas e prevenção de VAPPs. A capacidade de conter rápida e efetivamente um surto é essencial. O papel das drogas antivirais no controle de surtos de pólio tem sido considerado em workshops promovidos pelo CDC e OMS. O desenvolvimento de drogas antipólio tem sido considerado para o controle eficaz da doença, e em particular, a produção de substâncias que possam atuar distintamente na replicação viral, em curto prazo (COLLETT; NEYTS; MODLIN, 2008).

Embora não haja nenhum tratamento com medicamentos específicos para poliomielite atualmente, a eficácia de uma variedade de drogas tem sido documentada *in vitro* e *in vivo*. Além disso, importantes conquistas científicas alcançadas nas últimas cinco décadas abriram caminho para o aprimoramento de antivirais contra os enterovírus (PALLANSCH; ROOS, 2007). Várias etapas no ciclo de replicação dos picornavírus que são alvos potenciais para a terapia antiviral. A suscetibilidade celular, a adsorção a célula, a perda do capsídeo e liberação do RNA

viral, a replicação do RNA viral, e a síntese de proteínas virais têm sido bastante explorados na busca por agentes que combatam o vírus (ROTBART, 2002).

Os interferons são potentes mediadores seletivos de modificações celulares que induzem uma série de efeitos antivirais, anti-proliferativos e imunológicos, os quais coletivamente afetam a suscetibilidade da célula hospedeira às infecções virais. Crianças com meningite aguda por enterovírus têm elevações significativas nos níveis de interferon endógeno no líquido cefalorraquidiano, que pode ser importante na resposta à infecção. Apesar de o interferon alfa ser um inibidor muito potente da infecção por picornavírus, efeitos protetores aditivos ou sinérgicos são vistos quando usados em conjunto com inibidores do capsídeo, análogos de nucleosídeo ou interferon gama. Os interferons também podem ter ação conjunta com anticorpos humorais e macrófagos para eliminar infecções por picornavírus (ROTBART, 2002).

A imunidade humoral tem uma importante participação no combate as infecções pelos enterovírus. Pacientes com deficiência de anticorpos nas imunodeficiências congênitas ou adquiridas são excepcionalmente suscetíveis às infecções pelos enterovírus. Os anticorpos se ligam ao vírus, prevenindo a adsorção às células, o que é chamado de neutralização. Anticorpos, na forma de soroglobulina imune, têm sido utilizados profilática e terapêuticamente contra os enterovírus em recém-nascido e imunocomprometidos (ROTBART, 2002).

Compostos inibidores do capsídeo bloqueiam a decapsidação viral e/ou a adsorção viral nos seus receptores celulares. Vários compostos podem preencher as bolsas hidrofóbicas localizadas sob os canyons, formados pela junção entre VP1 e VP3 na superfície viral, aumentando a estabilidade do capsídeo e tornando o vírus mais resistente à decapsidação. A maior estabilidade do complexo vírus-composto é evidenciada pela resistência à inativação térmica. O primeiro composto deste grupo a avançar para ensaios clínicos foi o Disoxaril, com atividade moderada contra rinovírus *in vitro* e ativo contra enterovírus tanto *in vitro* quanto *in vivo* (ROTBART, 2002).

O pleconaril é o primeiro de uma nova geração de inibidores do capsídeo metabolicamente estáveis extensivamente avaliado em ensaios clínicos como agente antipicornavírus. Demonstrou ser potente antienterovírus e antirrinovírus e altamente biodisponível por via oral. Em camundongos com infecção

de múltiplos órgãos após inoculação intracraniana de enterovírus, o pleconaril demonstrou reduzir o título viral em todos os órgãos afetados e impedir a morte do animal. Altos níveis desta substância são alcançados no SNC e no epitélio nasal (ROTBART, 2002; WEBSTER, 2005).

Respostas satisfatórias ao pleconaril foram observadas em pacientes com infecção por enterovírus em doença neonatal grave, miocardite, infecção crônica (relacionada ao transplante de medula óssea), poliomielite causada por vírus selvagem ou associada à vacina e síndrome da atrofia muscular pós-pólio (ROTBART; WEBSTER, 2001).

Outro agente utilizado em infecções causadas por picornavírus é o Enviroxime, que inibe a replicação do RNA viral através da segmentação da região codificante da proteína 3A, que por sua vez está envolvida na replicação do RNA viral (ROTBART, 2002).

Apesar dos avanços em nossa compreensão dos aspectos moleculares do PV, a erradicação da poliomielite poderá se tornar uma realidade como resultado do uso adequado das vacinas Salk e Sabin. Estas vacinas foram desenvolvidas por métodos tradicionais em meados do século passado. Entretanto, as técnicas modernas certamente continuarão sendo importantes no monitoramento e identificação de cepas do PV. Além disso, pode ser que novas tecnologias e conhecimentos contribuirão para a formulação de uma vacina mais eficiente ou o desenvolvimento de novas drogas antivirais efetivas (PALLANSCH; ROOS, 2007).

3.2.7 Epidemiologia da Poliomielite no Brasil e no Mundo

Desde tempos remotos, os vírus da poliomielite se estabeleceram em quase todas as populações do mundo, permanecendo por muitos séculos sob forma endêmica, infectando sempre crianças susceptíveis, de faixa etária muito baixa.

A incidência da poliomielite é relativamente baixa para os primeiros 4-6 meses de vida nos países em desenvolvimento por conta da presença frequente de anticorpos maternos protetores. Nos países onde a doença é endêmica é observado um aumento da incidência da doença paralítica em crianças maiores de 6 meses, em comparação com essa mesma faixa etária em países mais ricos. Isto se

deve, presumivelmente, pela exposição ao vírus mais precocemente, como resultado de condições sanitárias precárias. As áreas com melhores condições de higiene têm menor exposição infantil ao vírus, deixando a população mais velha suscetíveis a epidemias, com altas taxas de doenças paráliticas durante um surto. Os adultos são mais propensos a ser severamente afetados tanto em países desenvolvidos e em desenvolvimento, tendendo a adquirir poliomielite parálitica e doença do SNC não-parálitica (por exemplo, meningite asséptica), doença abortiva ou infecção assintomática. A razão para o aumento da gravidade da doença quando a exposição ocorre mais tarde na vida ainda é desconhecida. Uma possível explicação refere-se à constatação de que a velocidade do fluxo axonal é aumentada com a idade, o que parece ser importante na propagação do PV para o SNC. Além disso, pode ser que a expressão do CD155 ou fatores do hospedeiro importantes na replicação mudam com a idade (PALLANSCH; ROOS, 2007).

O desenvolvimento de vacinas eficazes para prevenir a poliomielite parálitica foi um dos grandes avanços médicos do século 20. Nos Estados Unidos, no início de 1900, epidemias anuais de poliomielite ocorreram com regularidade até a introdução da vacina de vírus inativado (IPV - Salk) em 1955 e da vacina oral (OPV – Sabin) em 1961. Durante estes anos, a doença gradualmente atingiu indivíduos de faixa etária maior. Novamente isso sugere que melhorias graduais em saneamento e higiene reduziram a circulação de infecções entéricas. Esta situação em parte atenuou a incidência da doença, mas, adiou a exposição/ contato com o vírus. Reconheceu-se o benefício de que a OPV podia se disseminar a não-vacinados, por contato próximo, aumentando assim o nível de imunizados na população. Nos Estados Unidos, a experiência mostrou a dificuldade de se imunizar mais que 80-90% das crianças na população, particularmente se 2 ou 3 doses fossem necessárias para resposta imunológica satisfatória. Inquéritos sorológicos realizados na década de 1960 indicaram que 5-10% das crianças não tinham anticorpos para o vírus. Com uma população suscetível calculada de aproximadamente 10 milhões para cada tipo de poliovírus, presumiu-se que o poliovírus selvagem circularia indefinidamente. Os últimos casos de poliomielite causados possivelmente pelo poliovírus selvagem nativo ocorreu em 1972. A partir dessa data, todos os casos residuais foram devidos à poliomielite parálitica associada à vacina (Sabin) ou casos importados do México ou adquiridos por

peças que viajaram ao exterior. O último surto de pólio nos EUA ocorreu em 1979 em uma população Amish não-imunizada, causada por um vírus importado da Turquia via Países Baixos e Canadá (NATHANSON; KEW, 2010).

No Brasil, a partir de 1930, foram descritos surtos de poliomielite em capitais de Estados das regiões sudeste e 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 doença, para vacinar toda a população de zero a cinco anos. Essa estratégia modificou inteiramente o quadro epidemiológico da poliomielite no Brasil. Até 1984, os índices de cobertura vacinal estiveram acima de 90%, e registraram-se apenas casos esporádicos da doença. A partir de então, observou-se pequeno aumento na incidência, com um grande surto na região nordeste em 1986, devido principalmente, à diminuição da cobertura vacinal. E, em 1985, foram lançadas as bases do plano de eliminação da poliomielite do Brasil. Desta forma, a partir de 1990, não houve mais casos de poliomielite confirmados no Brasil (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

E 1988, a experiência nas Américas incentivou a Assembléia Mundial da Saúde a definir uma meta para a erradicação global do poliovírus. Com essa campanha, os números relatados de casos anuais confirmados de pólio em todo o mundo foram reduzidos de cerca de 50000 em 1980 para menos de 1000 em 2001. Apesar da subnotificação de casos da doença, em países em desenvolvimento, a morbidade prevenida pela vacinação é estimada em cerca de 600000, anualmente, o que representa uma redução de mais de 99% da doença. Além disso, casos de paralisia devido ao tipo 2 selvagem foram relatados pela última vez em 1999 em Uttar Pradesh, Índia, reforçando a credibilidade dos programas de erradicação global. Em 2001, o número de países onde a doença era endêmica, causada pelo vírus selvagem, regrediu de mais de 100 para menos de 10 países. Destes, os principais focos estavam na Nigéria e alguns países da Ásia, compreendendo parte do Afeganistão, Paquistão e norte da Índia (NATHANSON; KEW, 2010). A doença continua sendo endêmica em quatro países, Afeganistão, Índia, Paquistão e Nigéria. Outros três países são conhecidos por terem re-estabelecido a circulação e transmissão do vírus, com muitos focos da doença, por

um período maior que 12 meses após sua importação (Angola, Chade e República Democrática do Congo). Em 2011, foram notificados 67 casos no Afeganistão, 175 no Paquistão, um na Índia, 46 na Nigéria, 5 em Angola, 128 no Chade e 89 na República Democrática do Congo (GLOBAL POLIO ERRADICATION INITIATIVE, 2011).

Altos níveis de cobertura vacinal devem ser mantidos para evitar a transmissão e prevenir a ocorrência de surtos. Para isso, os programas para a erradicação global da poliomielite estão constantemente avaliando a melhor forma de utilização das diferentes vacinas disponíveis. Com o objetivo de prevenir a doença e evitar a transmissão do vírus em diferentes áreas do mundo, principalmente, naquelas regiões em que o controle tem se mostrado difícil (GLOBAL POLIO ERRADICATION INITIATIVE, 2011).

3.3 PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE NOVAS DROGAS

O desenvolvimento de antivirais é resultante de uma somatória de fatores, dentre os quais, do avanço no entendimento da patogenia das doenças virais, da necessidade de vencer a barreira da seleção de mutantes resistentes às drogas existentes e da ação tóxica dos produtos e, em particular, do impulso determinado pela epidemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). O estado de imunossupressão natural ou iatrogênica também foi outro fator decisivo no desenvolvimento de novos antivirais, além das doenças virais emergentes. Todos estes aspectos impulsionam pesquisas nesta área, estimulando a busca, a produção e o aperfeiçoamento de novas substâncias (KUCHENBECKER, 2006).

Produtos naturais derivados de plantas deram origem à cerca de 30-40% das drogas antimicrobianas ou antineoplásicas. Porém, admite-se que estas fontes naturais apresentam uma potencialidade inesgotável para o desenvolvimento de novos medicamentos. Nos últimos 20 anos, numerosos programas de triagem baseados em fundamentação amplas foram desenvolvidos, em diferentes partes do mundo, para a análise de atividade antiviral *in vitro* e *in vivo* (CHATTOPADHYAY et al., 2009).

Uma grande variedade de fitoquímicos ativos, como flavonóides, terpenóides, compostos organossulfurados, limonóides, lignanas, sulfetos,

polifenóis, cumarinas, saponinas, clorofilinas, alcalóides, polienos, tiofenóis, proteínas e peptídeos foram descritos como apresentando atividades contra diversos vírus. O mecanismo antiviral desses agentes é explicado com base em suas propriedades antioxidantes, capacidade depurativa, inibição da síntese de DNA ou RNA, inibição da penetração viral, inibição de diversas etapas da replicação viral, dentre outras (CHATTOPADHYAY et al., 2009).

3.3.1 *Caesalpinia Ferrea*

A *Caesalpinia ferrea* é uma espécie arbórea distribuída por toda a região tropical do Brasil, popularmente conhecida como pau-ferro ou jucá. Sua casca é utilizada como anti-inflamatório, analgésico, descongestionante, antiúlcera, anticancerígeno, para o tratamento de enterocolite, diarreia, diabetes, reumatismo, além de trazer benefícios para o sistema cardiovascular (GALDINO; MESQUITA; FERRAZ, 2007; BALBACH, 1972; BRAGANÇA, 1996; GOMES, 2003). As raízes são usadas como antipirético e antidiarréico, e a decocção do caule é anticatarral e cicatrizante (PENNA, 1964; PIO CORRÊA, 1984; LEWIS, 1987). Em comunidades amazonenses, várias partes da planta são usadas para o tratamento das doenças orais, em diferentes formulas, tais como, xarope, chá e colutório (VIEIRA, 1992). A infusão dos frutos é recomendada para curar feridas da cavidade oral (CAVALCANTE, 2008).

O polissacarídeo galactomanana é uma das substâncias presentes no jucá e que pode estar relacionada às propriedades terapêuticas da planta. Trata-se de um polissacarídeo neutro, extraído do endosperma de sementes. Esses polímeros são constituídos de um esqueleto formado por unidades repetidas de D-manose, unidas entre si por ligações β 1 \rightarrow 4. Unidades de D-galactose encontram-se ligadas à cadeia principal por ligações α 1 \rightarrow 6. O teor e a distribuição das unidades de D-galactose dependem da origem e espécie da leguminosa (AZERO; ANDRADE, 1999).

A pesquisa com polissacarídeos obtidos de fontes naturais tem identificado macromoléculas ativas, com diversas propriedades biológicas. As propriedades biológicas destes polissacarídeos podem ser amplificadas através de modificação química na molécula, p.ex., sulfatação, em que hidroxilas são

substituídas por sulfato, tornando as substâncias mais potentes e, eventualmente, com menor toxicidade (SAHA et al., 2010; KIM et al., 2011).

Polissacarídeos sulfatados têm sido relatados com atividades antivirais contra diversos vírus de mamíferos (WITVROUW; DE CLERCQ, 1997; ZHU et al., 2004; ZHU et al., 2006; EKBLAD et al., 2010; CARDOZO et al., 2011; KIM et al., 2011). O mecanismo de ação que tem sido proposto para estes agentes, refere-se à interação de cargas negativas destes compostos com as cargas positivas das superfícies do vírus ou da célula, impedindo, a ligação e penetração do vírus na célula hospedeira (HUHEIHEL et al., 2002).

Em teoria, um composto antiviral poderia proteger as células contra a infecção por vírus de várias formas: interferindo em sua replicação ou por inativação direta da partícula viral (ZHU et al., 2004). Sendo assim, uma estratégia para evitar a infecções virais seria a aplicação tópica de compostos virucidas que inativam o vírus. Os polissacarídeos sulfatados representam um grupo com potencial para utilização tópica, pois podem simular receptores celulares glicosaminoglicanos (EKBLAD et al., 2010). Além disso, outros mecanismos também têm sido propostos para a atividade virucida dos polissacarídeos, dentre os quais, a desintegração da partícula viral, solubilização ou modificação química do envelope e degradação ou mascaramento de proteínas essenciais do envelope. Foi demonstrado também que alguns polissacarídeos sulfatados inibem o ciclo de replicação do HSV em suas etapas iniciais, quando adicionados precoce e tardiamente à infecção (ZHU et al., 2004). Outro efeito destes agentes está relacionado a ação antiviral indireta pela indução de INF, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (HUHEIHEL et al., 2002).

3.3.2 Quercetina

A quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavona), flavonóide encontrado em frutas e hortaliças, tem sido alvo de pesquisas, atribuindo-se ao composto várias propriedades terapêuticas. Os flavonóides são compostos polifenólicos que ocorrem em diversos alimentos de origem vegetal e são classificados de acordo com a estrutura química em: flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, catequinas, antocianinas e chalconas. A quercetina é o principal representante dos flavonóides da subclasse flavonóis. Mais de 4000 flavonóides foram identificados, muitos dos

quais ocorrem em frutas, legumes e bebidas. Estes compostos têm despertado interesse recentemente devido aos potenciais efeitos benéficos para a saúde humana (JEONG et al., 2009).

A quercetina atua como o mais importante de vários constituintes flavonóides benéficos encontrados em uma ampla variedade de plantas medicinais. Muitos estudos têm descrito que eles apresentam atividade antioxidante, antialérgica, antiagregante plaquetário, anti-inflamatória, antitumoral, imunomoduladora e antiviral. Estudos epidemiológicos mostraram que o consumo de fontes de flavonóides está associado a uma menor incidência de câncer (JEONG et al., 2009; PILEGGI, 2006; NAIR et al., 2002).

Devido a sua atividade antioxidante, antitumoral e anti-inflamatória, esta tem sido estudada extensivamente como um agente de quimioprevenção do câncer em diversos modelos. É capaz de inibir especificamente a proliferação de células cancerosas em baixas doses, sendo que esta inibição resulta da parada do ciclo celular na fase G1 (JEONG et al., 2009).

Diversos trabalhos também relataram que os flavonóides e substâncias relacionadas, inclusive a quercetina, desempenham atividade antiviral (ONO et al., 1990; ORHAN et al., 2010; CHIANG et al., 2003; DU et al., 2003; EVERS et al., 2005; GONÇALVES et al., 2001; SAVI et al., 2010). Um dos mecanismos propostos seria a inibição da fusão do envelope viral com a membrana celular, no momento da entrada do vírus na célula hospedeira. Outra propriedade dos flavonóides é a indução da produção de INF. Sendo assim, várias práticas da medicina popular utilizando flavonóides nas infecções virais podem apresentar fundamentos científicos (HAVSTEEN, 2002).

As substâncias naturais passíveis de apresentarem mecanismos de ação alternativos, ao contrário dos antivirais sintéticos, podem ser potenciais candidatos para o controle das infecções virais.

REFERÊNCIAS

AZERO, E. G.; ANDRADE, C. T. Extração e caracterização da galactomanana de sementes de *Caesalpinia pulcherrima*. **Polimeros: Ciência e Tecnologia**, v. 9, p. 54-59, 1999.

BALBACH, A. **As Plantas que Curam**. São Paulo: Três Press, 1972.

BELOV, G. A.; FOGG, M. H.; EHRENFELD, E. Poliovirus Proteins Induce Membrane Association of GTPase ADP-Ribosylation Factor. **Journal of Virology**, v. 79, p. 7207-7216, 2005.

BLOOM, D. C.; GIORDANI, N. V.; KWIATKOWSKI, D. L. Epigenetic regulation of latent HSV-1 gene expression. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1799, p. 246-256, 2010.

BRAGANÇA, L. A. R. et al. **Plantas Medicinais Antidiabéticas**. Niterói: EDUFF, 1996.

BRANDT, C. R. The role of viral and host genes in corneal infection with herpes simplex virus type 1. **Experimental Eye Research**, v. 80, p. 607-621, 2005.

CAMERON, C. E.; OH, H. S.; MOUSTAFA, I. M. Expanding knowledge of P3 proteins in the poliovirus lifecycle. **Future Microbiology**, v. 5, p. 867-881, 2010.

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

CAVALCANTE, R. **As plantas medicinais na Odontologia: um guia prático**. Rio Branco: ExpressãoGráfica, 2008.

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, p. 347-368, 2009.

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**, p. 117-147, 2010.

CHIANG, L. C.; CHIANG, W.; LIU M. C.; LIN, C. C. *In vitro* antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 194-198, 2003.

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

COWAN, M. M. Plant products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, 564-582, 1999.

DU, J.; HE, Z. D.; JIANG, R. W.; YE, W. C.; XU, H. X.; BUT, P. P. H. Antiviral flavonoids from the root bark of *Morus alba* L. **Phytochemistry**, v.62, p. 1235-1238, 2003.

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, p. 124-134, 2005.

EKBLAD, M.; ADAMIAK, B.; BERGSTROM, T.; JOHNSTONE, K. D.; KAROLI, T.; LIU, L.; FERRO, V.; TRYBALA, E. A highly lipophilic sulfated tetrasaccharide glycoside related to muparfostat (PI-88) exhibits virucidal activity against herpes simplex virus. **Antiviral Research**, v. 86, p. 196-203, 2010.

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

GALDINO, G.; MESQUITA, M. R.; FERRAZ, I. D. K. Descrição morfológica da plântula e diásporos de *Caesalpinia ferrea* Mart. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 747-749, 2007.

GLOBAL POLIO ERADICATION INICIATIVE, 2011. The 17th Informal Consultation of the Global Polio. WHO press, World Health Organization. Geneva, Switzerland.

GOMES, M. **As plantas da saúde: guia de tratamentos naturais**. 3 ed. São Paulo: Paulinas, 2003.

GONÇALVES, J. L. S.; LEITÃO, S. G.; DELLE MONACHE, F.; MIRANDA, M. M. F. S.; SANTOS, M. G. M.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. *In vitro* antiviral effect of flavonoid-rich extracts of *Vitexpolygama* (Verbenaceae) against acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1. **Phytomedicine**, v. 8, p. 477-480, 2001.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HUHEIHEL, M.; ISHANU, V.; TAL, J.; ARAD, S. M. Activity of *Porphyridium* sp. polysaccharide against herpes simplex viruses *in vitro* and *in vivo*. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 50, p. 189-200, 2002.

JEONG, J. H.; AN, J. Y.; KWON, Y. T.; RHEE, J. G.; LEE, Y. J. Effects of low dose quercetin: Cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 106(1), p. 73-82, 2009.

KIM, J. K.; CHO, M. L.; KARNJANAPRATUM, S.; SHIN, I. S.; YOU, S. G. *In vitro* and *in vivo* immunomodulatory activity of sulfated polysaccharides from *Enteromorpha prolifera*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, p. 1051-1058, 2011.

KNICKELBEIN, J. E.; HENDRICKS, R. L.; CHARUKAMNOETKANOK, P. Management of Herpes Simplex Virus Stromal Keratitis: An Evidence-based Review. **Survey of Ophthalmology**, v. 54, p. 226-234, 2009.

KOELLE, D. M.; COREY, L. Recent progress in Herpes Simplex Virus immunobiology and vaccine research. **Clinical microbiology reviews**, v. 16, 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.

LACASSE, J. J.; SCHANG, L. M. During lytic infections, Herpes Simplex Virus type 1 DNA is in complexes with the properties of unstable nucleosomes. **Journal of Virology**, v. 84, p. 1920-1933, 2010.

LEWIS, G. P. **Legumes of Bahia**. Kew: Royal Botanical Gardens, 1987, 369p.

LIN, H.; HE, N.; SU, M.; FENG, J.; CHEN, L.; GAO, M. Herpes simplex virus infections among rural residents in eastern China. **Infectious Diseases**, v. 11, p. 1-6, 2011.

NAIR, M.P.N.; KANDASWAMI, C.; MAHAJAN, S.; CHADHA, K.C.; DHAWDA, R.; NAIR, H.; KUMAR, N.; NAIR, R. E.; SCHWARTZ, S. A. The flavonoid, quercetin, differentially regulates Th-1 (IFN γ) and Th-2 (IL4) cytokine gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells. **Biochimica et Biophysica acta**, v. 1593, p. 29-36, 2002.

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

ONO, K.; NAKANE, H.; FUKUSHIMA, M.; CHERMANN, J. C.; BARRÉ-SINOUSI, F. Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. **European Journal of Biochemistry**, v. 190, p. 469-476, 1990.

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

PALLANSCH, M.; ROOS, R. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**, 5 ed. v. 2, 2007.

PENNA, J. F. M. **Dicionário brasileiro de plantas medicinais**, 3.ed. Rio de Janeiro: Kosmos, 1964.

PILEGGI, C. Quercetin: 100% Whole Food Targeted Response Dietary Supplement. **INNATE Responde Formulas**. BioSanLaboratories, 2006.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984.

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

RACANIELLO, V. R. Picornaviridae: The Viruses and Their Replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**, 5 ed. v. 2, 2007.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**, 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

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, p. 361-367, 2008.

ROIZMAN, B.; KNIPE, D. M.; WHITLEY, R. J. Herpes Simplex Virus. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**, 5 ed. v. 2, 2007.

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

ROTBART, H. A., WEBSTER, A. D. Treatment of potentially life threatening enterovirus infections with pleconaril. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 228-235, 2001.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à VIROLOGIA HUMANA**, 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008. 532p.

SCHAECHTER, M. et al. **Microbiologia: Mecanismos das Doenças Infecciosas**, 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2002. 642p.

SAHA, S.; FACCIN-GALHARDI, L. C.; YAMAMOTO, K. A.; LINHARES, R. E. C.; BANDYOPADHYAY, S. S.; SINHA, S.; NOZAWA, C.; RAY, B. Water-extracted polysaccharides from *Azadirachta indica* leaves: Structural features, chemical modification and anti-bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, p. 640-645, 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, p. 1142-1146, 2010.

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

TAN, D. H. S.; KAUL, R.; WALSMLEY, S. Left out but not forgotten: Should closer attention be paid to coinfection with herpes simplex virus type 1 and HIV? **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 20, p. 1-7, 2009.

VIEIRA, L. S. **Fitoterapia da Amazônia: Manual das Plantas Medicinais**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1992.

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

WEBSTER, A. D. B. Pleconaril: an advance in the treatment of enteroviral infection in immuno-compromised patients. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, p. 1-6, 2005.

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

WITVROUW, M.; DE CLERCQ, E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. **General Pharmacology**, v. 29, p. 497-511, 1997.

ZHU, W.; CHIU, L. C.; OOI, V. E.; ANG JR., P. O. Antiviral property and mode of action of a sulphated polysaccharide from *Sargassum patens* against herpes simplex virus type 2. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, p. 81-85, 2004.

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

4 ARTIGO A**SULFATED POLYSACCHARIDE OF *CAESALPINIA FERREA* INHIBITS HERPES
SIMPLEX VIRUS AND POLIOVIRUS.**

**Nayara Lopes; Lígia Carla Faccin-Galhardi; Samantha Fernandes Espada;
Arcelina Cunha Pacheco; Nágila Maria Pontes Silva Ricardo; Rosa Elisa
Carvalho Linhares, Carlos Nozawa*.**

SULFATED POLYSACCHARIDE OF *CAESALPINIA FERREA* INHIBITS HERPES SIMPLEX VIRUS AND POLIOVIRUS.

Nayara Lopes^a; Lígia Carla Faccin-Galhardi^a; Samantha Fernandes Espada^a;
Arcelina Cunha Pacheco^b; Nágila Maria Pontes Silva Ricardo^b; Rosa Elisa
Carvalho Linhares^a, Carlos Nozaw^{a*}.

Abstract

Ethnopharmacological relevance: The *Caesalpinia ferrea*, known as pau-ferro or jucá, is a Brazilian native plant species used traditionally for the healing of various diseases, mainly by the Amazonian community. Barks and fruits are used for empirical medicinal purposes. It is used for respiratory illness, intestinal dysfunction, wound healing, diabetes, hemorrhage, rheumatic diseases, syphilis and whooping cough, amongst others. The antibacterial properties, particularly, against oral pathogens have been demonstrated, however, no antiviral effect has ever been ascribed to the plant yet. *Aim of the study:* This work evaluated the antiviral activity of a sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* (SPLCf) against HSV-1 and PV-1 replication. *Materials and Methods:* The antiviral effect of SPLCf at varying concentrations was tested by several protocols, such as, the time-of-addition assay; adsorption and penetration inhibition assay; virucidal assay and immunofluorescence assay. *Results:* We demonstrated that the SPLCf inhibited the HSV-1 and PV-1 replication. The values of IC₅₀ were 405 µg/ml for HSV-1 and 1.73 µg/ml for PV-1, with SI>7.4 and >1734, respectively. The IFA showed inhibition of the synthesis of viral protein in a dose-dependent response. *Conclusion:* These results suggested that the SPLCf interferes at some stage of HSV-1 and PV-1 replication. The substance inhibited virus attachment and steps after virus penetration, and inhibited the synthesis of virus protein. Virucidal effect was also shown. These findings demonstrated that the compound could lead to selective and safe drugs for infections caused by HSV-1 and PV-1.

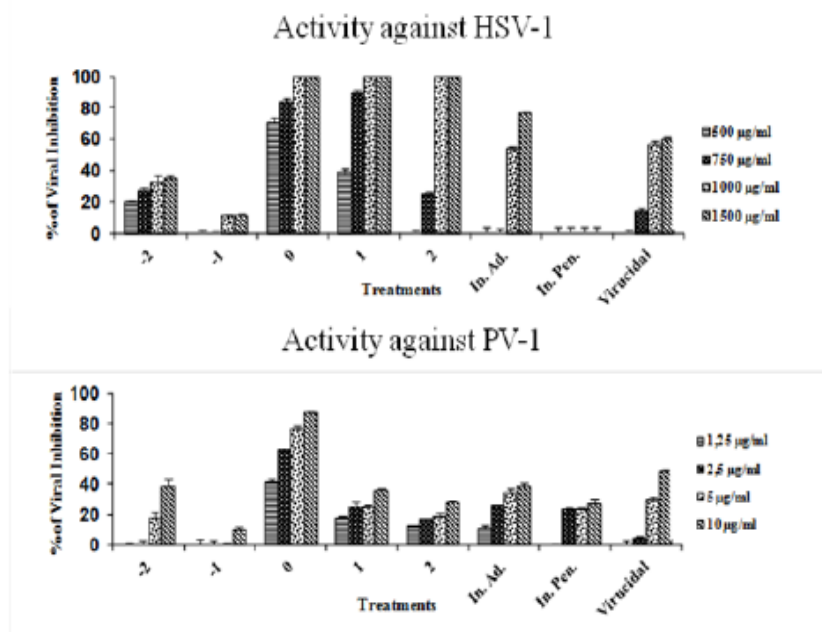
Keywords: Antiviral. *Caesalpinia ferrea*. Sulphated polysaccharide. Herpesvirus. poliovirus.

Abbreviations: CC₅₀, 50% cytotoxic concentration; IC₅₀, 50% inhibitory concentration; SI, selectivity index; IFA, immunofluorescence assay.

^a Departamento de Microbiologia, CCB, Universidade Estadual de Londrina, CEP 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil. *Corresponding author: Tel.: +55 43 33714617; fax: +55 43 33715828 E-mail: cnoz@uel.br

^b Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, CEP 60020-181, Fortaleza, Ceará, Brasil.

Graphical Abstract



1 INTRODUCTION

A wide variety of phytochemicals have been studied in the search for therapeutic alternatives against various pathogens, including viral infections. Of the commercially available antimicrobials, about 30-40% have been synthesized from natural products derived from plants. Over the past 20 years, numerous studies have been developed for the production of new medicines from these compounds, more effective and less toxic or as a therapeutic option to reference drug (Chattopadhyay et al, 2009).

The *Caesalpinia ferrea* is an arboreal species, native to Brazil, popularly known as pau-ferro or jucá. The use in popular medicine as alcoholic and aqueous extracts from flowers and the pod aroused the interest of this plant in the scientific community. The bark is used as anti-inflammatory, analgesic, anticancer, antiulcer, descongostant, for enterocolitis and diarrhea, diabetes, rheumatism and benefits for the cardiovascular system (Balbach, 1972; Bragança, 1996; Gomes, 2003; Galdino, Mesquita and Ferraz, 2007). The roots are used as antipyretic and antidiarrheal, and the decoction of the stem is anticatarral and for wound healing

(Penna, 1964; Pio Corrêa, 1984; Lewis, 1987). Various parts of the plant are used, as tea, syrup and mouthwash, for the treatment of oral diseases and wounds (Vieira, 1992; Cavalcante, 2008). The antimicrobial properties have been demonstrated against oral pathogens *Streptococcus* and *Candida albicans* (Sampaio et al, 2009). Different species of *Caesalpinia* (L.) genus have been also used for sore throat and oral infections with Gram-positive and -negative bacteria (Saeed and Sabir, 2001; Sudhakar et al., 2006). Although the antimicrobial effect of *C. ferrea* has been shown for bacteria and fungus infections none has been done concerning its antiviral activity.

The herpes simplex virus type 1 (HSV-1), a member of the *Herpesviridae* family and genus *Simplexvirus*, is a double-stranded DNA virus, enveloped and possesses the ability to remain latent in ganglia near the site of infection (Roizman, Knipe and Whitley, 2007). Is one of the most regular human pathogens, being a public health problem, and the causal agent of several diseases, estimated to occur in approximately 40-80% of world population (Jones, 2003). The variety of infections is manifested with different degrees of severity (oral lesions – encephalitis), especially in immunocompromised patients. In Brazil, the HSV-1 is the most common causative agent of sporadic viral encephalitis in adults (Mendoza et al, 2007). Approximately 90% of people between 20 and 40 years have antibodies against HSV-1 (Wu et al, 2005).

Poliovirus type 1 (PV-1), a member of the *Picornaviridae* family, genus *Enterovirus*, is a positive single-stranded RNA non-enveloped virus. It is an enteric virus and about 1% of infected individuals develop paralytic poliomyelitis due to viral invasion of the central nervous system and destruction of motor neurons (Lancaster and Pfeiffer, 2010). Currently, poliovirus is under control in most part of the world, but, despite extensive efforts to eradicate the virus, the disease remains endemic in some countries in Africa and Asia, with 1294 cases reported in 2010 (Global Polio Eradication Initiative, 2011). Therefore, the disease represents a major threat for the rest of the world. Beyond its epidemiological importance, poliovirus is one of the best understood models of non-enveloped RNA virus and, therefore, much used in tests for new antiviral drugs.

The popular use of the *C. ferrea* in the treatments of oral diseases, as well as, its broad spectrum for varying diseases stimulated the evaluation as

antiviral for HSV-1 and PV-1 infections. In this study we tested the antiviral activity of a polysaccharide isolated from *C. ferrea* against HSV-1 and PV-1 replication in HEp-2 cells.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Cells and Virus

HEp-2 cells (human larynx epithelial cells carcinoma, ATCC CCL-23), used throughout, were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (*Gibco BRL, MD, US), 100 IU/ml penicillin (Novafarma Indústria Farmacêutica, GO, BR), 100 µg/ml streptomycin (*) and 2.5 µg/ml of amphotericin B (Meizler Biopharma S/A, SP, BR). The HSV-1 isolated from clinical specimens was provided by the Departamento de Virologia (IMPPG/UFRJ, RJ, BR) and the PV-1 (VR-58) is an ATCC strain. The virus stocks were tittered by plaque assay and stored at -20°C in 10% glycerol.

2.2 Compound

The sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* Martius ex Tul var *ferrea* (voucher specimen 44695) was supplied by the DQOI, UFC, CE, Brasil. The SPLCf was obtained from seed aqueous extract, as previously described (Cerqueira et al, 2009; Singh, Srivastava and Tiwari, 2009). The stock solution was prepared in DMEM.

2.3 Cytotoxicity Assay

The cytotoxicity of the compound in HEp-2 cells was evaluated by MTT (dimethylthiazolyldiphenyltetrazolium bromide) kit assay (**Sigma Chem. Co., MO, US), according to manufacturer's specifications. Briefly, cell cultures grown at approximately 70% confluence in 96-well microplates (Nunc A/S, Roskilde, Denmark) were treated with varying concentrations of the compound (93.75 µg/ml to 3000 µg/ml) and incubated for 72h at 37°C. The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) was

calculated by regression analysis, as the concentration of the substance capable of reducing the optical density of MTT product by 50% in comparison to control.

2.4 Antiviral Activity of SPLCf

Plaque reduction assay (PRA): The antiviral activity of SPLCf was evaluated by plaque reduction assay (Melo et al, 2008). Briefly, cell cultures grown at approximately 100% confluence in 24-well plates (TPP, Schaffhausen, CH) were treated with varying concentrations of the compound (1500, 1000, 750, 500, 10, 5, 2.5 and 1.25 µg/ml) for the following protocols: time-of-addition; inhibition of adsorption and penetration assays and the virucidal effect. Appropriate controls were performed throughout. Briefly, infected and treated cell cultures were overlaid with nutrient agarose (DMEM 2x/1.8% agarose [v/v]) containing 25 mM MgCl₂ (for PV-1 only), incubated for 40h at 37°C in 5% CO₂. Cells were fixed with 10% formaldehyde PBS, pH 7.3, and stained with 0.5% crystal violet in 20% ethanol. The percent of viral inhibition (%VI) was calculated as follows: %VI = 1 – (PFU in treated cells/PFU in control cells)] x 100 (Nishimura et al, 1977), where, PFU is plaque forming unit. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was determined as the concentration of the substance capable of reducing the number of PFU by 50%, by regression analysis. The selectivity index (SI) was expressed as the ratio of CC₅₀/IC₅₀.

Time-of-addition assay: Performed according to Yang et al (2005). Varying concentrations of the compound were added to cell cultures before (-1h and -2h), during (time 0h) and after (+1h and +2h) infection, followed by PRA.

Inhibition of adsorption assay: The cell cultures were pre-incubated at 4°C for 1h and submitted to varying concentrations of SPLCf simultaneously with viral infection. The cells were again incubated at 4°C for 1h followed by PRA (Zhu et al, 2004).

Inhibition of penetration assay: This test was performed as described by Cheng et al (2004) with minor modifications. The cells were pre-incubated at 4°C for 30 min, infected and maintained at 4°C for further 90 min adsorption. The cultures were submitted to concentrations of SPLCf and incubated at 37°C for 10 min. The cells were washed with PBS, pH 3, for 1 min and immediately neutralized with PBS pH 11, followed by PRA.

Virucidal Assay: Virus dilutions were incubated at 37°C for 1h with varying concentrations of the substance (v/v), inoculated and followed by PRA.

Positive control: Zynvir (sodium acyclovir - ACV) (Novafarma Indústria Farmacêutica, GO, BR) and Interferon (INF) (Meizler Biopharma S/A, SP, BR) were used as positive control for viral inhibition.

HSV-1 cell-to-cell spread: The evaluation of HSV-1 cell-to-cell spread was performed according to Ekblad et al (2010). Cell cultures were submitted to concentrations of the SPLCf 1h and 2h after the infection and plaques were evaluated, approximately, 72h incubation. An average of 10 plaques areas were estimated by digital image using the Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Immunofluorescence Assay (IFA): The assay was performed according to Faccin et al (2007). Briefly, cell cultures grown in 24-well plates with coverslips were infected in the presence of varying concentrations of the compound. Approximately, 18h later cells were washed with PBS (pH 7.3), fixed with cold acetone and blocked with 2% powdered skim milk PBS during 30 min. Next, the cells were incubated with mouse anti-HSV-1 (Santa Cruz Biotechnol., CA, US) or rabbit anti-PV-1 (supplied by INCQS/Fiocruz, RJ, BR), followed by three washings with 0.05% Tween 20 PBS and incubated with goat anti-mouse IgG (**) or sheep anti-rabbit IgG FITC conjugate (**). The cells were examined in a Zeiss fluorescence microscope (Zeiss Axio Imager.A1) and 100 cells/coverslips were scored and the percentage of fluorescent cells inhibition calculated.

Evaluation of the synergistic potential of SPLCf when combined with ACV for HSV-1: The test was performed according to Gong et al (2004) with minor modifications. The SPLCf was tested separately for four concentrations: 0.25 x IC₅₀, 0.5 x IC₅₀, 1.0 x IC₅₀ and 2.0 x IC₅₀, and the ACV was also tested separately for four concentrations:

0.25 x IC₅₀, 0.5 x IC₅₀, 1.0 x IC₅₀ and 2.0 x IC₅₀. The mixture of varying doses of SPLCf and varying doses of ACV in a fixed ratio, i.e., 0.25 x IC₅₀ of SPLCf combined with 0.25 x IC₅₀ of ACV, added concomitantly to infection, was submitted to PRA. The degree of SPLCf and ACV interaction was found by the combination index (CI) = $C_A/C_B + IC_{50A}/IC_{50B}$, 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 and Au, 2004).

2.5 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 sulfated polysaccharide and control groups. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

3 RESULTS

3.1 Cytotoxicity

The CC_{50} of SPLCf in HEp-2 cell was $> 3000 \mu\text{g/ml}$ (table 1).

3.2 Antiviral Activity

The SPLCf showed great antiviral activity for HSV-1 and PV-1, mainly when added concomitantly with viral infection (time 0h). The %VI for both virus was about of 90% for HSV-1, at the concentration of $750 \mu\text{g/ml}$, and for PV-1, at $10 \mu\text{g/ml}$. IC_{50} and SI for HSV-1 were $405 \mu\text{g/ml}$ and >7.4 , respectively, and for PV-1, respectively, $1.73 \mu\text{g/ml}$ and >1734 (table 1).

Table 1 – The fifty percent cytotoxic concentration (CC_{50}), 50% inhibitory concentration (IC_{50}) and the selectivity index (SI) of the sulfated polysaccharide from *C. ferrea* (SPLCf) for HSV-1 and PV-1 in HEp-2 cells culture. CC_{50} (*) IC_{50} (*) SI HSV-1 >3000 405 >7.4 PV-1 >3000 1.73 >1734 *

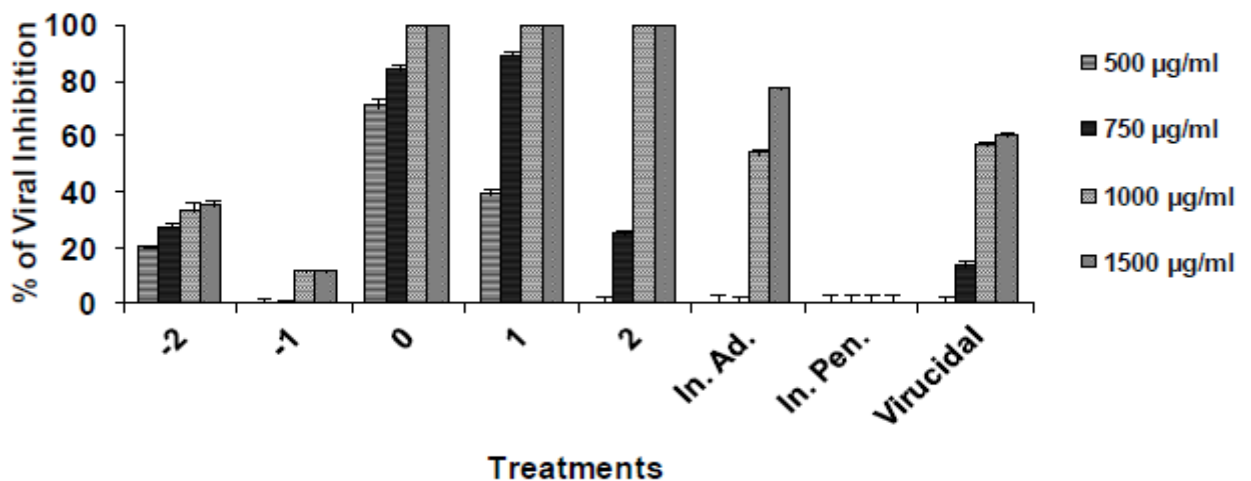
	CC_{50} (*)	IC_{50} (*)	SI
HSV-1	>3000	405	>7.4
PV-1	>3000	1.73	>1734

$\mu\text{g/ml}$

For HSV-1, SPLCf showed better inhibition when added after the infection compared to that of the pre-treatment. The %VI was 100% for the two

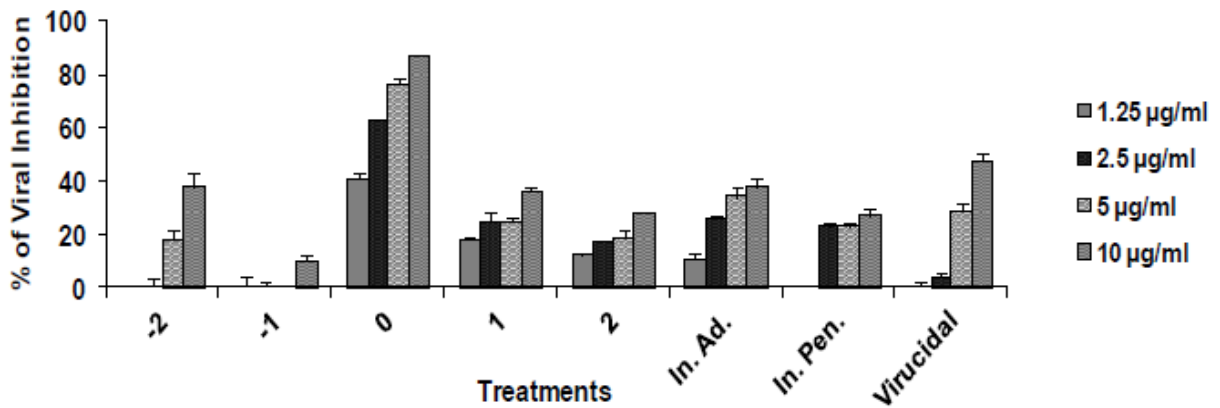
highest tested concentrations (1000 µg/ml and 1500 µg/ml), for the times 1h and 2 h after infection and the inhibition was dose-dependent. However, the pre-treatment inhibited only 11% and 32% when the compound was added 1h and 2h before the infection, respectively, at the same concentrations. The %VI of 77% and 60% was found for the inhibition of adsorption and virucidal assays, respectively, at 1500 µg/ml. No effect was demonstrated for the inhibition of penetration assay for HSV-1 (Fig. 1)

Figure 1 – Percent of HSV-1 inhibition by SPLCf, at the indicated concentrations, for the protocols: time-of-addition (hours), inhibition of adsorption (In. Ad.) and inhibition of penetration (In. Pen.), and the virucidal assay, in HEp-2 cell cultures by plaque reduction assay.



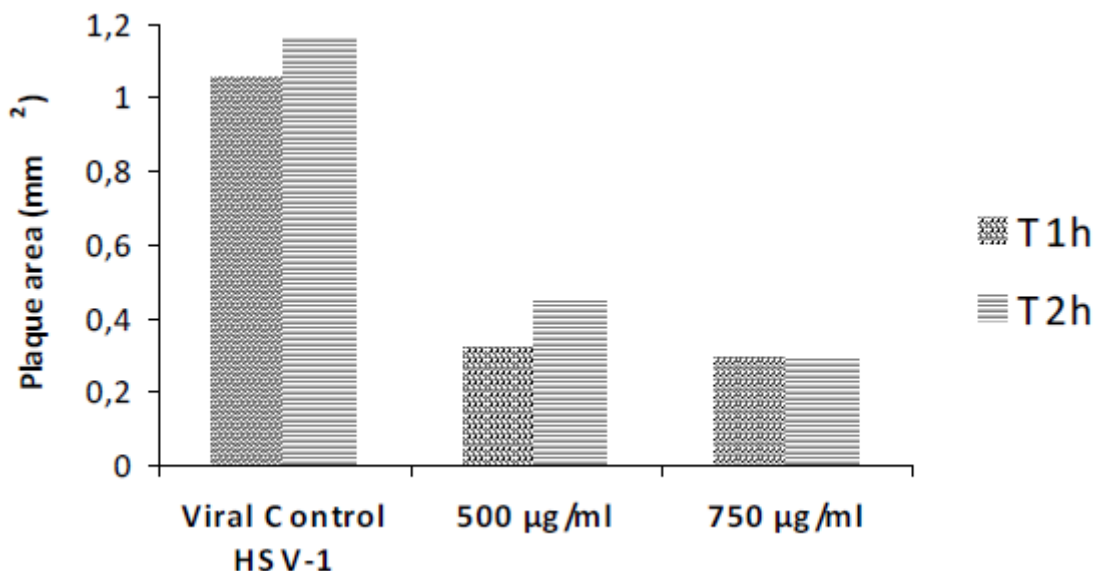
For PV-1, when the SPLCf was added before and after the infection, the % VI was lower than that of simultaneous treatment (time 0h). At the highest concentration (10 µg/ml), SPLCf inhibited the PV-1 in approximately 10% and 40% when added 1h and 2h before the infection, and 30% for the post-treatments. At the same concentration, the inhibition of penetration, the inhibition of adsorption and virucidal assay showed a % VI of 28%, 38% and 48%, respectively (Fig. 2).

Figure 2 – Percent of PV-1 inhibition by SPLCf, at the indicated concentrations, for the protocols: time-of-addition (hours), inhibition of adsorption (In. Ad.) and inhibition of penetration (In. Pen.), and the virucidal assay, in HEP-2 cell cultures by plaque reduction assay.



A significant difference in HSV-1 plaques areas was observed when SPLCf was used at the concentrations of 500 and 750 µg/ml (Fig. 3).

Figure 3 – The effect of the SPLCf on the HSV-1 plaque area. HEP-2 cell cultures were treated with SPLCf at the concentrations of 500 µg/ml and 750 µg/ml, 1h and 2 h after HSV-1 infection.



INF and ACV, respectively, used at the concentrations of 10000 IU/ml for PV-1 and 4000 µg/ml for HSV-1 resulted in 100% inhibition for both strains.

IFA demonstrated a dose-dependent inhibition of fluorescent focuses by SPLCf for both virus. For HSV-1, SPLCf inhibited the fluorescent cells by 42.6%, 72%, 88.5% and 100% for all the concentrations used (500 µg/ml-1500 µg/ml), respectively. For PV-1, the findings for the inhibition of fluorescent cells were 88%, 94%, 100% and 100%, respectively, for all the concentrations tested, from 1.25 µg/ml-10 µg/ml.

The synergistic potential of the SPLCf with ACV for HSV-1 was performed using four different combinations of SPLCf/ACV concentrations, 100/500; 200/1000; 400/2000 and 800/4000 µg/ml. All these combinations inhibited 100% of HSV-1 replication with a CI <0.5.

4 DISCUSSION

The *Caesalpinia ferrea* is widely used in Brazilian popular medicine and in view of its ethnomedicinal importance the Brazilian Ministry of Health included this species in the National List of Medicinal Plants. The present work describes the antiviral effect of a sulfated polysaccharide obtained from *C. ferrea* against HSV-1 and PV-1 replication. It was interesting to demonstrate the antiviral effect of *C. ferrea* additionally to a wide range of application in Brazilian popular medicine. The data of this work encourage further research in the field of phytotherapy, as well as, envisage a better understanding of the importance of the diseases caused by these viral agents. We investigated the mechanism by which the SPLCf exerted the antiviral activity by its ability to prevent viral replication, viral attachment or its direct effect on virus particles. The anti-HSV-1 activity might be mainly attributed to its polyanionic character of SPLCf. In particular, anionic polysaccharides are potent inhibitors of HSV binding to host cells and are competitors of receptors to viral glycoproteins (Ghosh et al, 2009; Witvrouw and De Clercq, 1997). In addition, the virucidal effect of these substances can lead to a solubilization of the virus envelope or chemical modification, degradation, or masking of some of the essential envelope proteins (Zhu et al, 2004). Our study demonstrated that SPLCf did not interfere in HSV-1 penetration stage. The inhibition of viral protein synthesis shown by IFA is in accordance with the results obtained in the plaque reduction assay, in that SPLCf inhibited HSV-1 replication when used simultaneously to the infection or afterwards.

On the ground of HSV-1 cytopathic effect, we found that SPLCf significantly reduced HSV-1 plaque area. Since an efficient dissemination of virus has an important role in its infectivity, the inhibition of cell-to-cell propagation is an attractive target for new antiviral drugs. Inhibition of HSV-1 cell-to-cell dissemination is a possibility, however, a decrease in the rate of virus replication caused by SPLCf cannot be ruled out. Recently, Cardozo et al (2011) have shown the inhibition of HSV cell-to-cell spread by a sulfated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* mycelium. Regarding the synergistic effect of SPLCf and ACV the results demonstrated a cooperative effect suggesting that SPLCf can be used either alone or in combination with ACV for the treatment of the infection. The inhibitory effect of SPLCf against PV-1 was also demonstrated, mainly, when the substance was added concomitantly to viral infection. The result obtained by IFA is in agreement with that of PRA and showed a dose-dependent inhibition. These data suggest that SPLCf may influence early stage of poliovirus replication cycle. Such stages may include viral adsorption and penetration or early translation of viral polyprotein or subsequently to its cleavage. This work has provided the first experimental evidence of the antiviral properties of sulfated polysaccharide from aqueous extract of *Caesalpinia ferrea* fruits in HSV-1 and PV-1 replication. Our findings indicated that SPLCf interfered with various steps of the HSV replication cycle, mainly in virus adsorption, as well as, the virucidal effect, and viral protein expression. In addition, we demonstrated the potential activity against PV-1 replication. Further studies are encouraging to better understanding of the antiviral mechanism of action of the SPLCf and its potentiality.

Acknowledgements

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

REFERENCES

Balbach, A., 1972. *As Plantas que Curam*. Três Press, São Paulo.

Bragança, L. A. R et al., 1996. *Plantas Medicinais Antidiabéticas*. EDUFF, Niterói.

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

Cavalcante, R., 2008. *As plantas medicinais na Odontologia: um guia prático*. Expressão Gráfica, Rio Branco.

Cerqueira, M. A., Pinheiro, A. C., Souza, B. W. S., Lima, A. M. P., Ribeiro, C., Miranda, C., Teixeira, J. A., Moreira, R.A., Coimbra, M. A., Gonçalves, M. P., António A. Vicente, A. A., 2009. Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources. *Carbohydrate Polymers* 75, 408–414.

Chattopadhyay, D., Chawla- Sarkar, M., Chatterjee, T., Dey, R. S., Bag, P., Chakraborti, S., Khan, M.T.H., 2009. Recent advancements for the evaluation of anti-viral activities of natural products. *New Biotechnology* 25, 347-368.

Cheng, H. Y., Lin, T. C., Yang, C. M., Wang, K. C., Lin, L. T., Lin, C. C., 2004. Putranjivain A from *Euphorbia jolkini* inhibits both virus entry and late stage replication of herpes simplex virus type 2 *in vitro*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53, 577-583.

Ekblad, M., Adamiak, B., Bergstrom, T., Johnstone, K. D., Karoli, T., Liu, L., Ferro, V., Trybala, E., 2010. A highly lipophilic sulfated tetrasaccharide glycoside related to muparfostat (PI-88) exhibits virucidal activity against herpes simplex virus. *Antiviral Research* 86 (suppl 2), 196-203.

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

Galdino, G., Mesquita, M. R., Ferraz, I. D. K., 2007. Descrição morfológica da plântula e diásporos de *Caesalpinia ferrea* Mart. *Revista Brasileira de Biociências* 5, 747-749.

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

Global Polio Eradication Initiative, 2011. Annual report 2010. WHO press, World Health Organization. Geneva, Switzerland.

Gomes, M., 2003. *As plantas da saúde: guia de tratamentos naturais*, 3 ed. Paulinasp, São Paulo.

Gong, Y., Raj, K.M., Luscombe, C. A., Gadawski, I., Tam, T., Chu, J., Gibson, D., Carlson, R., Sacks, S. L., 2004. The synergistic effects of betulin with acyclovir against herpes simplex viruses. *Antiviral Research* 64, 127-130.

Jones, C., 2003. Herpes Simplex Virus Type 1 and Bovine Herpesvirus 1 Latency. *Clinical Microbiology Reviews* 16, 79-95.

Lancaster, K. Z., Pfeiffer, J. K., 2010. Limited Trafficking of a Neurotropic Virus Through Inefficient Retrograde Axonal Transport and the Type I Interferon Response. *Plos Pathogens* 6, 1-10.

Lewis, G. P., 1987. *Legumes of Bahia*. Kew: Royal Botanical Gardens, 369p.

Melo, F. L., Benati, F. J., Roman-Junior, W. A., Mello, J. C. P., Nozawa, C., Linhares, R. E. C., 2008. The in vitro antiviral activity of an aliphatic nitro compound from *Heteropteris aphrodisiaca*. *Microbiological Research* 163, 136-139.

Mendoza, L. P., Bronzoni, R. V. M., Takayanagui, O. M, Aquino, V. H., Figueiredo, L. T. M., 2007. Viral infections of the central nervous system in Brazil. *Journal of Infection* 54, 589-596.

Nishimura, T., Toku, H., Fukuyasu, H., 1977. Antiviral Compounds. XII Antiviral activity of amidinohydrazones of alkoxyphenyl-substituted carbonyl compounds against influenza virus in eggs and in mice. *The Kitasato Archives of Experimental Medicine* 50, 39-46.

Penna, J. F. M., 1964. *Dicionário brasileiro de plantas medicinais*, 3.ed. Kosmos, Rio de Janeiro.

Pio Corrêa, M., 1984. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro.

Roizman, B., Knipe, D. M., Whitley, R. J., 2007. Herpes Simplex Virus. In: Knipe, D. M., Howley, P.M. *Fields Virology* 2, 2502-2601.

Saeed, M. A., Sabir, A. W., 2001. Antibacterial activity of *Caesalpinia bonducella* seeds. *Fitoterapia* 72, 807-809.

Sampaio, F. C., Pereira, M. C. V., Dias, C. S., Costa, V. C. O., Conde, N. C. O., Buzalaf, M. A. R., 2009. *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. *Journal of Ethnopharmacology* 124, 289-294.

Singh, V., Srivastava, A., Tiwari, A., 2009. Structural elucidation, modification and characterization of seed gum from *Cassia javahikaiseeds*: A non-traditional source of industrial gums. *International Journal of Biological Macromolecules* 45, 293–297.

Sudhakar, M., Rao, C. V., Rao, P. M., Raju, D. B., Venkateswarlu, Y., 2006. Antimicrobial activity of *Caesalpinia pulcherrima*, *Euphorbia hirta* and *Asystasia gangeticum*. *Fitoterapia* 77, 378-380.

Vieira, L. S., 1992. *Fitoterapia da Amazônia: Manual das Plantas Mediciniais*. Agronômica Ceres, São Paulo.

Witvrouw, M., De Clercq, E., 1997. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *General pharmacology* 29, 497-511.

Wu, J. J., Pang, K. R., Huang, D. B., Tying, S. K., 2005. *Advances in Antiviral Therapy*. *Dermatologic Clinics* 23, 313-322.

Yang, C. M., Cheng, H.Y., Lin, T. C., Chiang, L.C., Lin, C. C., 2005. Acetone, ethanol and methanol extracts of *Phyllanthus urinaria* inhibit HSV-2 infection *in vitro*. *Antiviral Research* 67, 24-30.

Zhao, L., Wientjes, M. G., Au, J. S., 2004. Evaluation of Combination Chemotherapy : Integration of Nonlinear Regression, Curve Shift, Isobologram, and Combination Index Analyses. *Clinical Cancer Research* 10, 7994-8004.

Zhu, W., Chiu, L. C., Ooi, V. E., Ang Jr., P. O., 2004. Antiviral property and mode of action of a sulphated polysaccharide from *Sargassum patens* against herpes simplex virus type 2. *International Journal of Antimicrobial Agents* 24, 81-85.

5 ARTIGO B

QUERCETIN INHIBITS HERPES SIMPLEX AND POLIOVIRUS

**Nayara Lopes; Lígia Carla Faccin-Galhardi; Lilian Yumi Hattori; Samantha
Fernandes Espada; Rosa Elisa Carvalho Linhares; Carlos Nozawa*.**

QUERCETIN INHIBITS HERPES SIMPLEX AND POLIOVIRUS

Nayara Lopes; Lígia Carla Faccin-Galhardi; Lilian Yumi Hattori; Samantha Fernandes Espada; Rosa Elisa Carvalho Linhares; Carlos Nozawa^{a*}.

Abstract

Despite continuous advances in antiviral therapy viral diseases have been increasingly the leading cause of death globally. Therefore, it is imperative the development of novel antiviral drugs. Flavonoids are present in various fruits and vegetables and therapeutic properties have been attributed to these compounds. Amongst them, quercetin, supposedly, one of the most studied flavonoid, and always presented as the most biologically active. This work investigated the antiviral activity of quercetin in HSV-1 and PV-1 replication. The antiviral effect of quercetin was tested by the following assays: the time-of-addition; adsorption and penetration inhibition; virucidal and immunofluorescence. We demonstrated that quercetin showed an effective virucidal effect against strains of both viruses with a %VI of about 100%, besides, an influence in the initial stage of viral replication was also found. IFA showed inhibition of the synthesis of viral protein in a dose-dependent response. These findings demonstrated that quercetin is a valuable candidate of antiviral agent and the possible mechanism of action is considered.

Keywords: Antiviral. Quercetin. Herpesvirus. Poliovirus.

Abbreviations: CC₅₀, 50% cytotoxic concentration; IC₅₀, 50% inhibitory concentration; SI, selectivity index; %VI, percent of viral inhibition; IFA, immunofluorescence assay.

1 INTRODUCTION

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1), a member of the family *Herpesviridae*, genus *Simplexvirus*, infects 70–90% of any given population and is therefore a significant cause of morbidity, commonly causing infections of the skin or mucosal surfaces. Occasionally, HSV-1 causes more serious, even lethal infections, including sporadic encephalitis, neonatal HSV-1, and ocular infections. The control of these diseases relies upon the widely used nucleoside analogue, acyclovir, and often

^a Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, CCB, Universidade Estadual de Londrina, CEP 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil. * Corresponding author. Tel.: +55 43 33714617; fax: +55 43 33715828. E-mail: cnoz@uel.br

leads to the development of drug resistance. Therefore, the development of new antiherpesvirus drugs should not be neglected [1, 2].

Poliovirus, the causative agent of poliomyelitis, belongs to the family *Picornaviridae*. Poliomyelitis is an acute disease of the central nervous system that may result in permanent paralysis or death. It is under control in most part of the world due to massive vaccination program, however, is endemic in some African and Asian countries, therefore, still a threat for the rest of the world [3, 4].

A wide variety of products based on medicinal plants have been shown with antimicrobial effect, those presenting antiviral activity have been also demonstrated.

The quercetin, a pentahydroxiflavan, acts as the most important constituents of many beneficial flavonoids found in a wide variety of plants, including those with medicinal properties. It is one of the most studied flavonoid and presented as the most biologically active. Flavonoids are polyphenolic compounds found in many edible vegetable, fruits and seeds and are classified according to chemical structure in flavonols, flavones, flavonones, isoflavones, catechins, anthocyanins and chalcones. Quercetin is the main representative of the flavonoids of the flavonols subclass and medicinal properties, such as, antioxidant, antiallergic, antiplatelet, anti-inflammatory, antitumor, immunomodulatory, including antiviral. Consumption of sources of flavonoids is thought to be associated with a lower incidence of cancer [5-7].

Natural substances capable of presenting alternative mechanism of action unlike synthetic antivirals, may be potential candidates for the control of viral infections. 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 are the main reasons to search for new drugs [2].

2 MATERIALS AND METHODS

HEp-2 cells (human larynx epithelial cells carcinoma, ATCC CCL-23), used throughout, were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (*Gibco BRL, Gaithersburg, MD, US), 100 IU/ml penicillin (Novafarma Indústria Farmacêutica, Anápolis, GO, BR), 100

$\mu\text{g/ml}$ streptomycin (*) and 2.5 $\mu\text{g/ml}$ of amphotericin B (Meizler Biopharma S/A, São Paulo, SP, BR). The HSV-1 was provided by the Departamento de Virologia (IMPPG/UFRJ, RJ, BR). The PV-1 is an ATCC strain (VR-58). The viral stocks were tittered by plaque assay and stored at -20°C in 10% glycerol.

Quercetin (Natural Pharma Produtos Farmacêuticos) was supplied by the Departamento de Farmácia/CCS, Universidade Estadual de Londrina. The quercetin cytotoxicity was evaluated by MTT (dimethylthiazolyldiphenyltetrazolium bromide) kit assay (**Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, US), according to manufacturer's specifications. Briefly, cell cultures grown at approximately 70% confluence in 96-well microplates (TPP, Schaffhausen, CH) were treated with varying concentrations of the compound (31.25 $\mu\text{g/ml}$ to 1000 $\mu\text{g/ml}$) and incubated for 72h at 37°C . The 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) was calculated by regression analysis, as the concentration of the substance capable of reducing the optical density of MTT product by 50% in comparison to control.

The antiviral activity of quercetin was evaluated by plaque reduction assay [8]. Briefly, cell cultures grown at approximately 100% confluence in 24-well plates (TPP, Trasadingen, CH) were treated with varying concentrations of the compound (50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 and 1.56 $\mu\text{g/ml}$) for the following protocols: time-of-addition assay; inhibition of adsorption and penetration assays and the virucidal effect. Appropriate controls were performed throughout. Briefly, infected and treated cell cultures were overlaid with nutrient agarose (DMEM 2x/1.8% agarose [v/v]) containing 25 mM MgCl_2 (for PV-1 experiments only), incubated for 40h at 37°C in 5% CO_2 . Cells were fixed with 10% formaldehyde PBS, pH 7.3, and stained with 0.5% crystal violet in 20% ethanol. The percent of viral inhibition (% VI) was calculated as follows: $\% \text{VI} = 1 - (\text{PFU in treated cells} / \text{PFU in control cells}) \times 100$ [9], where, PFU is plaque forming unit. The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) was determined as the concentration of the substance capable of reducing PFU by 50%, by regression analysis. The selectivity index (SI) was expressed as the ratio of $\text{CC}_{50} / \text{IC}_{50}$. The time-of-addition assay was performed according to Yang [10]. Varying concentrations of the compound were added to cell cultures before (-1h and -2h), during (time 0h) and after (+1h and +2h) infection, followed by PRA. For the inhibition of adsorption assay, the cell cultures were pre-incubated at 4°C for 1h and submitted to varying concentrations of quercetin simultaneously to viral infection. The cells were

reincubated at 4°C for 1h followed by PRA [11]. The inhibition of penetration assay was performed as described elsewhere [12] with minor modifications. The cells were pre-incubated at 4°C for 30 min, infected and maintained at 4°C for further 90 min adsorption. The cultures were submitted to concentrations of quercetin and incubated at 37°C for 10 min. The cells were washed with PBS, pH 3, for 1 min and immediately neutralized with PBS pH 11, followed by PRA. For the virucidal assay, virus dilutions were incubated at 37°C for 1h with varying concentrations of the substance (v/v), inoculated and followed by PRA. Zynvir (sodium acyclovir - ACV) (Novafarma Indústria Farmacêutica, Anápolis, GO, BR) and Interferon (INF) (Meizler Biopharma S/A, SP, BR) were used as positive control for viral inhibition and the former was also used for the synergistic potential of quercetin. The immunofluorescence assay (IFA) was performed as previously [13]. Briefly, cell cultures grown in 24-well plates with coverslips were infected in the presence of varying concentrations of the compound. Approximately, 18h later cells were washed with PBS, fixed with cold acetone and blocked with 2% powdered skim milk PBS during 30 min. Next, the cells were incubated with mouse anti-HSV-1 (Santa Cruz Biotechnol., CA, US) or rabbit anti-PV-1 (supplied by INCQS/ Fiocruz, RJ, BR), followed by three washings with 0.05% Tween 20 PBS and incubated with goat anti-mouse IgG (**) or sheep anti-rabbit IgG FITC conjugate (**). The cells were examined in a Zeiss fluorescence microscope (Zeiss Axio Imager.A1) and 100 cells/coverslips were scored and the percentage of fluorescent cells inhibition calculated. The evaluation of the synergistic potential of quercetin when combined with ACV for HSV-1 was performed as previously [14] with minor modifications. The quercetin was tested separately for four concentrations: 0.25 x IC₅₀, 0.5 x IC₅₀, 1.0 x IC₅₀ and 2.0 x IC₅₀, and the ACV was also tested separately for four concentrations: 0.25 x IC₅₀, 0.5 x IC₅₀, 1.0 x IC₅₀ and 2.0 x IC₅₀. The mixture of varying doses of quercetin and varying doses of ACV in a fixed ratio, i.e., 0.25 x IC₅₀ of quercetin combined with 0.25 x IC₅₀ of ACV, added concomitantly to infection, was submitted to PRA. The degree of quercetin and ACV interaction was found by the combination index (CI) = C_A/C_B + IC₅₀A/IC₅₀B, where C_A and C_B are the concentrations of the substances A and B used in combination to achieve 50% effect, and IC₅₀A and IC₅₀B 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 [15]. Anova followed by Tukey's test (BioEstat

5.0 for Windows XP, 2007) were applied to determine the difference among experiments with the quercetin and control groups. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

3 RESULTS

Quercetin CC_{50} evaluated by the MTT assay was $> 1000 \mu\text{g/ml}$. The antiviral assays showed us a favorable inhibitory activity of the quercetin at the tested concentration (50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 and $1.56 \mu\text{g/ml}$). For HSV-1, quercetin showed almost 100% inhibition when added concomitantly to viral infection, in the time-of-addition and virucidal assays, at $50 \mu\text{g/ml}$ (Fig. 1). For PV-1, similarly, the maximum %VI was obtained for the same treatments protocols, reaching 100% in the virucidal assay and almost 80% when treatment and infection were simultaneously, at the concentration $12.5 \mu\text{g/ml}$ (Fig. 2). The respective recorded IC_{50} and SI for HSV-1 were $14.1 \mu\text{g/ml}$ and >70.9 and for PV-1 $8.37 \mu\text{g/ml}$ and >119.5 . For pre-treatments, quercetin did not show significant inhibition for both strains of virus. Post-treatments showed 40% inhibition for PV-1 at $12.5 \mu\text{g/ml}$, this effect was not observed for HSV-1. For the inhibition of adsorption assay, quercetin demonstrated an inhibition around 60% for both viruses, at the concentrations of $50 \mu\text{g/ml}$ and $12.5 \mu\text{g/ml}$ for the HSV-1 and PV-1, respectively. Oppositely, the compound did not show any inhibition of penetration for both viruses.

The antivirals used as positive control were the INF at the concentration of 10000 UI/ml for PV-1 and the ACV at the concentration of 4000 $\mu\text{g/ml}$ for HSV-1, obtaining 100% of VI for both.

IFA demonstrated that quercetin inhibited fluorescent focuses for both strains in a dose-response curve. The following were found 20.7%, 75.6%, 93.9% and 100% for HSV-1 at the concentrations of 6.25, 12.5, 25.0 and $50 \mu\text{g/ml}$, respectively. For PV-1, 27.3%, 52.7%, 78.8%, and 87.8% at the concentrations of 1.56, 3.12, 6.25 and $12.5 \mu\text{g/ml}$, respectively. The evaluation of quercetin synergistic potential with ACV for HSV-1 was performed in four different concentrations (quercetin/ACV): 3.5/500, 7/1000, 14/2000 and 28/4000 $\mu\text{g/ml}$. For these associations we found the following %VI 9.5%, 39%, 58.5% and 100%, resulting in a CI 1.38.

4 DISCUSSION

The quercetin is a substance widely distributed in plant origin foods and medicinal herbs with several therapeutic properties either empirically or scientifically reported. It has been shown that several flavonoids shown antimicrobial activity, including quercetin.

Evidences have been presented attributing to compounds closely related to flavonoids the ability to inhibit fusion of viral envelope with the cell membrane. Another property of flavonoids, which is also related to the anti-inflammatory activity, is the induction of interferons (INF). These substances have several antiviral effects, including fortification of the cell membrane, induction of nucleases that attack the viral genome and change the pattern of phosphorylation of enzymes involved in the protein synthesis, including the viral proteins. Thus, with all these knowledge, various practices of popular medicine against viral infections using the flavonoids have been able to support scientific [16].

The antiviral effect of quercetin was already related for some virus, such as rotavirus [17], parainfluenza-3 [18], influenza [19], cytomegalovirus [20], HSV [21, 22] and HIV [23]. These studies demonstrate the quercetin activity in several steps of viral replication, such as early stages, in the DNA polymerase and reverse transcriptase.

The present work demonstrated quercetin as a significative virucidal against PV-1 and HSV-1. For HSV-1, we also observed a significant viral inhibition in the simultaneous treatment, but this inhibition decreased in the pos-treatments. This results show us that antiviral effect of quercetin occurs in early stages of HSV-1 replication, probably related to virucidal activity. For PV-1, the viral inhibition in pos-treatments continued significant showing that quercetin also interfered in some stage after the entry of virus in the host cell. The results obtained by IFA is in accordance with that of PRA and showed a dose-dependent inhibition of protein synthesis.

No synergistic effect was revealed with ACV which means that the use of quercetin is recommended solely rather than in association with ACV. Therefore, this work intended to contribute for the understanding of quercetin as a potential antiviral candidate.

Figure 1 – The effect of quercetin in HSV-1 inhibition assayed by the time-of-addition (hours), inhibition of adsorption (In. Ad.), inhibition of penetration (In. Pen.) and the virucidal assay, at the indicated concentrations, in HEp-2 cell cultures by plaque reduction assay.

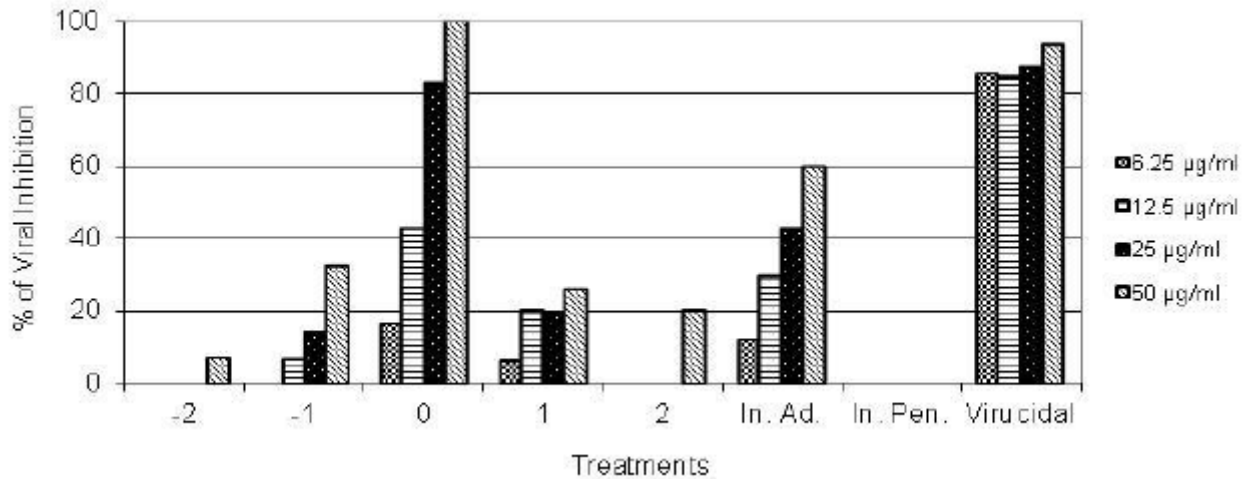
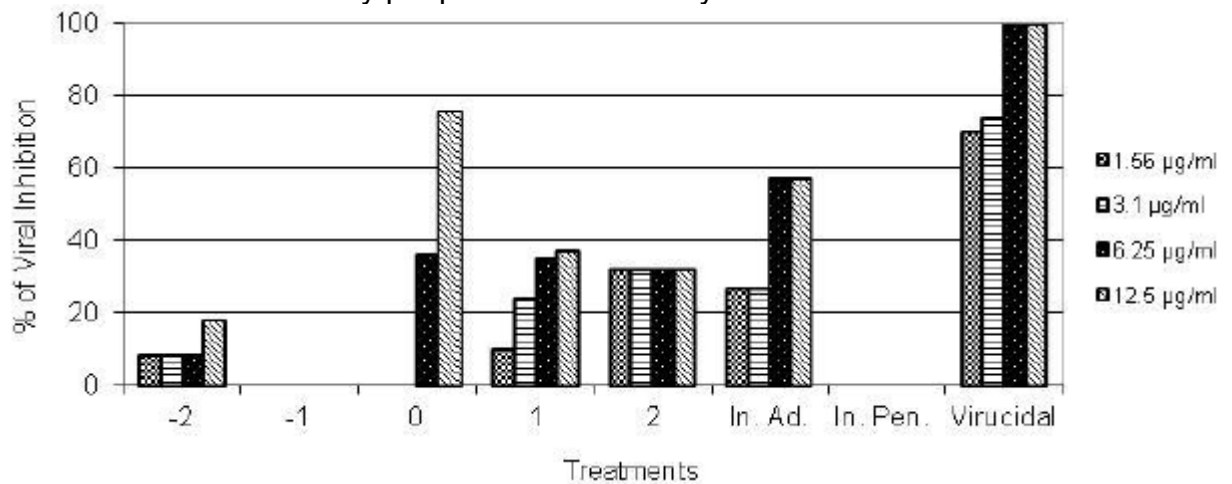


Figure 2 – The effect of quercetin in PV-1 inhibition assayed by the time-of-addition (hours), inhibition of adsorption (In. Ad.), inhibition of penetration (In. Pen.) and the virucidal assay, at the indicated concentrations, in HEp-2 cell cultures by plaque reduction assay.



Acknowledgements

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

REFERENCES

- [1] Brandt CR. The role of viral and host genes in corneal infection with herpes simplex virus type 1. *Experimental Eye Research* 2005; 80:607-621.
- [2] Chattopadhyay D, Das S, Chakraborty S, Bhattacharya SK. Ethnomedicines for the development of anti-herpesvirus agents. In: CHATTOPADHYAY D. *Ethnomedicine: A Source of Complementary Therapeutics* 2010; 117-147.
- [3] Almond JW. Poliovirus neurovirulence. *The neurosciences* 1991; 3:101-108.
- [4] Ohka S, Nomoto A. Recent insights into poliovirus pathogenesis. *Trends in Microbiology* 2001; 9:501-506.
- [5] Nair MPN, Kandaswami C, Mahajan S, Chadha KC, Dhawda R, Nair H, Kumar N, Nair RE, Schwartz SA. The flavonoid, quercetin, differentially regulates Th-1 (IFN γ) and Th-2 (IL4) cytokine gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells. *Biochimica et Biophysica acta* 2002; 1593: 29-36.
- [6] Pileggi C. Quercetin: 100% Whole Food Targeted Response Dietary Supplement. INNATE Responde Formulas. BioSan Laboratories 2006.
- [7] Jeong JH, An JY, Kwon YT, Rhee JG, Lee YJ. Effects of low dose quercetin: Cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. *Journal of Cellular Biochemistry* 2009; 106(1):73-82.
- [8] Melo FL, Benati FJ, Roman-Junior WA, Mello JCP, Nozawa C, Linhares REC. The *in vitro* antiviral activity of an aliphatic nitro compound from *Heteropteris aphrodisiaca*. *Microbiological Research* 2008; 163:136-139.
- [9] 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* 1977; 50:39-46.
- [10] Yang CM, Cheng HY, Lin TC, Chiang LC, Lin CC. Acetone, ethanol and methanol extracts of *Phyllanthus urinaria* inhibit HSV-2 infection *in vitro*. *Antiviral Research* 2005; 67:24-30.

- [11] Zhu W, Chiu LC, Ooi VE, Ang-Jr PO. Antiviral property and mode of action of a sulphated polysaccharide from *Sargassum patens* against herpes simplex virus type 2. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2004; 24:81-85.
- [12] Cheng HY, Lin TC, Yang CM, Wang KC, Lin LT, Lin CC. Putranjivain A from *Euphorbia jolkini* inhibits both virus entry and late stage replication of herpes simplex virus type 2 *in vitro*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2004; 53:577-583.
- [13] Faccin LC, Benati F, Rincão VP, Mantovani MS, Soares SA, Gonzaga ML, Nozawa C, Linhares REC. Antiviral activity of aqueous and ethanol extracts and of an isolated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* against poliovirus type 1. *Letters in Applied Microbiology* 2007; 45:24-28.
- [14] Gong Y, Raj KM, Luscombe CA, Gadawski I, Tam T, Chu J, Gibson D, Carlson R, Sacks, SL. The synergistic effects of betulin with acyclovir against herpes simplex viruses. *Antiviral Research* 2004; 64:127-130.
- [15] Zhao L, Wientjes MG, Au JS. Evaluation of Combination Chemotherapy : Integration of Nonlinear Regression, Curve Shift, Isobologram, and Combination Index Analyses. *Clinical Cancer Research* 2004; 10:7994-8004.
- [16] Havsteen, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics* 2002; 96:67-202.
- [17] Savi LA, Caon T, Oliveira AP, Sobottka AM, Werner W, Reginatto FH, Schenkel EP, Barardi CRM, Simões CMO. Evaluation of antirotavirus activity of flavonoids. *Fitoterapia* 2010; 81:1142-1146.
- [18] Orhan DD, Özçelik B, Özgen S, Ergun F. Antibacterial, antifungal and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiological Research* 2010; 165:496-504.
- [19] Savov VM, Galabov AS, Tantcheva LP, Mileva MM, Pavlova EL, Stoeva ES, Braykova AA. Effects of rutin and quercetin on monooxygenase activities in experimental influenza virus infection. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2006; 58: 59-64.
- [20] Evers DL, Chao CF, Wang X, Zhang Z, Huong SM, Huang ES. Human cytomegalovirus-inhibitory flavonoids: Studies on antiviral activity and mechanism of action. *Antiviral Research* 2005; 68:124-134.

- [21] Chiang LC, Chiang W, Liu MC, Lin CC. *In vitro* antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; 52:194-198.
- [22] Su-Yun L, Jee-Young R, Won-Bong P. Antiherpetic activities of flavonoids against Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) *in vitro*. *Archives of Pharmacal Research* 2005; 28:1293-1301.
- [23] Ono K, Nakane H, Fukushima M, Chermann JC, Barré-Sinoussi F. Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. *European Journal of Biochemistry* 1990; 190:469-476.

CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou a atividade antiviral de duas substâncias originadas de plantas, um polissacarídeo sulfatado de *Caesalpinia ferrea* (jucá) e o flavonóide quercetina. O estudo do provável mecanismo de ação de tais compostos evidencia a versatilidade de produtos naturais no combate aos vírus. O fato de que substâncias naturais são capazes de agir em diversas etapas do ciclo replicativo viral, desempenha um papel relevante, ampliando a eficácia dos tratamentos e dificultando o surgimento de vírus resistentes. Adicionalmente, a atividade virucida desempenhada por algumas substâncias, como a quercetina, constitui uma importante ferramenta contra a permanência de vírus viáveis no ambiente.

É importante salientar que ambas as substâncias testadas neste estudo demonstraram atividade antiviral em baixas concentrações, apresentando índices de seletividade extremamente altos, o que possibilitaria um tratamento efetivo e seguro. Tais observações nos leva a idéia de que a exploração dessas substâncias contribui amplamente na busca por novos medicamentos antivirais.

Uma vez que um número significativo de substâncias podem ser encontradas nas plantas, parece plausível concluir que, provavelmente, existem muitos potenciais agentes antivirais. E a caracterização desses ativos poderá revelar compostos muito úteis no combate às infecções causadas por vírus.

A realização deste trabalho constitui uma importante estratégia de triagem de compostos ativos em plantas, direcionando a execução de estudos posteriores mais aprofundados, que possibilitaria a inserção de tais substâncias no arsenal de controle e tratamento de viroses.