



RHAYFA LORRAYNE ARAUJO BERLANDA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE BIOMOLÉCULAS CONTRA O
*HUMAN ALPHAHERPESVIRUS 1***

Brasília
2019

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR
CENTRO DE ANÁLISES PROTEÔMICAS E BIOQUÍMICAS UCB**

RHAYFA LORRAYNE ARAUJO BERLANDA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE BIOMOLÉCULAS CONTRA O
*HUMAN ALPHAHERPESVIRUS 1***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Patologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Octávio Luiz Franco

Coorientadora: Dr^a. Gisele Regina Rodrigues

Brasília
2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

BB514a Berlanda, Rhayfa Lorryne Araujo
Avaliação da atividade antiviral de biomoléculas contra o
Human alphaherpesvirus 1 / Rhayfa Lorryne Araujo Berlanda;
orientador Octávio Luiz Franco; co-orientador Gisele Regina
Rodrigues. -- Brasília, 2019.
102 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Patologia Molecular)
- Universidade de Brasília, 2019.

1. Moléculas antivirais. 2. Peptídeos. 3. Chalconas. 4.
Human alphaherpesvirus 1. I. Franco, Octávio Luiz, orient.
II. Rodrigues, Gisele Regina, co-orient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por guiar os meus passos até este momento, por todas as bênçãos, coragem e discernimento concedidas em minha vida.

À minha família, minha mãe Maria de Fátima, meu pai Carlos e meu irmão Brunno, por todo o apoio e incentivo em relação aos meus estudos e às minhas escolhas pessoais e profissionais. Agradeço especialmente à minha mãe, meu maior exemplo de força e determinação. Sua luta contra o câncer de mama nos últimos meses, tem me ensinado a enfrentar os obstáculos da vida de cabeça erguida, com fé e gratidão mesmo pelas pequenas coisas.

Ao meu namorado Bruno Felipe, obrigada por estar ao meu lado durante os momentos mais difíceis dessa caminhada e também por compartilhar os momentos mais felizes, comemorando comigo cada vitória. Obrigada pelo seu amor e por sempre me dar forças e coragem para continuar.

Agradeço ao meu orientador Octávio Luiz Franco e à minha coorientadora Gisele Regina Rodrigues pela confiança em mim depositada, por toda a paciência e incentivo para seguir em frente apesar das dificuldades. Agradeço também à professora Lídia por toda a dedicação ao grupo de virologia da UCB, por estar sempre disposta a nos ajudar prontamente com seu conhecimento e sua amizade. Muito obrigada!

Às minhas amigas e parceiras do clube dos livros: Liana, Rayssa, Bel, Fernanda, Thuanny e Camila. Obrigada por todos os momentos maravilhosos que compartilhamos juntas, pelas risadas, conversas e apoio psicológico. Meus dias na pós-graduação se tornaram mais felizes com vocês!

Agradeço aos colaboradores do CAPB, Osmar e Camila Guimarães, e aos demais colegas do grupo por todo o apoio e ajuda fornecidos, sempre prestativos e atenciosos.

Aos professores, técnicos e alunos do laboratório de ciências genômicas e biotecnologia da UCB, por toda a contribuição para a realização deste trabalho. Obrigada!

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular por todo o suporte fornecido, e aos professores da UnB pelo aprendizado e colaboração com o grupo de virologia da UCB. Muito obrigada!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

E por fim, obrigada a todos que fizeram parte dessa importante etapa da minha vida de um modo geral, e que me ajudaram a chegar até aqui. Meus mais sinceros agradecimentos!

“Life is not easy for any of us. But what of that? We must have perseverance and above all confidence in ourselves. We must believe that we are gifted for something and that this thing must be attained.”

(Marie Curie 1867-1934)

RESUMO

BERLANDA, Rhayfa Lorryne Araujo. **Avaliação da atividade antiviral de biomoléculas contra o *Human alphaherpesvirus 1***. 2019. 102 páginas. Mestrado em Patologia Molecular – Universidade de Brasília, 2019.

As infecções causadas pelos herpesvírus humanos constituem um importante problema de saúde pública, com alta prevalência na população mundial. O tratamento para essas infecções é realizado por meio dos análogos de nucleosídeos, que têm como alvo de ação a DNA polimerase viral. Entretanto, o uso prolongado desses antivirais pode desencadear o surgimento de variantes resistentes, resultando em infecções severas. Diante disso, é imperativo o estudo de moléculas capazes de atuar em diferentes alvos virais ou celulares com baixa toxicidade para o hospedeiro. O presente estudo teve como objetivo avaliar a ação *in vitro* de moléculas derivadas de produtos naturais e peptídeos imunomodulatórios contra a replicação do HHV-1, bem como inferir seu possível efeito sobre algumas etapas do ciclo replicativo viral. O efeito citotóxico das moléculas em células Vero foi avaliado pelo método de MTT. A chalcona cardamonina apresentou toxicidade em concentrações acima de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Para o peptídeo DJK-6, houve redução da viabilidade celular na concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e o peptídeo IDR-1018 não apresentou citotoxicidade nas concentrações testadas (até $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Nos ensaios antivirais, a cardamonina apresentou inibição completa ECP viral na CMNT ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), com IS em torno de 21,8. Além disso, observou-se atividade nos ensaios de inibição da penetração viral e intracelular. Os peptídeos IDR-1018 e DJK-6 apresentaram inibição da replicação viral acima 90 % nas CMNTs ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e IS de $> 22,9$ e $> 8,2$, respectivamente. Em relação ao efeito sobre o ciclo replicativo viral, o IDR-1018 apresentou atividade nos ensaios de inibição da adsorção viral, penetração e intracelular. Por outro lado, o DJK-6 apresentou atividade apenas nas etapas de penetração viral e intracelular. Este estudo demonstrou que as moléculas testadas podem ser promissoras para o desenvolvimento de novos antivirais contra o HHV-1, devido à sua atividade inibitória *in vitro* e capacidade de atuar em diferentes etapas do ciclo replicativo viral. A chalcona cardamonina demonstrou o efeito inibitório esperado em pequenas concentrações. Em relação aos peptídeos imunomodulatórios, o análogo IDR-1018 apresentou maior potência e menor citotoxicidade comparado ao DJK-6, além de um melhor perfil de segurança.

Palavras-chave: Moléculas antivirais. Peptídeos. Chalconas. *Human alphaherpesvirus 1*.

ABSTRACT

Infections caused by human herpesviruses are of an important public health concern with a high world population prevalence. Therapy for such infections is carried out by nucleoside analogues, which target viral DNA polymerase. However, the prolonged drugs utilization can trigger the resistant variants emergence, leading to severe infections. Therefore, it is imperative the study of molecules capable of acting on different viral or cellular targets with low host toxicity. This study aimed to evaluate the *in vitro* action of molecules derived from natural products and immunomodulatory peptides against HHV-1 replication, as well as to infer their possible effect on stages of the viral replicative cycle. The cytotoxic effects of such molecules onto Vero cells were evaluated by MTT method. The chalcone cardamonin showed toxicity at concentrations above 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Moreover, for the peptide DJK-6, there was cell viability reduction at concentration of 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and IDR-1018 did not present cytotoxicity. In the antiviral assays, cardamonin showed complete CPE viral inhibition in MNTC (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) with SI around 21.8. In addition, activities over penetration and intracellular assay were observed. IDR-1018 and DJK-6 showed viral inhibition above 90 % in MNTCs (200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) and SI of >22.9 and >8.2, respectively. Regarding the effects on the viral replicative cycle, IDR-1018 showed activity in adsorption, penetration and intracellular assays. Otherwise, DJK-6 showed activity only over penetration and intracellular viral stages. This study indicated that such molecules tested may be promising for anti HHV-1 new drugs development due to their inhibitory activity *in vitro* and the ability to act at different viral replicative cycle stages. The chalcone cardamonin showed inhibitory activity against viral replication at small concentrations. In relation to the immunomodulatory peptides, the IDR-1018 analog present higher potency and lower cytotoxicity compared to DJK-6, in addition to a better safety profile.

Key-words: Antiviral molecules. Peptides. Chalcones. *Human alphaherpesvirus 1*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Características morfológicas do *Human alphaherpesvirus 1* (HHV-1). A) Reconstrução tridimensional do capsídeo icosaédrico do HHV-1. B) Estrutura da partícula viral do HHV-1.22
- Figura 2. Ciclo lítico do HHV-1. 1) Adsorção e penetração viral na célula hospedeira; 2) Transporte do nucleocapsídeo ao núcleo celular; 3) Expressão dos genes virais: fase imediatamente inicial (a), fase inicial (b), fase tardia (c); 4) Replicação do DNA viral; 5) Montagem do nucleocapsídeo; 6) Maturação do capsídeo; 7) Formação do envelope viral; 8) Saída da partícula viral.24
- Figura 3. Estruturas moleculares dos análogos de nucleosídeos e seus pró-fármacos.30
- Figura 4. Estrutura química geral dos flavonoides.38
- Figura 5. Estrutura geral das chalconas e suas formas isoméricas trans e cis, onde X e Y representam os grupamentos substituintes situados nos anéis aromáticos.39
- Figura 6. Espectrometria de massas pela técnica de ionização por electrospray dos compostos C1 (A), C2 (B), C3 (C) e C4 (D).52
- Figura 7. Ensaio de viabilidade celular dos compostos C1 (A), C2 (B), C3 (C), C4 (D) e da cardamonina (E). Foram avaliados os perfis de citotoxicidade de cada composto em células Vero após 48 h de tratamento em diferentes concentrações pela técnica de MTT. Os valores representam as médias \pm desvio padrão (DP, n=4) e foram analisados pelo one-way ANOVA e teste de Dunnett, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, comparando ao grupo não tratado (NT).54
- Figura 8. Ensaio antiviral dos compostos oriundos da *Campomanesia adamantium*, contra o HHV-1. Os resultados foram expressos em percentual de inibição (PI), pelo log da concentração de cada composto ($\mu\text{g.mL}^{-1}$). As curvas dose-resposta dos

compostos C1 (A), C2 (B) e C3 (C) foram realizadas com apenas uma réplica biológica. Para o composto C4 (D), os valores do PI representam as médias \pm desvio padrão (DP, n=3) e o CE₅₀ foi calculado por regressão não linear. CE₅₀: concentração efetiva capaz de inibir 50 % da replicação viral. HHV-1: *Human alphaherpesvirus 1*. ...
.....56

Figura 9. Ensaio antiviral. O efeito inibitório *in vitro* da cardamonina contra a replicação do HHV-1 foi expresso em percentual de inibição (PI) pelo log da concentração utilizada no ensaio. A análise dos dados foi realizada por regressão não linear para inferir o CE₅₀. Os valores do PI representam as médias \pm desvio padrão (DP, n=3). CE₅₀: concentração efetiva capaz de inibir 50 % da replicação viral em cultura celular. HHV-1: *Human alphaherpesvirus 1*.....57

Figura 10. Ensaio de efeito por tempo de adição (*time of addition assay*) da cardamonina em sua CMNT, sobre o ciclo replicativo do HHV-1. A ação da molécula foi avaliada nas etapas de adsorção, penetração e durante a biossíntese viral, comparada ao controle não tratado. O aciclovir foi utilizado como controle positivo do ensaio intracelular. Os valores representam as médias \pm desvio padrão (DP, n=3). HHV-1: *Human alphaherpesvirus 1*.....57

Figura 11. Ensaio de redução do título viral. (A) Controle celular após 48 h de crescimento em DMEM (aumento: 400x). (B) Monocamada de células Vero 48 h após o inóculo do HHV-1 no título de 100 TCID₅₀ (aumento: 400x). (C) Efeito citopático característico do HHV-1 em células Vero, com destruição da monocamada celular após 48 h do inóculo viral (aumento:400x). As setas pretas indicam a formação de sincícios na cultura celular. *Human alphaherpesvirus 1*.....72

Figura 12. Ensaio de viabilidade celular dos peptídeos IDR-1018 (A, barras em verde), DJK-6 (B, barras em azul). Foram avaliados os perfis de citotoxicidade das moléculas em células Vero após 48 h de tratamento em diferentes concentrações pela técnica de MTT. Os valores representam as médias \pm DP (n=4) e foram analisados pelo one-way ANOVA e teste de Dunnett, p<0,05, comparando ao grupo não tratado (NT).
.....74

Figura 13. Ensaio antiviral. O efeito inibitório *in vitro* dos peptídeos IDR-1018 (A) e DJK-6 (B) contra a replicação do HHV-1 foi expresso em percentual de inibição (PI) e analisado por regressão não linear para cálculo do CE₅₀, a partir das curvas dose-resposta. Os valores das PI (eixo Y) representam as médias ± DP (n=3). CE₅₀: concentração efetiva capaz de inibir 50% da replicação viral em cultura celular. HHV-1: *Human alphaherpesvirus 1*.....76

Figura 14. Ensaio de efeito do tratamento com os peptídeos IDR-1018 e DJK-6 em suas respectivas CMNTs, sobre o ciclo replicativo do HHV-1. A ação dos peptídeos foi avaliada nas etapas de adsorção, penetração e durante a biossíntese viral, comparada ao controle não tratado. O aciclovir foi utilizado como controle positivo do ensaio intracelular. Os valores representam as médias ± DP (n=3). HHV-1: *Human alphaherpesvirus 1*.76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais fármacos antivirais empregados no tratamento das infecções pelo HHV e outros vírus da família <i>Herpesviridae</i>	30
Tabela 2. Flavonóides com ação antiviral descritos na literatura e suas classes.....	39
Tabela 3. Ensaio antiviral. A tabela descreve as cinco concentrações utilizadas para os compostos C1, C2, C3, C4 e para a cardamonina nos ensaios antivirais contra o <i>Human alphaherpesvirus 1</i> (HHV-1).	46
Tabela 4. Compostos C1, C2, C3 e C4 isolados a partir das folhas da espécie <i>Campomanesia adamantium</i> (Coutinho, 2008). As estruturas moleculares em 3D, bem como as massas monoisotópicas foram obtidas por meio da base de dados <i>ChemSpider</i>	50
Tabela 5. Ensaio de viabilidade celular. A tabela descreve os valores da CMNT e CC ₅₀ definidos para os compostos C1, C2, C3, C4 e da cardamonina, bem como a concentração inicial utilizada no ensaio.	54
Tabela 6. Ensaio antiviral do composto C4 e da cardamonina contra o HHV-1. Na tabela estão descritos os valores do IIV e PI referentes à CMNT utilizada no ensaio, bem como o CE ₅₀ definido a partir das curvas dose-resposta por regressão não linear e o IS. HHV-1: <i>Human alphaherpesvirus 1</i>	57
Tabela 7. Exemplos de peptídeos com atividade antiviral descritos na literatura e seus possíveis mecanismos de ação.....	62
Tabela 8. Ensaio de viabilidade celular. A tabela descreve os valores da CMNT e CC ₅₀ definidos para os peptídeos IDR-1018 e DJK-6, bem como a concentração inicial utilizada no ensaio.....	74

Tabela 9. Ensaio antiviral dos peptídeos IDR-1018 e DJK-6 contra o HHV-1. Na tabela estão descritos os valores do IIV e PI referentes à concentração inicial utilizada no ensaio, bem como o CE₅₀, definido a partir das curvas dose-resposta por regressão não linear e o IS.76

LISTA DE SIGLAS

ACV: aciclovir.

AIV-A: vírus da influenza aviária A.

BKV: vírus BK.

CC₅₀: concentração citotóxica para 50 % da cultura celular.

CDC: Centro de Controle e Prevenção de Doenças.

CE₅₀: concentração efetiva para inibir 50 % da replicação viral.

CHIKV: vírus chikungunya.

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência.

CMNT: concentração máxima não tóxica.

CMV: citomegalovírus.

CoV: coronavírus.

DENV: dengue vírus.

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*.

DMSO: dimetilsulfóxido.

EBV: vírus Epstein-Barr.

ECP: efeito citopático.

EGCG: epigalocatequina galato.

ESI: ionização por electrospray.

EV71: enterovírus 71.

FCV: famciclovir.

FLUV-A (H1N1): vírus influenza A subtipo H1N1.

GCV: ganciclovir.

HAdV: adenovírus humano.

HCF-1: *host cell fator 1*.

HCV: vírus da hepatite C.

HHV-1: *Human alphaherpesvirus 1*.

HHV-2: *Human alphaherpesvirus 2*.

HIV: vírus da imunodeficiência humana.

HS: sulfato de heparana

HVEM: receptor mediador de entrada do herpesvírus.

ICTV: Comitê Internacional para a Nomenclatura de Vírus.

IDR: peptídeo regulador de defesa inata.

IDU: idoxuridina.

IIV: índice de inibição viral.

IS: índice de seletividade.

JEV: vírus da encefalite japonesa.

JV: junin vírus.

LAT: transcritos associados à latência.

OCT-1: octâmero 1.

OMS: Organização Mundial da Saúde.

ORF: *open reading frames*.

PCV: penciclovir.

PDH: peptídeo de defesa do hospedeiro.

PI: porcentagem de inibição.

QSAR: relação estrutura-atividade quantitativa.

RMN: ressonância magnética nuclear.

RSV: vírus sincicial respiratório.

SARS-CoV: coronavírus causador da síndrome respiratória aguda.

SFB: soro fetal bovino.

TCID: *Tissue Culture Infective Dose*.

TK: enzima timina quinase.

VCV: valaciclovir.

VGCV: valganciclovir.

VZV: vírus varicela-zoster.

YFV: vírus da febre amarela.

ZIKV: vírus zika.

α -TIF: fator de transdução α .

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 HERPESVÍRUS HUMANO 1 (HHV-1).....	21
1.2 FÁRMACOS ANTIVIRAIS CONTRA O HHV E DESENVOLVIMENTO DE RESISTÊNCIA	27
1.3 BIOMOLÉCULAS UTILIZADAS EM ESTUDOS DE ATIVIDADE ANTIVIRAL.....	31
2. JUSTIFICATIVA	34
3. OBJETIVO	35
3.1 OBJETIVO GERAL.....	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4. CAPÍTULO 1: COMPOSTOS DERIVADOS DE PLANTAS MEDICINAIS: UMA FONTE PROMISSORA PARA O DESENVOLVIMENTO DE ANTIVIRAIS	36
4.1 INTRODUÇÃO	36
4.1.1 Chalconas: aspectos gerais e atividade antiviral	40
4.2 METODOLOGIA.....	43
4.2.1 Cultivo celular	43
4.2.2 Multiplicação e estoque viral	43
4.2.2.1 Titulação Viral	44
4.2.3 Compostos utilizados no estudo	44
4.2.4 Ensaio de viabilidade celular	45
4.2.5 Ensaio antiviral	46
4.2.5.1 Ensaio de redução do título viral.....	47
4.2.5.2 Curva dose-resposta e determinação do índice de seletividade	47
4.2.6 Avaliação do efeito sobre o ciclo replicativo viral (<i>time of addition assay</i>)	48

4.2.6.1	Ensaio de inibição da adsorção viral.....	48
4.2.6.2	Ensaio de inibição da penetração viral	48
4.2.6.3	Ensaio de ação intracelular.....	49
4.3	RESULTADOS	50
4.3.1	Análise dos compostos isolados de <i>Campomanesia adamantium</i> por espectrometria de massas (ESI).....	50
4.3.2	Ensaio de viabilidade celular	53
4.3.3	Ensaio antiviral.....	55
4.3.4	Avaliação do efeito sobre o ciclo replicativo viral (<i>time of addition assay</i>).....	58
5.	CAPÍTULO 2: PEPTÍDEOS DE DEFESA DO HOSPEDEIRO COM POTENCIAL AÇÃO ANTIVIRAL.....	59
5.1	INTRODUÇÃO	59
5.1.1	IDR-1018.....	65
5.1.2	DJK-6.....	66
5.2	METODOLOGIA.....	68
5.2.1	Peptídeos utilizados no estudo.....	68
5.2.2	Ensaio de viabilidade celular	68
5.2.3	Ensaio antiviral.....	69
5.2.3.1	Ensaio de redução do título viral.....	70
5.2.3.2	Curva dose-resposta e determinação do índice de seletividade	70
5.2.4	Avaliação do efeito sobre o ciclo replicativo viral (<i>time of addition assay</i>).....	71
5.2.4.1	Ensaio de inibição da adsorção viral.....	71
5.2.4.2	Ensaio de inibição da penetração viral	71
5.2.4.3	Ensaio de ação intracelular.....	72
5.3	RESULTADOS	73

5.3.1	Efeito citopático (ECP) do HHV-1 sobre as células Vero	73
5.3.2	Ensaio de viabilidade celular	73
5.3.3	Ensaio antiviral	75
5.3.4	Avaliação do efeito sobre o ciclo replicativo viral (<i>time of addition assay</i>).....	76
6.	DISCUSSÃO	78
7.	CONCLUSÕES	87
8.	BIBLIOGRAFIA	88

1 INTRODUÇÃO

As infecções virais representam uma ameaça para praticamente todos os domínios da vida afetando animais, plantas e hospedeiros humanos (ELSAWY et al., 2012). O histórico de doenças causadas por vírus remontam de muitos séculos, existindo relatos em escritos de Hipócrates de aproximadamente 300 a 400 anos antes de Cristo (DA FONSECA, 2010). Entretanto, o reconhecimento desse patógeno ocorreu apenas no século XIX com a descrição de agentes “não filtráveis” menores que as bactérias, fato confirmado posteriormente com o advento da microscopia eletrônica em 1930 (ENQUIST, 2009; FLINT et al., 2004).

A emergência de doenças virais e sua disseminação vem causando ao longo dos anos um impacto significativo na saúde e na economia global, visto que algumas das doenças humanas mais letais que se tem relato foram ou ainda são causadas por vírus. De acordo com o manual de doenças epidêmicas publicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em maio de 2018, dentre as quinze doenças infecciosas com maior potencial de se tornarem ameaças internacionais, onze são causadas por vírus. O surto de Ebola por exemplo, que ocorreu entre 2014 e 2016, provocou mais de 28.000 casos e 11.000 mortes, atingindo principalmente o Oeste da África, segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC). No Brasil, a epidemia causada pelo zika vírus em 2015 resultou em diversos casos de microcefalia além da síndrome de Guillain-Barré. Menos de um ano depois, a febre amarela acometeu cinco estados brasileiros com 723 casos confirmados e 237 mortes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Nesse cenário, a vacinação constitui uma ferramenta preventiva eficiente para as infecções virais. Entretanto, sua produção pode levar muitos anos e alguns fatores como a presença de múltiplos sorotipos virais representam um desafio para o seu desenvolvimento (POSSAS et al., 2017). Diante disso, a terapia antiviral pode ser extremamente necessária para o controle de infecções cuja profilaxia não é realizada por meio de vacinas, como é o caso dos herpes simplex vírus (LÓPEZ-LABRADOR; BERENQUER; NAVARRO, 2015).

Os vírus herpes simplex consistem em agentes causadores de doenças sexualmente transmissíveis e representam um grande problema para a saúde pública a nível global. Segundo estimativas da OMS (2017), 3,7 bilhões de pessoas (67% da

população) com idade abaixo de 50 anos possuem a infecção pelo *Human alphaherpesvirus 1* (HHV-1). Adicionalmente, outras 417 milhões com idade entre 17 e 49 anos são portadoras do *Human alphaherpesvirus 2* (HHV-2). No Brasil, um estudo realizado em 2010 demonstrou prevalência de 67,2 % de anticorpos para o HHV-1 e de 11,3 % para o HHV-2, variando de acordo com a idade e região. Entretanto, os estudos epidemiológicos nacionais relacionados às infecções por esse vírus são escassos, sendo necessária uma investigação mais detalhada para a epidemiologia do HHV no país (ANN COSTA CLEMNS; KAIRALLA FARHAT, 2010; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

O tratamento dessas infecções com análogos de nucleosídeos como o aciclovir por exemplo, tem sido bastante eficaz para a redução dos episódios de recorrência para ambos os casos de herpes labial e genital. Entretanto, o tratamento prolongado com esses fármacos pode desencadear a seleção de variantes resistentes, resultando em infecções agudas severas devido à inatividade do antiviral (BIRKMANN; ZIMMERMANN, 2016; JIANG et al., 2016; LÓPEZ-LABRADOR; BERENQUER; NAVARRO, 2015). Apesar dos esforços no combate ao HHV, houveram poucos avanços no tratamento da infecção desde a descoberta do aciclovir, limitando as opções para os pacientes resistentes aos fármacos disponíveis (GALDIERO et al., 2013). Nesse contexto, surge o desafio de se identificar novas estratégias para o desenvolvimento de moléculas anti-herpéticas, cujos mecanismos de ação envolvam alta efetividade contra o vírus e baixa toxicidade (JIANG et al., 2016).

Inúmeras abordagens relacionadas a novas moléculas antivirais vêm sendo desenvolvidas e, dentre elas, os peptídeos de defesa do hospedeiro (PDHs) representam uma alternativa promissora ao número limitado de terapias antivirais (GALDIERO et al., 2013; MULDER et al., 2013; SHARTOUNY; JACOB, 2018). Esses peptídeos são componentes importantes do sistema imune inato e apresentam um amplo espectro de atividades, como ação antibacteriana, antifúngica e antiviral, além de atividade anti-inflamatória e imunomodulatória. A partir dos estudos de estrutura-atividade e levando-se em consideração os alvos em estudo, novos peptídeos têm sido desenhados com o objetivo de melhorar sua atividade biológica e reduzir a suscetibilidade a hidrólise proteolítica. Esses peptídeos surgem como potencial alternativa de tratamento, tendo em vista o rápido aumento da seleção de microrganismos resistentes (KANG et al., 2017; PACHÓN-IBÁÑES et al., 2017).

Outra estratégia para o desenvolvimento de antivirais consiste em moléculas derivadas de produtos naturais como as chalconas, as quais possuem grande interesse na química medicinal devido à sua estrutura relativamente simples e facilidade de síntese. Além disso, as chalconas tanto de ocorrência natural quanto sintética exibem um amplo espectro de atividades biológicas incluindo ação anti-inflamatória, antimicrobiana e antiviral (GONÇALVES; VALENTE; RODRIGUES, 2014; MAHAPATRA; BHARTI; ASATI, 2017).

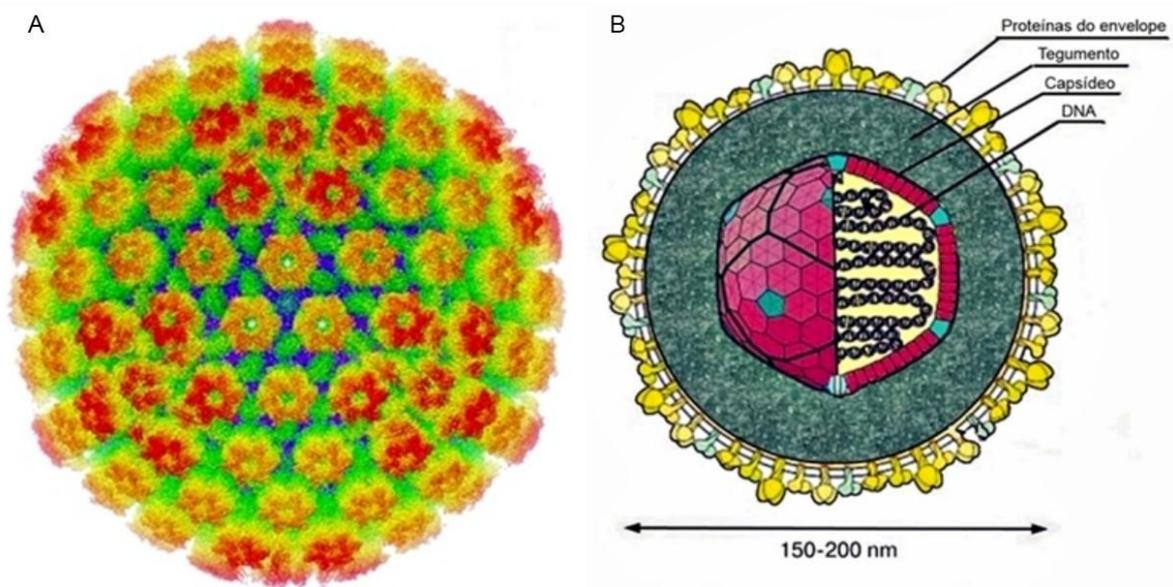
1.1 HUMAN ALPHAHERPESVIRUS 1 (HHV-1)

As infecções causadas pelo herpesvírus estão entre as doenças humanas mais comuns, acometendo cerca de 90% da população mundial segundo dados da OMS. Esses vírus têm sido classificados pelo Comitê Internacional para a Nomenclatura de Vírus (ICTV) na ordem *Herpesvirales* e família *Herpesviridae*, a qual abrange mais de 200 membros sendo nove deles capazes de infectar humanos. O gênero *Simplexvirus* foi o primeiro a ser descrito e compreende as espécies *Human alphaherpesvirus 1* (HHV-1) e *Human alphaherpesvirus 2* (HHV-2). Este gênero faz parte da subfamília *Alphaherpesvirinae* que inclui vírus com ciclo de vida relativamente curto, replicação rápida em diferentes tipos celulares e capacidade de estabelecer infecção latente em gânglios sensoriais (KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014; RECHENCHOSKI et al., 2017; VILAS BOAS, 2014).

As características morfológicas e genômicas do HHV-1 e HHV-2 são semelhantes aos dos outros membros da família *Herpesviridae*. Os vírions são esféricos, medindo entre 150 a 200 nm de diâmetro, possuem capsídeo icosaédrico formado por 162 capsômeros e o envelope no qual estão inseridas aproximadamente 11 glicoproteínas virais, sendo quatro delas (gB, gD, gH e gL) responsáveis pela entrada do vírus na célula (Figura 1). O capsídeo viral é composto pelas proteínas VP5, VP19C, VP23, VP24 e VP 26. Entre o capsídeo e o envelope há uma camada amorfa de proteínas chamada tegumento, a qual contém aproximadamente 20 proteínas que desempenham um papel importante na regulação do ciclo replicativo e são constituídas pelo fator de transdução α (α -TIF) ou VP16 que participa da transdução de genes virais imediatos, VP1-2 que viabiliza a liberação do DNA durante a penetração viral e a proteína VP22 cuja função envolve a degradação do mRNA no

citoplasma da célula hospedeira e a inibição da biossíntese de proteínas celulares (ARDUINO; PORTER, 2007; RECHENCHOSKI et al., 2017).

Figura 1. Características morfológicas do *Human alphaherpesvirus 1* (HHV-1). A) Reconstrução tridimensional do capsídeo icosaédrico do HHV-1. B) Estrutura da partícula viral do HHV-1.



Fonte: DAI et al. (2018); KUKHANOVA et al. (2014).

O genoma viral é composto por uma fita dupla de DNA linear de aproximadamente 150 kb, contendo 68 % de G+C para o HHV-1 e 69 % para o HHV-2, o qual contém cerca de 84 possíveis sequências de leitura aberta (ORF, *open reading frames*) que por sua vez, codificam aproximadamente 100 proteínas para a formação do envelope, tegumento e capsídeo, além das proteínas não estruturais. Formando o genoma, há dois componentes covalentemente ligados designados de L (longo) e S (curto), sendo que cada um deles é formado por sequências únicas (UL e US respectivamente), flanqueados por regiões de sequências repetitivas e invertidas, facilitando a replicação do genoma (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009; RECHENCHOSKI et al., 2017; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015).

O ciclo de vida do HHV pode ser dividido em cinco etapas que duram cerca de 18 a 20 horas em células permissivas e compreendem a penetração na célula hospedeira, expressão de genes virais, replicação, montagem do vírion e liberação das novas partículas virais (Figura 2). O início da infecção ocorre com a adsorção e entrada do HHV na célula hospedeira, por meio da ligação entre as glicoproteínas do envelope viral e receptores celulares. O principal receptor envolvido nesse processo

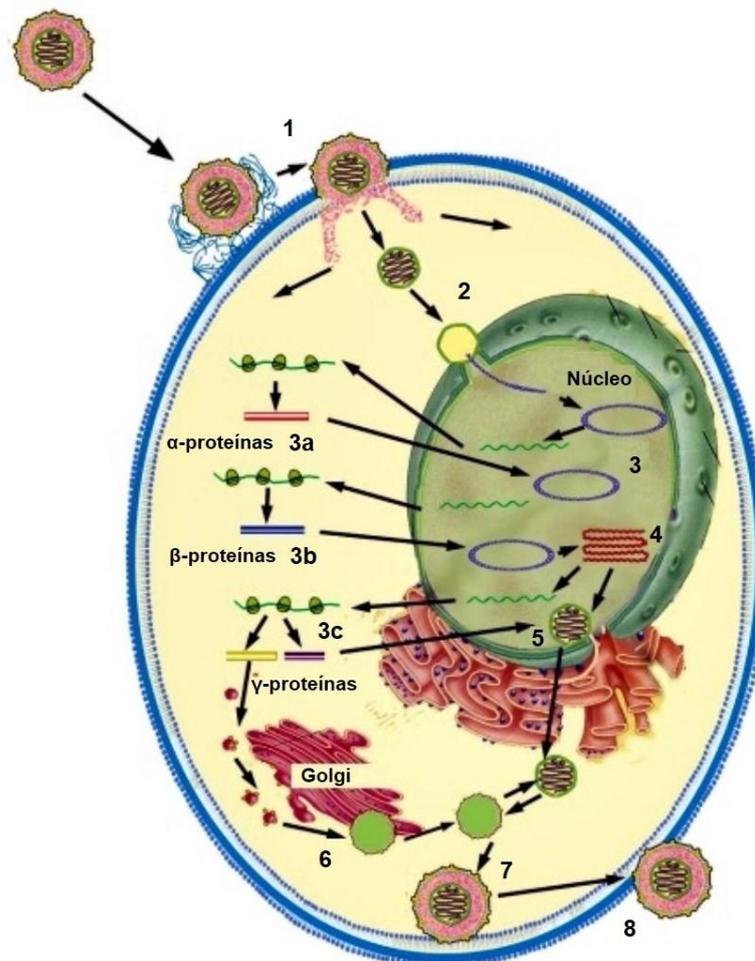
é o sulfato de heparana (HS) que possui forte afinidade pelas glicoproteínas virais C (gC) e B (gB), cuja interação cria múltiplos pontos de adesão, porém fracos e reversíveis. Assim, é necessária a participação da glicoproteína D (gD) para formar uma ligação estável por meio da interação com outros receptores celulares, incluindo o receptor mediador da entrada do herpesvírus (HVEM, *herpesvirus entry mediator*), nectinas 1 e 2 e o sulfato de heparana-3-O-sulfatado (3-O-S-HS). Esse mecanismo é necessário não só para a adsorção, mas também para a penetração viral, uma vez que tais interações desencadeiam mudanças conformacionais na gD, favorecendo sua ligação com o heterodímero gH/gL e permitindo a fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira (GALDIERO et al., 2013; KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015)

Após a penetração no citoplasma, o nucleocapsídeo pode ser transportado através dos microtúbulos até o poro nuclear, onde são liberados o DNA viral e a VP16, cuja associação com as proteínas citoplasmáticas do hospedeiro (HCF-1, *host cell factor 1*) e Octâmero 1 (OCT-1) formam o complexo pré-iniciador. A partir disso, inicia-se a transcrição e replicação do genoma viral no núcleo da célula hospedeira, bem como a montagem dos capsídeos, enquanto processos celulares essenciais como a síntese proteica e a resposta à infecção são inibidos (GALDIERO et al., 2013; RECHENCHOSKI et al., 2017).

Durante o ciclo lítico, os genes virais podem ser expressos de forma regulada em três fases sequenciais, são elas: α ou fase imediatamente inicial (IE), β ou fase inicial (E) e γ ou fase tardia (L). Inicialmente, o DNA viral é transcrito pela RNA polimerase II da célula hospedeira começando pelos genes IE, o que culmina com a síntese de seis proteínas, ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 e a proteína codificada pelo gene *Us1.5*. A síntese dessas proteínas ocorre nos estágios iniciais da infecção e atingem o pico em aproximadamente três horas pós-infecção. As proteínas α desempenham diversas funções e a principal delas envolve a ativação transcricional dos genes β , os quais são responsáveis pela replicação do ácido nucleico viral, supressão dos genes α e ativação dos genes γ . A expressão das proteínas β recruta diversas proteínas celulares para o núcleo, formando o complexo de replicação e iniciando a síntese do DNA viral. Esse processo ocorre cerca de seis horas pós-infecção (KNIPE; CLIFFE, 2008; KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014; RECHENCHOSKI et al., 2017)

Após a replicação do genoma, podem ser expressos os genes γ , os quais são regulados pelos genes α e β e codificam as proteínas tardias, incluindo as proteínas estruturais do tegumento e capsídeo, além das espículas glicoproteicas. A formação do capsídeo ocorre em torno de proteínas “plataforma” (*scaffolding*), que são transportadas para o núcleo junto com outras proteínas para o empacotamento do DNA viral. A transição do nucleocapsídeo do núcleo até o espaço extracelular ainda não é bem estabelecido, bem como o processo de envelopamento viral (CARDONE et al., 2012; RECHENCHOSKI et al., 2017; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015; WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

Figura 2. Ciclo lítico do HHV-1. 1) Adsorção e penetração viral na célula hospedeira; 2) Transporte do nucleocapsídeo ao núcleo celular; 3) Expressão dos genes virais: fase imediatamente inicial (a), fase inicial (b), fase tardia (c); 4) Replicação do DNA viral; 5) Montagem do nucleocapsídeo; 6) Maturação do capsídeo; 7) Formação do envelope viral; 8) Saída da partícula viral.



Fonte: KUKHANOVA et al. (2014, modificada).

Uma característica importante da família *Herpesviridae* consiste em sua capacidade de estabelecer infecção latente que pode persistir por toda a vida do hospedeiro. Essa estratégia é crucial para a manutenção do vírus, uma vez que o hospedeiro se torna reservatório para periódicas reativações. Após a infecção primária na mucosa oral, genital ou epiderme, o vírus alcança os neurônios sensoriais que inervam esses tecidos e são transportados até o gânglio sensorial em um processo conhecido como transporte retrógrado. O sítio de latência mais comum para o HHV-1 é o gânglio trigeminal, enquanto o HHV-2 estabelece latência principalmente no gânglio sacral. Uma vez no núcleo neuronal, o DNA viral é mantido na forma de um episssoma circular e ocorre a supressão da expressão gênica com exceção dos transcritos associados à latência (LAT, *latency associated transcripts*) (ARDUINO; PORTER, 2007; MENENDEZ; CARR, 2017; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015). A função exata dos LATs ainda não é totalmente conhecida, entretanto alguns estudos sugerem que esses genes agem reduzindo a expressão do genoma viral, enquanto mantém o vírus em estado de latência (GARBER; SCHAFFER; KNIPE, 1997; KENT et al., 2003), impede que os neurônios infectados sofram apoptose (BLOOM, 2004; PERNG et al., 2000) e facilitam uma reativação eficiente (HILL et al., 1990; LEIB; BOGARD; KOSZ-VNENCHACK, 1989).

Durante o período de latência, o vírus geralmente não é transmissível. Entretanto, as partículas virais podem se replicar e serem transmitidas de forma assintomática a outro indivíduo susceptível. A infecção recorrente é desencadeada pela reativação viral e pode ocorrer devido a diversos fatores como imunossupressão, desregulação hormonal, exposição à luz ultravioleta e estresse físico ou emocional. Durante o processo de reativação ocorre o transporte antirretrógrado, no qual as partículas virais saem dos neurônios para os sítios de infecção primária, onde se replicam e estabelecem as lesões (DE MELLO; BLOOM; PAIXÃO, 2016; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015).

Do ponto de vista clínico, a gravidade das infecções pelo HHV pode variar de branda a letal principalmente em imunocomprometidos, os quais podem apresentar episódios de reativação frequentes associados à persistência das lesões e à infecção disseminada em alguns casos. Normalmente a infecção primária é clinicamente mais severa se comparada à recorrente, devido à ausência de imunidade celular e humoral do hospedeiro, e pode durar de duas a três semanas. A transmissão nesse caso pode ocorrer por meio do contato com secreções cervicais, saliva, sêmen ou o líquido das

vesículas de indivíduos infectados. A identificação correta da infecção primária é fundamental para o sucesso do tratamento e redução das chances de complicação (GALDIERO et al., 2013; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015).

O HHV-1 está relacionado principalmente a lesões orofaciais, podendo causar outras manifestações clínicas como foliculite herpética, infecção ocular e encefalite em casos mais graves. Já o HHV-2 pode ser transmitido principalmente por via sexual, entretanto o número de infecções genitais transmitidas pelo HHV-1 tem aumentado nos últimos anos, sendo responsável pela maioria dos casos de herpes genital e possivelmente neonatal nos Estados Unidos e alguns países europeus. Uma hipótese para o aumento desses casos é a mudança no comportamento sexual da população, incluindo a prática de sexo oral desprotegida. As infecções genitais são caracterizadas por pápulas eritematosas bilaterais, vesículas ou ulcerações na genitália externa ou na região perianal, podendo ocorrer 4 a 7 dias após a exposição sexual. A diferença da infecção entre ambos os vírus é a frequência de recidivas, visto que o HHV-2 causa maior recorrência sintomática em relação ao HHV-1 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Os sintomas iniciais da infecção genital pelo HHV-1 não podem ser clinicamente diferenciados da infecção pelo HHV-2, isso só é possível por meio de testes laboratoriais. Além disso, muitos casos são assintomáticos ou atípicos, dificultando o diagnóstico e favorecendo a disseminação do vírus por via sexual. Outra característica preocupante é o possível aumento do risco de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) em pacientes portadores de herpes genital, os quais são aproximadamente três vezes mais propensos à infecção pelo HIV e por sua vez, os indivíduos com ambos os vírus têm maior chance de transmitir o HIV (JIANG et al., 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

A infecção neonatal pelo HHV é uma complicação rara, porém apresenta alta taxa de mortalidade, uma vez que 60% dos casos podem ser fatais se não tratados corretamente. Em um estudo recente, a estimativa da incidência global de herpes neonatal no período entre 2010-2015 foi de 14.000 casos a cada ano, equivalendo a 10.3/100.000 nascidos vivos e dentre eles, 37% dos casos ocorreram na África. A transmissão vertical pode ocorrer *in utero* (5%), durante o parto através da passagem pelo canal vaginal (85%) ou após o nascimento, por meio do contato do neonato com secreções de pessoas infectadas (10%) (LOOKER et al., 2018; PINNINTI; KIMBERLIN, 2018).

O risco de transmissão durante a gestação pode ser maior se a mulher desenvolver a infecção primária no terceiro trimestre de gestação, sendo que a infecção pelo HHV-1 possui maior risco de transmissão vertical comparado ao HHV-2. As manifestações clínicas do herpes neonatal têm sido classificadas em três categorias. Na primeira, a infecção acomete a pele e regiões oral e labial, a segunda inclui a infecção do sistema nervoso central e a terceira constitui a infecção disseminada (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009; RECHENCHOSKI et al., 2017). Outra forma severa da infecção pelo HHV é a encefalite, representando cerca de 20% dos casos de encefalite aguda. Estima-se que a incidência anual de encefalite herpética global seja de 2 a 4 casos por 1.000.000 de habitantes, sendo que a maioria dos casos ocorre em idosos e pacientes imunocomprometidos. Em pacientes não tratados, estima-se que as taxas de mortalidade cheguem a 70 % sendo que apenas 2,5 % dos pacientes que sobrevivem, não apresentam sequelas neurológicas (GALDIERO et al., 2013; RABINSTEIN, 2017).

1.2 FÁRMACOS ANTIVIRAIS CONTRA O HHV E DESENVOLVIMENTO DE RESISTÊNCIA

A busca por moléculas antivirais teve início na década de 1950, com a descoberta de Hamre e colaboradores de que algumas tiossemicarbazonas eram capazes de inibir o vírus vaccínia. Antes disso, acreditava-se que as doenças virais não eram suscetíveis à terapia medicamentosa, como no caso das doenças bacterianas, devido à característica intracelular dos vírus e a dificuldade em se desenvolver fármacos capazes de inibir a replicação viral sem causar toxicidade ao hospedeiro. Dessa forma, as primeiras descobertas acerca dos antivirais ocorreram de forma fortuita, visto que essas moléculas foram inicialmente desenvolvidas para o tratamento de outras doenças e posteriormente selecionadas como possíveis candidatas a antivirais (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015).

Um exemplo disso, ocorreu com os análogos de nucleosídeos de primeira geração, os quais surgiram de pesquisas para a seleção de moléculas anticancerígenas, devido à sua capacidade de interferir na síntese do DNA celular. Entretanto, os antivirais baseados nessa classe de substâncias apresentavam alta toxicidade, visto que eram capazes de atuar não só no DNA viral, mas também no DNA das células hospedeiras. Dentre essas moléculas, está a idoxuridina (IDU),

inicialmente desenvolvida para o tratamento de câncer e posteriormente selecionada para o tratamento tópico de queratite herpética (BRYAN-MARRUGO et al., 2015; DE CLERCQ; FIELD, 2006; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015).

A descoberta do aciclovir (ACV) na década de 70, representou um marco na era dos antivirais por ser um dos primeiros fármacos a apresentar alta seletividade e baixa toxicidade (PARK; PAVAN-LANGSTON; MCLEAN, 1979). Esse fármaco faz parte da classe dos análogos de nucleosídeos de segunda geração, cuja atividade baseia-se na inibição da DNA polimerase viral e exibe ação seletiva nas células infectadas, uma vez que a afinidade da acicloguanosina pela timina quinase viral (TK) é aproximadamente 200 vezes maior que pela TK humana. Após a descoberta do ACV, outras moléculas antivirais foram sintetizadas como o penciclovir (PCV), o ganciclovir (GCV) e as pró-drogas valaciclovir (VCV), famciclovir (FCV) e valganciclovir (VGCV) que diferem entre si em relação à estrutura molecular (Figura 3) e eficiência de absorção. (BIRKMANN; ZIMMERMANN, 2016; JIANG et al., 2016; VILAS BOAS, 2014).

Na tabela 1 estão descritos o mecanismo de ação dos principais fármacos utilizados contra o HHV, bem como suas indicações e efeitos adversos. Apesar da eficácia do ACV no tratamento das infecções pelo HHV, esse fármaco possui algumas desvantagens, como a biodisponibilidade relativamente baixa (15-20%) e meia vida plasmática curta. Esse problema também é observado no PCV, o qual apresenta um espectro de atividade semelhante ao ACV, entretanto sua biodisponibilidade oral é ainda menor. Diante disso, foram desenvolvidas os pró-fármacos valaciclovir (VCV) e o famciclovir (FCV), as quais apresentam biodisponibilidade consideravelmente superior (50 % e 77 %, respectivamente) (DE CLERCQ; FIELD, 2006; FLINT et al., 2004; TYRING; BAKER; SNOWDEN, 2002).

Apesar da comprovada eficácia dos análogos de nucleosídeos no tratamento das infecções pelo HHV, a administração desses antivirais a longo prazo pode levar à seleção de variantes resistentes, sendo que a prevalência desses casos varia muito de acordo com as condições imunológicas do paciente. Em indivíduos imunocompetentes, casos de resistência ocorrem com menor frequência, variando de 0,3 % a 0,7 %. Entretanto, em pacientes imunocomprometidos esse número varia entre 2,5 a 25%, podendo chegar a uma prevalência de 30% em pacientes submetidos a transplante alogênico de medula óssea, resultando em infecções severas e disseminadas. Essa diferença entre o número de casos pode ser atribuída ao fato de

que a replicação viral pode ocorrer de forma prolongada em pacientes com imunossupressão, levando à infecção persistente. Além disso, nos casos de supressão da resposta imune do hospedeiro, os vírus menos patogênicos que em condições imunológicas normais seriam eliminados, continuam se replicando produzindo lesões evidentes nesses pacientes (BIRKMANN; ZIMMERMANN, 2016; JIANG et al., 2016; PIRET; BOIVIN, 2016).

Os mecanismos de resistência do HHV podem ocorrer formas variadas. Em 95% dos casos, ocorre mutação do gene UL23 que é responsável pela ativação da enzima TK viral, resultando em três possíveis fenótipos: (a) redução na síntese de TK; (b) deficiência na atividade da TK e (c) proteína TK com alteração de substrato específico, ou seja, a enzima é capaz de fosforilar seu substrato natural (timidina), mas não desempenha essa ação com a molécula de ACV. Outro mecanismo está relacionado à mutação do gene UL30 que codifica a DNA polimerase viral, resultando em resistência ao ACV e PCV (GILBERT; BESTMAN-SMITH; BOIVIN, 2002; JIANG et al., 2016; PIRET; BOIVIN, 2016).

A emergência de variantes do HHV resistentes aos análogos de nucleosídeos, levou ao desenvolvimento de uma nova geração de antivirais como o foscarnet e cidofovir (Tabela 1), entretanto ambos os fármacos apresentam uma nefrotoxicidade considerável e são indicadas apenas quando as tentativas de terapia com os análogos de nucleosídeos são falhas (DE SURJO; HART; BREUER, 2015).

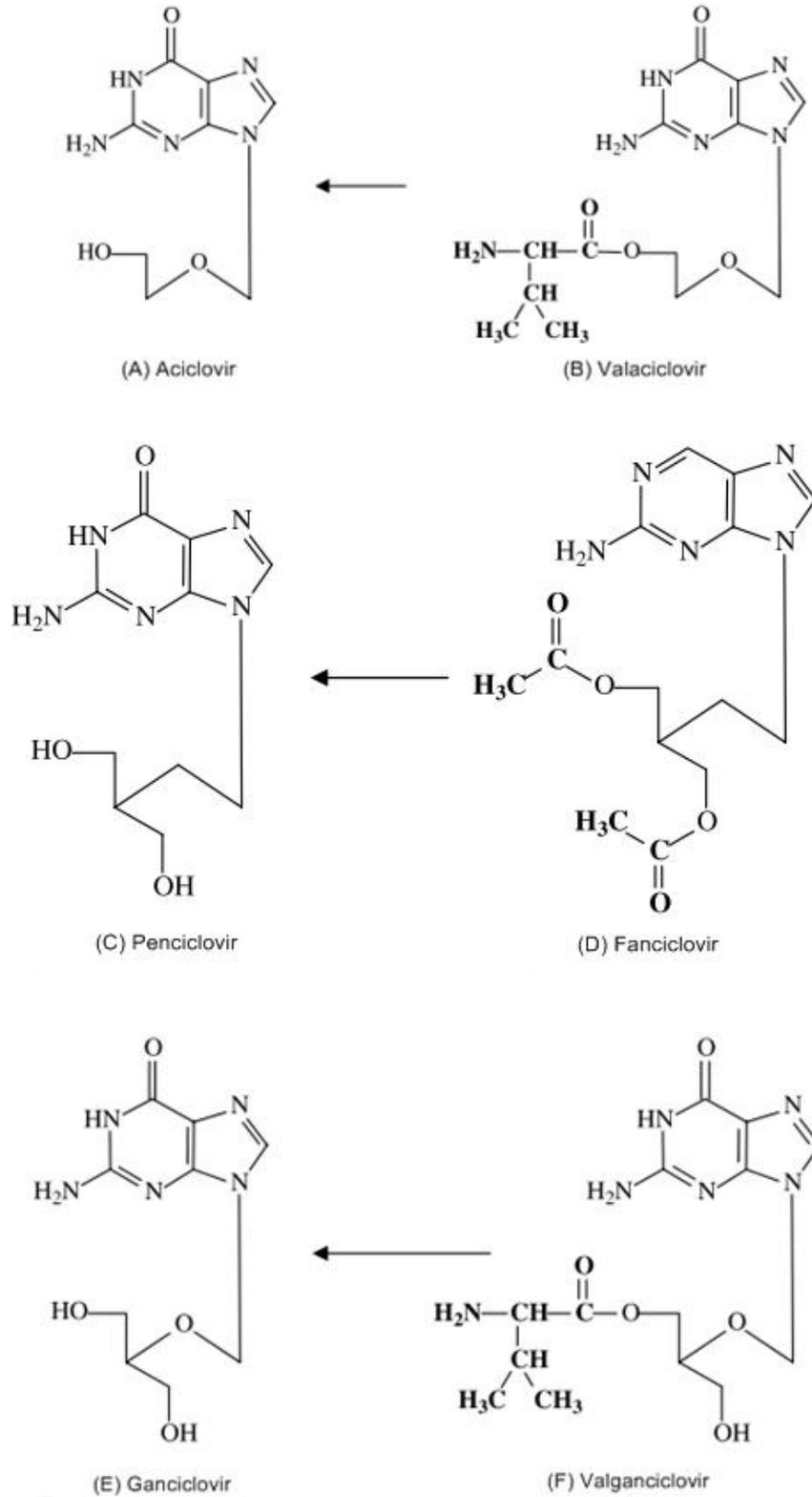
Diante do exposto, observa-se que as opções de tratamento para as infecções pelo HHV são limitadas, visto que os antivirais de primeira escolha possuem os mesmos alvos de ação. Além disso, nos casos de resistência, as drogas disponíveis são consideravelmente tóxicas, limitando sua administração no paciente. Isso demonstra a necessidade do desenvolvimento de novos compostos capazes de atuar em diferentes alvos e que apresentem especificidade e baixa toxicidade (JIANG et al., 2016; SKOREŃSKI; SIEŃCZYK, 2014)

Tabela 1. Principais fármacos antivirais empregados no tratamento de infecções pelo HHV-1 e outros vírus da família *Herpesviridae*.

Antiviral	Classe	Mecanismo de ação	Indicações	Efeitos adversos	Referências
Aciclovir (ACV)	Análogo de nucleosídeo.	Inibição competitiva da DNA polimerase viral.	Infecções na pele e mucosas, supressão de infecções recorrentes em imunocompetentes, profilaxia em imunocomprometidos, encefalite, infecção neonatal, infecções por VZV.	Cefaleia, náuseas, vômitos, dores abdominais, erupções cutâneas, febre.	JAMES; PRICHARD, 2014 ANVISA, 2016.
Penciclovir (PCV)	Análogo de guanossina acíclico.	Inibição competitiva da DNA polimerase viral.	Tratamento tópico de lesões labiais e queratite herpética.	Cefaleia, edema local, urticária.	DE CLERCQ; FIELD, 2006; FDA, 2013.
Ganciclovir (GCV)	Análogo de guanossina acíclico.	Incorporação direta ao DNA viral; Inibição da DNA polimerase viral.	Retinite causada por CMV em portadores do HIV, profilaxia em pacientes transplantados.	Mielotoxicidade, neutropenia, anemia, plaquetopenia.	CHOU; HONG, 2014; ANVISA, 2016.
Valaciclovir (VCV)	Análogo de guanossina acíclico (pró-fármaco do ACV).	Inibição da DNA polimerase viral.	Herpes labial e genital, prevenção de lesões recorrentes, infecções por VZV.	Cefaleia, náuseas, erupções cutâneas.	TYRING; BAKER; SNOWDEN, 2002; ANVISA, 2016.
Fanciclovir (FCV)	Análogo de guanossina acíclico (pró-fármaco do PCV).	Inibição da DNA polimerase viral.	Herpes labial e genital, infecções por VZV.	Cefaleia, náuseas, diarreia.	DE CLERCQ; FIELD, 2006; ANVISA, 2017.
Foscarnet	Análogo de pirofosfato.	Inibição da DNA polimerase viral.	Infecções por HHV, VZV ou CMV resistente.	Nefrotoxicidade.	DE SURJO; HART; BREUER, 2015. FDA, 2006.
Cidofovir	Análogo monofosfato de citosina.	Inibição da DNA polimerase viral.	Infecções por HHV, VZV ou CMV resistente.	Nefrotoxicidade.	DE SURJO; HART; BREUER, 2015.

VZV: vírus varicela-zoster; CMV: citomegalovírus

Figura 3. Estruturas moleculares dos análogos de nucleosídeos e seus pró-fármacos.



Fonte: DE CLERCQ; FIELD (2006).

1.3 BIOMOLÉCULAS UTILIZADAS EM ESTUDOS DE ATIVIDADE ANTIVIRAL

Desde a descoberta da idoxuridina, outras moléculas foram descritas e testadas para uso como terapia antiviral, porém o arsenal de fármacos antivirais disponíveis permanece consideravelmente pequeno. Um levantamento realizado por De Clerq e colaboradores (2016) demonstrou que no período entre Junho de 1963 e Abril de 2016, um total de 90 fármacos antivirais foram aprovados para o tratamento de nove tipos de doenças infecciosas humanas, dentre elas, o HHV. Entretanto, esse número é pequeno se comparado aos diversos inibidores virais propostos na literatura durante esse período, constatando que a identificação de novos alvos terapêuticos, muitas vezes não é acompanhado pelo desenvolvimento e licenciamento de novos fármacos (DE CLERCQ, 2016; DE CLERCQ; FIELD, 2006; MERCORELLI; PALÙ; LOREGIAN, 2018).

Apesar das extensas pesquisas, o desenvolvimento de antivirais continua sendo um grande desafio por diversas razões. A primeira delas diz respeito à segurança do antiviral, uma vez que os vírus dependem da maquinaria celular para se replicar e por isso, as drogas que inibem o vírus também podem causar toxicidade para o hospedeiro. Além disso, o antiviral precisa ser altamente eficiente, visto que a replicação viral mesmo de forma reduzida, na presença de uma droga inibidora, pode ocasionar a seleção de variantes resistentes. Outro fator envolve a dificuldade de se cultivar vírus de importância médica em laboratório, pela limitação de culturas celulares susceptíveis à infecção e também pela falta de modelos animais para algumas infecções humanas de importância clínica (FLINT et al., 2004).

O caminho desde a identificação de uma nova molécula antiviral até sua aprovação é bastante longo e oneroso, levando cerca de dez a quinze anos. Esses fármacos são desenvolvidos a partir de compostos modelo que muitas vezes não são adequados para uso clínico por possuírem características indesejáveis como alta citotoxicidade, por exemplo. Entretanto, esses compostos são utilizados como ponto inicial para a síntese de análogos com o objetivo de potencializar a ação biológica desejada, bem como reduzir os efeitos deletérios (ANDRIGHETTI-FROHNER, 2008; EVERTS et al., 2017).

Seguindo essa premissa, foram desenvolvidos métodos de predição e desenho racional de peptídeos com o objetivo de melhorar sua atividade antimicrobiana, bem como reduzir seu tamanho e citotoxicidade. Alguns métodos usam sequências de

peptídeos conhecidos, criando análogos com propriedades físico-químicas diferentes ou aumento de seletividade, enquanto os métodos *de novo* se baseiam em frequências ou padrões para gerar novos peptídeos. Dessa forma, é possível desenvolver fármacos com alta seletividade para um determinado microrganismo, e efeitos adversos reduzidos (SILVA et al., 2018). Essas estratégias têm sido utilizadas no desenho de peptídeos antivirais, por exemplo, contra o HIV (CHONG et al., 2018) e o HCV (BHATTA et al., 2018; LI et al., 2011; LIU et al., 2013). Outro esforço utilizado nesse sentido são os estudos quantitativos de estrutura-atividade (QSAR), que buscam compreender a relação entre as propriedades físico-químicas das biomoléculas e suas atividades biológicas observadas (SIMEON et al., 2017). Essa abordagem possui diversas aplicações, indo além do estudo de peptídeos, sendo empregada também na identificação e confirmação de alvos moleculares de compostos derivados de produtos naturais, como é o caso das chalconas. Dessa forma, há um interesse crescente na exploração do mecanismo de ação, incluindo identificação de alvos dessas moléculas, além da avaliação de suas propriedades biológicas (ZHUANG et al., 2017).

2 JUSTIFICATIVA

Os herpesvírus constituem uma das infecções virais humanas mais comuns e estão entre os agentes causadores de doenças sexualmente transmissíveis, representando um importante problema de saúde pública. Os tratamentos disponíveis envolvem o uso de análogos de nucleosídeos, entretanto o surgimento de variantes resistentes dificulta o combate dessas infecções sobretudo em indivíduos imunocomprometidos, que acabam desenvolvendo a forma mais grave da doença devido à inatividade do antiviral. Além disso, essa classe de antivirais possui o mesmo alvo de ação e nos casos de resistência viral, os fármacos disponíveis como alternativa de tratamento têm o uso limitado devido à sua alta toxicidade. Diante disso, é imperativo a identificação e estudo de novas moléculas com diferentes mecanismos de ação e menor toxicidade ao hospedeiro, como alternativa de tratamento às infecções virais. Nesse cenário, estudos envolvendo a avaliação antiviral de peptídeos e de moléculas derivadas de produtos naturais como as chalconas têm demonstrado o potencial destes como compostos modelo para o desenvolvimento de fármacos. Assim, o presente estudo visou avaliar a atividade antiviral de biomoléculas provenientes de diferentes fontes contra o HHV-1, sua possível ação sobre algumas etapas do ciclo viral, bem como sua citotoxicidade sobre a célula hospedeira do modelo experimental.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antiviral de compostos derivados de produtos naturais, bem como de peptídeos imunomodulatórios contra o *Human alphaherpesvirus 1* (HHV-1) e inferir sua possível ação sobre as etapas de adsorção, penetração e biossíntese viral.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar o efeito sobre a viabilidade celular dos compostos C1, C2, C3 e C4 isolados da espécie *Campomanesia adamantium* e da chalcona cardamonina em células Vero.
- ✓ Avaliar o efeito sobre a viabilidade celular dos peptídeos IDR1018 e DJK-6 em células Vero.
- ✓ Determinar a atividade antiviral contra o HHV-1 dos compostos e peptídeos submetidos ao ensaio de viabilidade celular.
- ✓ Inferir em qual etapa do ciclo replicativo viral esses compostos e peptídeos possivelmente atuam.

4 CAPÍTULO 1: COMPOSTOS DERIVADOS DE PLANTAS MEDICINAIS: UMA FONTE PROMISSORA PARA O DESENVOLVIMENTO DE ANTIVIRAIS.

4.1 INTRODUÇÃO

O manejo e cultivo de plantas medicinais são utilizados há milênios por nossos antepassados e desempenham um importante papel socioeconômico para as populações rurais e urbanizadas (VIEIRA; VIEIRA; ZÁRATE, 2016). De acordo com a OMS, entre 65 % e 80 % da população dos países em desenvolvimento, utilizam plantas medicinais para fins terapêuticos (CAMERON et al., 2011). Para a indústria farmacêutica, os produtos naturais constituem boa parte da matéria prima para o desenvolvimento de fármacos. O mercado global de produtos derivados de plantas é estimado em US\$ 83 bilhões e continua crescendo, com aproximadamente 25 % dos medicamentos modernos e 60 % dos fármacos antitumorais sendo provenientes de produtos naturais (PALHARES et al., 2015).

Apesar da crescente demanda no mercado de fitoterápicos, estima-se que apenas 15 % das espécies de plantas medicinais conhecidas tenha seu potencial farmacológico avaliado (PALHARES et al., 2015). O Brasil apontado como um dos maiores detentores de biodiversidade do planeta, possui um mercado de fitoterápicos muito modesto, representando menos de 5% do mercado global de medicamentos no país. Este fato demonstra a dissociação entre o grande número de publicações realizadas por cientistas brasileiros e o desenvolvimento de novos fitoterápicos (DUTRA et al., 2016; VIEIRA; VIEIRA; ZÁRATE, 2016).

Frente aos desafios globais de saúde pública, a pesquisa de produtos naturais desempenha um papel fundamental na descoberta de medicamentos inovadores. Compostos isolados de fontes naturais têm sido explorados para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, incluindo análogos semissintéticos bem como compostos inteiramente sintéticos projetados a partir de produtos naturais. Exemplo disso é o fato de que 60 % e 75 % dos medicamentos para o tratamento de câncer e doenças infecciosas, respectivamente, são derivados de produtos naturais (LI et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2017; THOMFORD et al., 2018).

Esses produtos também são importantes fontes de pesquisa para o desenvolvimento de antivirais (LI et al., 2018). A busca por agentes antivirais isolados de plantas teve início na década de 1950, com a avaliação da atividade de 288 plantas

contra o vírus influenza A em ovos embrionados (CHANTRILL et al., 1952). Nas últimas quatro décadas, estudos levaram à descoberta de alguns agentes com atividade anti-herpética e muitos deles exibem mecanismos complementares ou sobrepostos de ação. Vários dos compostos inibem a entrada do vírus, a síntese do genoma viral, maturação ou montagem (QAVI; HESSEL, 2015).

Ao contrário da formulação de fármacos sintéticos com poucos constituintes químicos, as plantas medicinais possuem diversos metabólitos antivirais capazes de inibir a replicação viral sem afetar o metabolismo do hospedeiro, limitando seus efeitos colaterais. Além disso, esses produtos naturais de plantas também podem levar à modificação ou melhoramento da resposta imune do hospedeiro contra o vírus, conseqüentemente aliviando os sintomas e reduzindo a mortalidade causada pelas infecções virais (HUSSAIN et al., 2017).

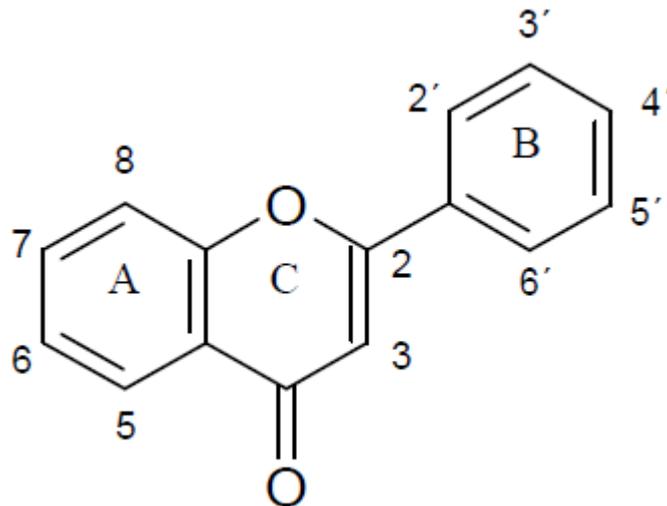
Dentre os metabólitos secundários presentes em plantas estão os flavonoides, os quais representam um dos grupos mais atrativos dentre as moléculas naturais bioativas devido aos seus efeitos benéficos na prevenção de diversas patologias (GIAMOGANTE et al., 2016; TSUCHIYA, 2015). Esses fitoquímicos são componentes indispensáveis em uma variedade de produtos farmacêuticos, medicinais e cosméticos devido às suas propriedades antioxidante (SRIVASTAVA; BEZWADA, 2015), anticarcinogênica (LEJEUNE; TSUI; PARSONS, 2015), anti-inflamatória (HOSSAIN; SHAHID-UD-DAULA; JAHAN, 2012), além de sua função modulatória em enzimas celulares (KIM; SON; CHANG, 2004; PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016).

Como fitoquímicos, os flavonoides não podem ser sintetizados por humanos e animais, porém são constituintes importantes da dieta, sendo encontrados em frutas, vegetais e algumas bebidas como chás, cafés e vinhos. Em plantas, os flavonoides desempenham funções de proteção contra estresses bióticos e abióticos, atuam na defesa contra microrganismos e como filtros UV, podendo ocorrer como agliconas, glicosídeos ou derivados metilados (KUMAR; PANDEY, 2013; MIN et al., 2018; PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016).

Atualmente, existem mais de 6000 variedades de flavonoides estruturalmente identificados. Todos esses compostos possuem um esqueleto de quinze carbonos em comum, formado por dois anéis benzeno (A e B) ligados por um anel pirano heterocíclico (C), conforme demonstrado na figura 4. De acordo com o grau de oxidação e padrão de substituição do anel C, os flavonoides podem ser classificados em diversos subgrupos: flavonóis, flavonas, isoflavonoides, flavanonas,

antocianidinas, catequinas, chalconas, entre outros. Os compostos individuais dentro de cada subgrupo variam pelo padrão de substituição dos anéis benzeno (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016; TSUCHIYA, 2011; ZAKARYAN et al., 2017).

Figura 4. Estrutura química geral dos flavonoides. A/B: anéis benzeno; C: anel pirano.



Fonte: BEHLING et al.(2004)

Dentre as ações biológicas desempenhadas pelos flavonoides, seu efeito antiviral têm sido demonstrado por diversos estudos (Tabela 2), nos quais diferentes classes desses compostos apresentam variados mecanismos de inibição viral, incluindo ação virucida, supressão da síntese proteica e da expressão gênica viral, além da modulação da função de proteínas específicas (ZAKARYAN et al., 2017). Em relação aos herpesvírus humanos (HHV), estudos demonstraram a ação inibitória da apigenina contra o HHV-1 e HHV-2, sendo que a combinação desse composto com o aciclovir potencializou o efeito inibitório sobre ambos os vírus em cultura celular (MANVAR et al., 2012; MUCSI; GYULAI; BÉLÁDI, 1992; VISINTINI et al., 2013). Outro estudo realizado por Hung e colaboradores (2015), demonstrou o mecanismo de ação da quercetina contra a infecção pelo HHV-1, HHV-2 e contra o HHV-1 resistente ao aciclovir. O estudo sugeriu que a quercetina age bloqueando a adsorção e penetração viral na célula hospedeira, além de inibir a ativação do fator de transcrição NF-κB, que é essencial para a expressão gênica do HHV. Outro possível mecanismo de inibição deste vírus ocorre pela ação da epigallocatequina galato (EGCG), a qual pode inativar as partículas virais por meio da ligação às glicoproteínas gB e gD, essenciais para a infectividade do HHV (CHANG et al., 2003).

Tabela 2. Flavonóides com ação antiviral descritos na literatura e suas classes.

Flavonóide	Classe	Ação antiviral	Referências
Apigenina	Flavona	HHV-1, HHV-2, HCV, poliovírus tipo 2.	MANVAR et al., 2012; VISINTINI et al., 2013.
Baicaleína	Flavona	HCMV, FLUV-A (H1N1), AIV-1 (H5N1), HIV-1; CHIKV.	COTIN et al., 2012; XU et al., 2010; SITHISARN et al., 2013; KIM et al., 2013; SEYEDI et al., 2016.
Quercetina	Flavonol	HHV-1, HHV-2, RSV, HCV.	KANG et al., 2004; LYU et al., 2005; MATHEW et al., 2015.
Kaempferol	Flavonol	HHV-1, HHV-2, CoV.	YARMOLINSKY, 2012; SCHWARZ et al., 2014
Hesperetina	Flavanona	YFV; CHIKV.	AHMANDI et al., 2016; CASTRILLO et al., 2015.
Crisina	Flavona	HHV-1; EV71.	SCALBERT et al., 2002; WANG, 2014.
Miricetina	Flavonol	HIV-1; SARS-CoV, FLUV.	PASETTO et al., 2014; KEUM; JEONG 2012; LIU et al., 2008.
EGCG	Catequina	EBV, HCV, ZIKV, CHIKV.	LIU et al., 2013; CALLAND et al., 2012. CARNEIRO et al., 2016; WEBER et al., 2015.
Luteolina	Flavona	HIV-1, EBV, JEV; CHIKV.	MEHLA et al., 2011; WILLIAMSON; CLIFFORD, 2010; FAN et al., 2016; MURALI et al., 2015.
Naringenina	Flavanona	HCV, CHIKV.	KHACHATOORIAN et al., 2012; AHMANDI et al., 2016;

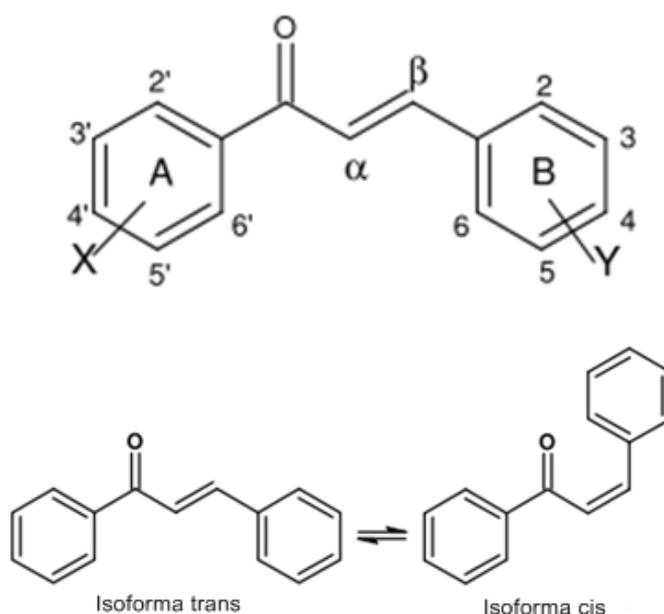
HHV-1: *Human alphaherpesvirus 1*; HHV-2: *Human alphaherpesvirus 2*; HCV: vírus da hepatite C; HCMV: citomegalovírus humano; FLUV-A (H1N1): vírus influenza A subtipo H1N1; AIV-A (H5N1): vírus influenza aviária A subtipo H5N1; HIV-1: vírus da imunodeficiência humana; CHIKV: vírus chikungunya; RSV: vírus sincicial respiratório; CoV: coronavírus; YFV: vírus da febre amarela; EV71: enterovírus 71; SARS-CoV: coronavírus causador da síndrome respiratória aguda; EBV: vírus Epstein-Barr; ZIKV: vírus zika; JEV: vírus da encefalite japonesa.

4.1.1 Chalconas: aspectos gerais e atividade antiviral

As chalconas, quimicamente denominadas 1,3-difenil-2-propen-1-ona, constituem uma das principais classes de produtos naturais presentes em frutas, vegetais, chás, especiarias e alimentos à base de soja. O nome “chalcona” é derivado da palavra grega “chalcos” que significa “bronze”, e remete à coloração das chalconas naturais. Esses compostos são precursores de cadeia aberta na via de biossíntese dos flavonoides e isoflavonoides e são classificados como cetonas α - β -insaturadas, cujos grupamentos aromáticos estão ligados por três carbonos, conforme demonstrado na figura 5. (NI; MENG; SIKORSKI, 2004; SAHU et al., 2012).

Devido à presença da ligação entre os carbonos α e β , as chalconas podem ser encontradas nas formas isoméricas *cis* e *trans*, sendo esta última mais favorável termodinamicamente (Figura 5). Entretanto, a porção cetônica insaturada possivelmente é responsável pela gama de atividades biológicas observadas e a remoção desta resulta na perda da bioatividade desses compostos. Mantendo essa porção intacta, outras moléculas derivadas das chalconas foram sintetizadas por modificações em ambos os anéis (EVANOS AKSÖZ; ERTAN, 2011; SAHU et al., 2012).

Figura 5. Estrutura geral das chalconas e suas formas isoméricas *trans* e *cis*, onde X e Y representam os grupamentos substituintes situados nos anéis aromáticos.



Fonte: COSTA (2015).

Os estudos envolvendo os compostos pertencentes à classe das chalconas, vêm ganhando destaque no âmbito da química medicinal, devido ao seu vasto espectro de atividades biológicas. Diversos estudos têm demonstrado a ação dessas moléculas em diferentes patologias, incluindo atividade antioxidante (AOKI et al., 2008), anti-inflamatória (HERENCIA et al., 1998; ISRAF et al., 2007), anti-infecciosa (NOWAKOWSKA, 2007), anticâncer (KATSORI; LITINA, 2009), antiobesidade (KARKHANEH et al., 2016), anti-histamínica (YAMAMOTO et al., 2004), anti-hiperglicêmica (NAJAFIAN et al., 2010), antiangiogênica (MIROSSAY; VARINSKÁ; MOJŽIŠ, 2018), ansiolítica (JAMAL; ANSARI; RIZVI, 2008) e revisões recentes mostraram ação contra leishmaniose (MELLO et al., 2018) e atividade hepatoprotetora (SALES; MOHADDES; ALIPOUR, 2018).

Além das atividades biológicas descritas, parte do interesse no estudo dessa classe de compostos também se deve ao seu núcleo fundamental, o qual constitui uma estrutura relativamente rígida minimizando a variabilidade conformacional da molécula. Essa característica é fundamental para o processo de desenho de fármacos e além disso, os anéis que compõem a estrutura dessa molécula apresentam diversas possibilidades de substituintes, contribuindo para a modificação ou melhoria da atividade farmacológica das mesmas moléculas (COSTA, 2015).

Diversas chalconas têm despertado o interesse da química medicinal, dentre elas, a cardamonina vem sendo estudada devido à sua variedade de atividades biológicas, incluindo ação antiviral (GONÇALVES; VALENTE; RODRIGUES, 2014). Esse composto foi isolado originalmente em 1976 a partir do cardamomo preto, especiaria típica da Índia, e desde sua primeira descrição foi encontrado em diversas outras espécies de plantas (BHAT et al., 2018; LU et al., 2018).

Estruturalmente, a cardamonina (2',4'-dihydroxy-6'-methoxychalcone) apresenta uma cetona α,β -insaturada entre dois anéis aromáticos, com o anel A contendo dois grupos fenólicos, além de um grupo éter metil. As modificações químicas nesse composto podem ser realizadas para se obter análogos com maior diversidade estrutural, resultando em moléculas bioativas capazes de potencializar ações biológicas observadas previamente (BREAK, 2018).

Alguns estudos relacionados à avaliação antiviral da cardamonina foram realizados para o HIV-1 e o vírus da dengue tipo 2 (DENV-2). No primeiro estudo, realizado por Tewtrakul e colaboradores (2003), a cardamonina apresentou ação inibitória contra a enzima protease, essencial para a replicação do HIV-1. A

concentração inibitória (IC_{50}) foi de $31 \mu\text{g.mL}^{-1}$, demonstrando maior capacidade de inibição se comparado às flavanonas testadas, as quais apresentaram $IC_{50} > 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O segundo estudo realizado por Kiat e colaboradores (2006) demonstrou a ação da cardamonina contra a protease NS3 do DENV-2, exibindo um percentual inibitório de 71% e 39% nas concentrações de $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $120 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

Uma das atividades biológicas da cardamonina descritas na literatura é sua ação antitumoral em diversos tipos de câncer (JAMES et al., 2017; LI et al., 2017). Um estudo realizado com o vírus Epstein-Barr (EBV), demonstrou efeito inibitório dessa chalcona contra o crescimento tumoral provocado por esse vírus, apresentando IC_{50} de $0,83 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O EBV faz parte da família *Herpesviridae* e causa uma doença sistêmica conhecida como mononucleose infecciosa, a qual está fortemente associada ao desenvolvimento de tumores malignos (MURAKAMI et al., 1993). Em relação ao HHV-1, não foram encontrados estudos de atividade antiviral da cardamonina contra esse vírus.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Cultivo celular

Foram utilizadas células da linhagem Vero (rim de macaco verde *Cercopithecus aethiops*) adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Para a manutenção da linhagem, as suspensões entre 10^5 e 10^6 células mL^{-1} , foram cultivadas em garrafas com capacidade de 50 mL (Kasvi, Brasil), em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* – Sigma-Aldrich, EUA), suplementado com L-glutamina (Gibco, UK), estreptomicina/penicilina (Cultilab, Brasil) e 10 % de soro fetal bovino (SFB – Cultilab, Brasil), em estufa contendo 5 % de CO_2 a 37 °C, em atmosfera úmida (CARRIEL-GOMES et al., 2007). Os repiques foram realizados a partir de uma garrafa contendo 5 mL de DMEM com SFB, para o crescimento da monocamada celular, da qual foi descartado o meio de cultura e adicionado 4 mL de tripsina a 0,05 % (Sigma-Aldrich, EUA). A ação dessa enzima proteolítica consiste em clivar as ligações entre as células aderidas, possibilitando a suspensão destas em meio, para realização do repique. Após a desagregação celular, a tripsina foi removida e foram adicionados 10 mL de DMEM com SFB, homogeneizado e transferidos para outra garrafa, de modo que cada garrafa permaneceu com 5 mL da suspensão de células. Os repiques foram realizados em um intervalo de duas vezes por semana, sob observação em microscópio óptico invertido (Primo Vert) e monitorados em relação à confluência da monocamada celular, características morfológicas e possíveis agentes contaminantes.

4.2.2 Multiplicação e estoque viral

O HHV-1 utilizado nos ensaios foi gentilmente cedido pela professora doutora Maria Teresa Villela Romanos da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Para a produção do estoque viral, foram inoculados 150 μL do vírus padrão na monocamada celular, previamente preparada em garrafa de cultura e adicionados 5 mL de DMEM sem SFB, sendo incubadas por 48 h a 37 °C em estufa contendo 5 % de CO_2 . Após o tempo de incubação, verificou-se a presença de efeito citopático (ECP) e as células infectadas foram submetidas a um ciclo de congelamento e

descongelamento. Após esse processo, foram feitas alíquotas do estoque viral em tubos *ependorf* com volume de 100 μL , as quais foram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.2.1 Titulação Viral

A titulação do vírus foi realizada em placa de 96 poços (Kasvi, China) na qual foram inoculadas 100 μL de suspensão de células Vero, com concentração entre 10^5 e 10^6 células mL^{-1} e incubadas por 48 h em estufa contendo 5 % de CO_2 a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, em atmosfera úmida para crescimento da monocamada celular. Após o tempo de crescimento, o meio de cultura foi descartado e foram adicionados 100 μL de DMEM sem SFB na placa. A partir da solução estoque do vírus, foram realizadas oito diluições em tubos *ependorf* contendo 450 μL de DMEM sem SFB, utilizando-se 50 μL para a diluição seriada. Após a diluição viral, foram inoculados 25 μL de cada diluição em seis poços da placa, a qual foi novamente incubada por 48 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, em atmosfera úmida com 5 % de CO_2 . Em todos os experimentos, foram realizados o controle de células como parâmetro de normalidade morfológica e metabólica. A presença ou ausência de infecção na cultura celular foi observada por meio do ECP em microscópio invertido, e seu $\text{TCID}_{50}\text{ mL}^{-1}$ (*Tissue Culture Infective Dose*) foi calculado de acordo com Reed e Muench (1938), em que a distância proporcional corresponde ao título que apresenta a menor diluição, a qual equivale a 50 % de inibição da replicação viral, conforme a equação abaixo.

$$\frac{(\% \text{ de mortalidade na diluição mais próxima acima de } 50\%) - (50\%)}{(\% \text{ de mortalidade na diluição mais próxima acima de } 50\%) - (\% \text{ de mortalidade na diluição mais próxima abaixo de } 50\%)} = \text{Distância proporcional}$$

4.2.3 Compostos utilizados no estudo

Os compostos 5,7-diidróxi-6-metilflavanona (C1), 5,7-diidróxi-8-metilflavanona (C2), 2,4-diidróxi-6'-metóxicalcona (C3) e 5,7-diidróxi-6,8-dimetilflavanona (C4) foram gentilmente cedidos pela professora doutora Claudia Andrea Lima Cardoso da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS). Todos os compostos foram obtidos a partir das folhas da espécie *Campomanesia adamantium* (guavira) e as etapas de isolamento dos compostos presentes nos extratos, a elucidação estrutural

por ressonância magnética nuclear (RMN) e a purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foram realizadas por Coutinho (2008). Segundo Coutinho (2008), o grau de pureza dos compostos C1, C2, C3 e C4 variou entre 91 % e 93 %. A partir dos dados estruturais identificados por RMN, foram obtidas as massas monoisotópicas de cada composto, além de suas estruturas moleculares em 3D por meio do banco de dados *ChemSpider*. Adicionalmente, os compostos C1, C2, C3 e C4 foram analisados em espectrômetro de massas do tipo Microtof Q III (Brucker Daltonics), pela técnica de ionização por *electrospray* (ESI), para avaliar o grau de pureza. A chalcona cardamonina foi sintetizada em laboratório (Sigma-Aldrich) e adquirida pelo laboratório de virologia da Universidade Católica de Brasília (UCB). A molécula gerada possui pureza de 99,7 %.

4.2.4 Ensaio de viabilidade celular

Para se definir a concentração máxima não tóxica (CMNT) utilizada em cultura celular, foram realizadas diluições seriadas dos compostos C1, C2, C3 e C4 ($1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $31,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $15,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e da chalcona cardamonina ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $6,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $3,125 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em DMEM sem SFB. As diferentes concentrações de cada composto foram inoculadas em placa de 96 poços, com monocamada celular previamente preparada em quadruplicata. Após o inóculo, as células Vero foram incubadas por 48 h em estufa contendo 5 % de CO_2 , a 37°C , em atmosfera úmida. Após a incubação foi realizada a avaliação da viabilidade celular por meio da técnica de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium), conforme descrito por Mosmann (1983). Na placa previamente inoculada com as células Vero e os compostos em diferentes concentrações, foram adicionados em todos os poços 20 μL de MTT (Sigma-Aldrich, EUA) a 5 mg mL^{-1} . A placa foi incubada por 3 h em estufa a 37°C , contendo 5 % de CO_2 . Após a incubação, o meio foi descartado juntamente com o MTT e foram adicionados 100 μL de DMSO (Sigma-Aldrich, EUA) em cada poço. Após a adição do DMSO, a placa foi armazenada em temperatura ambiente por 15 a 20 min para a solubilização dos cristais de formazan, cuja conversão foi realizada pelas desidrogenases mitocondriais das células viáveis. Por fim, foi realizada a leitura da absorbância em uma leitora de microplacas, a 490 nm (TAKEUCHI; BABA; SHIGETA, 1991, com modificações). A viabilidade celular foi

calculada pela razão entre a média da absorbância dos poços contendo os compostos e a média da absorbância do controle de células. A partir disso, definiu-se a CMNT como a concentração correspondente a 80 % de viabilidade celular (CC₂₀), além disso, também foi definida a concentração em que 50 % das células apresentaram viabilidade (CC₅₀).

4.2.5 Ensaio antiviral

Partindo da CMNT definida de acordo com o item 4.2.4, foram realizadas diluições seriadas a fim de se obter cinco concentrações dos compostos C1, C2, C3, C4 e da cardamonina, conforme descrito na tabela 3. No primeiro tubo, foram preparadas soluções de 2 mL dos compostos em DMEM sem SFB. Nos outros quatro tubos *ependorf* foi adicionado 1 mL desse meio, e a diluição foi realizada partindo de 1 mL do primeiro tubo.

Tabela 3. Ensaio antiviral. A tabela descreve as cinco concentrações utilizadas para os compostos C1, C2, C3, C4 e para a cardamonina nos ensaios antivirais contra o *Human alphaherpesvirus 1* (HHV-1).

Compostos testados	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)				
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a
C1	250	125	65,5	31,3	15,6
C2	30,0	20,0	10,0	5,0	2,5
C3	125	62,5	31,3	15,6	7,9
C4	125	62,5	31,3	15,6	7,9
cardamonina	25,0	12,5	6,2	3,1	1,6

Para o ensaio antiviral, foram inoculados 1 mL de células Vero com concentração entre 10^5 e 10^6 células mL^{-1} em uma placa de 24 poços, a qual foi incubada em atmosfera úmida por 48 h a 37 °C com 5 % de CO₂. Após o tempo de incubação, o meio de cultura foi descartado e as células foram tratadas com 1 mL de cada concentração dos compostos previamente diluídos e 100 μL da suspensão viral a 100 TCID₅₀, com exceção dos poços com controle de células e controle de vírus. Após o inóculo, a placa foi incubada novamente em estufa por 48 h e após a análise do ECP, foi submetida a um ciclo de congelamento e descongelamento para a lise das células e liberação das partículas virais no sobrenadante.

4.2.5.1 Ensaio de redução do título viral

O método de redução do título viral foi utilizado para inferir a atividade antiviral *in vitro* dos compostos estudados. Após o descongelamento da placa de 24 poços, foram feitas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-7}) do sobrenadante de cada poço contendo os compostos C1, C2, C3, C4 e a cardamonina e do controle de vírus, utilizando-se o DMEM sem SFB como diluente. Cada diluição foi inoculada em monocamadas de células Vero previamente preparadas em placas de 96 poços, nas quais foram adicionados 100 μ L do meio de manutenção e 25 μ L de cada diluição dos compostos em seis poços da placa. Em todas as microplacas, a última linha foi reservada para o controle, contendo apenas a monocamada celular e meio de manutenção. Após o inóculo, as microplacas foram incubadas por 48 h a 37 °C em estufa contendo 5 % de CO₂. A leitura e o cálculo do título viral foram realizados de acordo com a metodologia de Reed e Muench (1938), conforme descrito no item 4.2.2.1. A partir desses títulos, inferiu-se o grau de atividade antiviral, por meio do índice de inibição viral (IIV) e porcentagem de inibição (PI). O valor do IIV foi calculado segundo a fórmula proposta por Lagrota (1978):

$$\text{IIV} = B - A$$

na qual B corresponde ao título viral na cultura de células não tratadas (controle de vírus) e A corresponde ao título do vírus na cultura celular tratada.

A PI foi obtida de acordo com a fórmula proposta por Nishimura; Toku; Fukuyashu (1977):

$$\text{PI} = [1 - (\text{antilog T} / \text{antilog C})] \times 100$$

em que T corresponde às unidades infecciosas nas culturas de células tratadas e C corresponde às mesmas unidades em células não tratadas (controle de vírus).

4.2.5.2 Curva dose-resposta e determinação do índice de seletividade

As curvas dose-resposta demonstram o efeito dos compostos testados (PI) em função de sua concentração (log), sobre a replicação do HHV-1 em cultura de células Vero. A partir desses dados, determinou-se a concentração dos compostos capaz de inibir 50 % da replicação viral (CE₅₀) e o índice de seletividade (IS = CC₅₀/CE₅₀). O IS é utilizado para estimar a segurança de um fármaco e quanto maior o valor deste,

maior a diferença entre a dose efetiva para reduzir a replicação viral (CE_{50}) e a dose capaz de causar toxicidade (CC_{50}). Considera-se um bom perfil de segurança quando o composto apresenta valor de IS acima ou igual a 10 (DEZENGRINI et al., 2010; TAMARGO; LE HEUZEY; MABO, 2015).

4.2.6 Avaliação do efeito sobre o ciclo replicativo viral (*time of addition assay*)

Após a verificação dos espectros de massas, a realização do ensaio de viabilidade celular e dos ensaios antivirais, a chalcona cardamonina foi selecionada para os ensaios por tempo de adição (*time of addition assay*), nos quais foram avaliados os possíveis efeitos dessa molécula sobre as diferentes etapas do ciclo replicativo do HHV-1.

4.2.6.1 Ensaio de inibição da adsorção viral

O início da infecção pelo HHV-1 ocorre com a adsorção viral, na qual as partículas virais interagem com os receptores da célula hospedeira. Para inferir a possível ação da cardamonina sobre a adsorção viral, as monocamadas de células Vero previamente preparadas em placas de 24 poços, foram mantidas em contato com a solução da molécula na CMNT ($25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), por 1 h a 4°C . Após esse período, o sobrenadante foi descartado, os poços foram lavados com DMEM sem SFB frio e foram adicionados $100 \mu\text{L}$ da suspensão viral a 100TCID_{50} às células tratadas e não tratadas. As placas foram incubadas a 37°C por 48 h e depois congeladas, conforme protocolo modificado de Martins et al. (2009). Após o descongelamento, a replicação viral foi avaliada conforme descrito no item 4.2.2.1.

4.2.6.2 Ensaio de inibição da penetração viral

Para verificar a possível ação da cardamonina sobre a etapa de penetração viral em cultura celular, foram inoculados $100 \mu\text{L}$ da suspensão viral a 100TCID_{50} em monocamadas de células confluentes, previamente preparadas em placas de 24 poços e incubadas por 1 h a 4°C . Após o tempo de adsorção, as células foram lavadas com DMEM sem SFB, tratadas com 1 mL da solução da cardamonina na CMNT

(25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e novamente incubadas por 1 h a 37 °C. Posteriormente, uma nova lavagem foi realizada e o DMEM sem SFB foi adicionado às placas, as quais foram incubadas a 37 °C por 48 h em atmosfera úmida com 5 % de CO_2 . As placas foram submetidas a um ciclo de congelamento e descongelamento, conforme protocolo modificado de Martins et al. (2009). A avaliação da replicação viral foi realizada de acordo com o item 4.2.2.1.

4.2.6.3 Ensaio de ação intracelular

Para inferir se a cardamonina possui atividade sobre alguma etapa da biossíntese viral, monocamadas de células Vero previamente preparadas em placas de 24 poços, foram mantidas em contato com as suspensões virais (100 TCID₅₀) por 1 h a 4 °C. Em seguida, as células foram lavadas e novamente incubadas com DMEM sem SFB por 1 h a 37 °C. Após esse período, as células foram tratadas com 1 mL da solução da cardamonina na CMNT (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e incubadas por 18 h a 37 °C (os poços controle foram mantidos apenas com o meio de manutenção). Além dos controles de células e de vírus, o aciclovir (20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foi utilizado como controle positivo do ensaio. Por fim, as células foram lavadas e incubadas com DMEM sem SFB por 24 h a 37 °C em atmosfera úmida e congeladas após esse período, conforme protocolo modificado de Martins et al. (2009). Dado o descongelamento, a titulação viral foi avaliada conforme o item 4.2.2.1.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Análise dos compostos isolados de *Campomanesia adamantium* por espectrometria de massas (ESI)

A espectrometria de massas pela técnica de ionização por *electrospray* (ESI) foi realizada com os compostos C1, C2, C3 e C4, para confirmação de sua pureza. Na tabela 4 estão descritas as massas monoisotópicas esperadas para cada composto, bem como suas estruturas moleculares em 3D geradas pelo banco de dados *ChemSpider*. De acordo com os resultados obtidos, os compostos C1 (Figura 6A) e C3 (Figura 6C), apresentaram massas de 285.11 para os íons de maior intensidade, as quais não coincidem com a massa monoisotópica de 270.08 esperada para ambas as moléculas. O mesmo ocorreu para a molécula C2 (Figura 6B). Entretanto, o íon de massa 415.22 observado para esta molécula, apresentou maior intensidade.

O espectro obtido para o composto C4 (Figura 6D) foi o único em que a massa esperada para esta molécula pode ser observada. Entretanto, a intensidade do íon de massa 285.12 foi muito baixa. O íon de maior intensidade observado no espectro (79.02) coincide com a massa do solvente dimetilsulfóxido (DMSO), o qual foi utilizado no preparo dos compostos.

As análises dos espectros de massas dos compostos C1, C2, C3 e C4 foram realizadas no decorrer dos ensaios antivirais. Após a verificação da possível contaminação desses compostos, os ensaios antivirais foram interrompidos e foi dado continuidade apenas aos ensaios com a chalcona cardamonina, cujo espectro de massas pode ser verificado no anexo A.

Tabela 4. Compostos C1, C2, C3 e C4 isolados a partir das folhas da espécie *Campomanesia adamantium* (Coutinho, 2008). As estruturas moleculares em 3D, bem como as massas monoisotópicas foram obtidas por meio da base de dados *ChemSpider*.

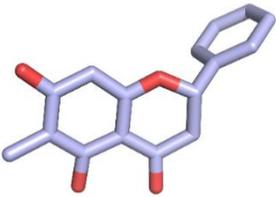
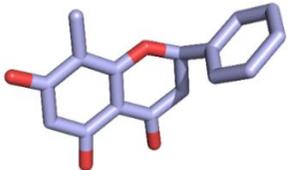
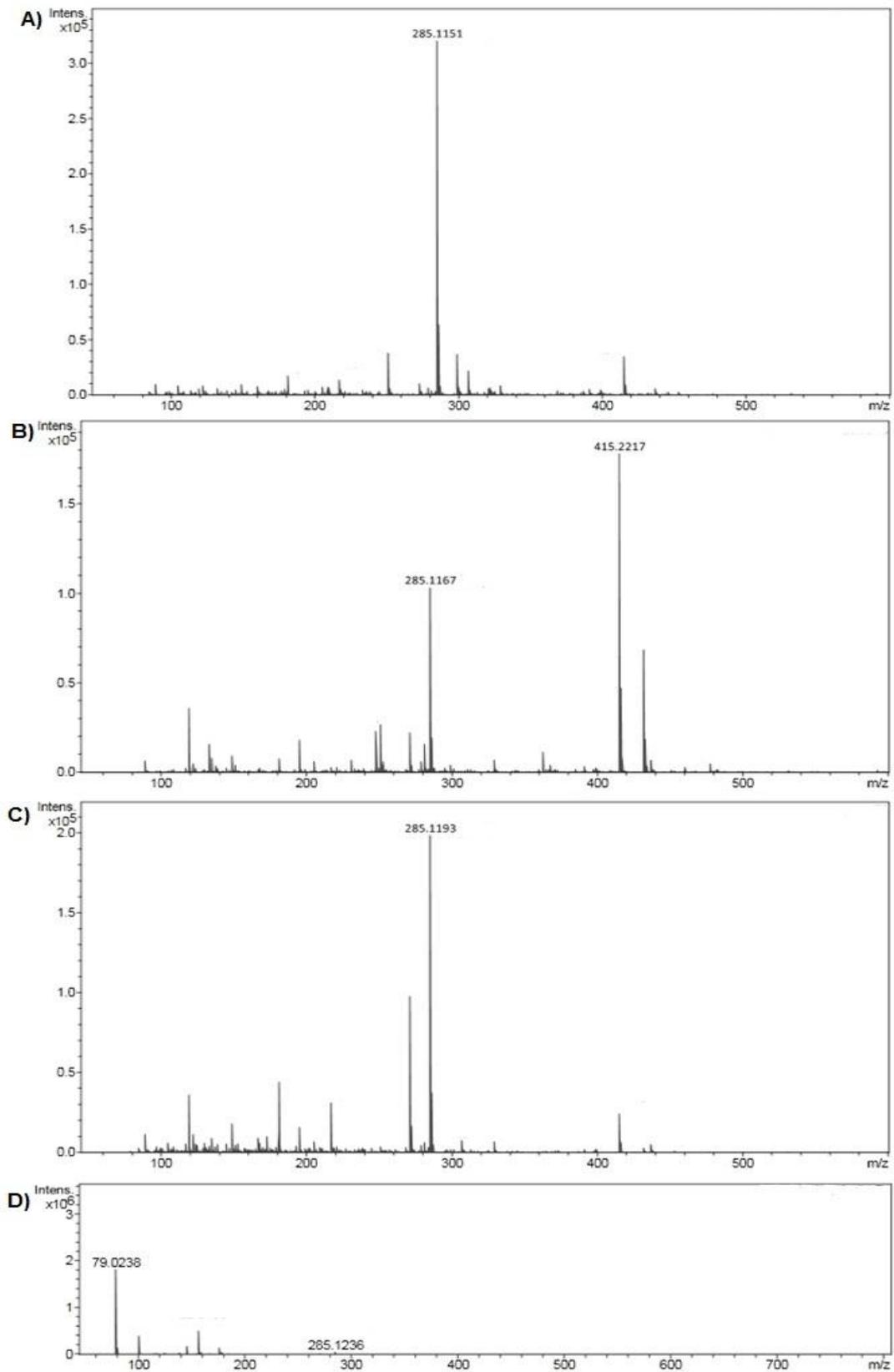
Compostos testados	Nomenclatura química	Estrutura molecular	Massa monoisotópica esperada (Da)
C1	5,7-diidróxi-6-metilflavanona		270.08
C2	5,7-diidróxi-8-metilflavanona		270.08
C3	2,4-diidróxi-6'-metóxichalcona		270.08
C4	5,7-diidróxi-6,8-dimetilflavanona		285.10

Figura 6. Espectrometria de massas pela técnica de ionização por *electrospray* dos compostos C1 (A), C2 (B), C3 (C) e C4 (D).



4.3.2 Ensaio de viabilidade celular

Previamente ao ensaio antiviral, foram determinadas as concentrações máximas não tóxicas (CMNT) dos compostos C1, C2, C3, C4 e da cardamonina em cultura de células Vero, considerando a presença de pelo menos 80 % de viabilidade celular. O ensaio com o composto C1 demonstrou viabilidade celular acima de 80 % nas concentrações menores que 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, com diferença estatística nas duas maiores concentrações (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), comparadas ao controle não tratado (Figura 7A). A cardamonina apresentou toxicidade para as células Vero nas três maiores concentrações utilizadas (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e portanto, a CMNT foi definida como 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 7E). Dentre todos os compostos testados, o C2 apresentou maior toxicidade em cultura celular, com diferença estatística nas concentrações maiores que 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Dessa forma, a CMNT definida foi de 31,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 7B).

De acordo com os resultados obtidos, os perfis dos compostos C3 e C4 foram semelhantes, apresentando citotoxicidade acima de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Entretanto, o composto C4 apresentou uma variação na concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a qual não apresentou toxicidade comparada ao controle não tratado. Apesar dessa variação, a CMNT considerada para ambos os compostos foi de 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 7C e 7D).

No ensaio de viabilidade celular, também foram definidas as concentrações dos compostos em que houve redução de 50 % da viabilidade celular (CC_{50}). Na tabela 5 estão descritos os valores da CMNT e CC_{50} definidos para cada composto, bem como a concentração inicial utilizada no ensaio. Os compostos C1 e C4 apresentaram 80 % de viabilidade celular nas concentrações menores que 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e por esse motivo, considerou-se um valor acima de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ como CC_{50} desta molécula

Figura 7. Ensaio de viabilidade celular dos compostos C1 (A), C2 (B), C3 (C), C4 (D) e da cardamonina (E). Foram avaliados os perfis de citotoxicidade de cada composto em células Vero após 48 h de tratamento em diferentes concentrações pela técnica de MTT. Os valores representam as médias \pm desvio padrão (DP, n=4) e foram analisados pelo one-way ANOVA e teste de Dunnett, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, comparando ao grupo não tratado (NT).

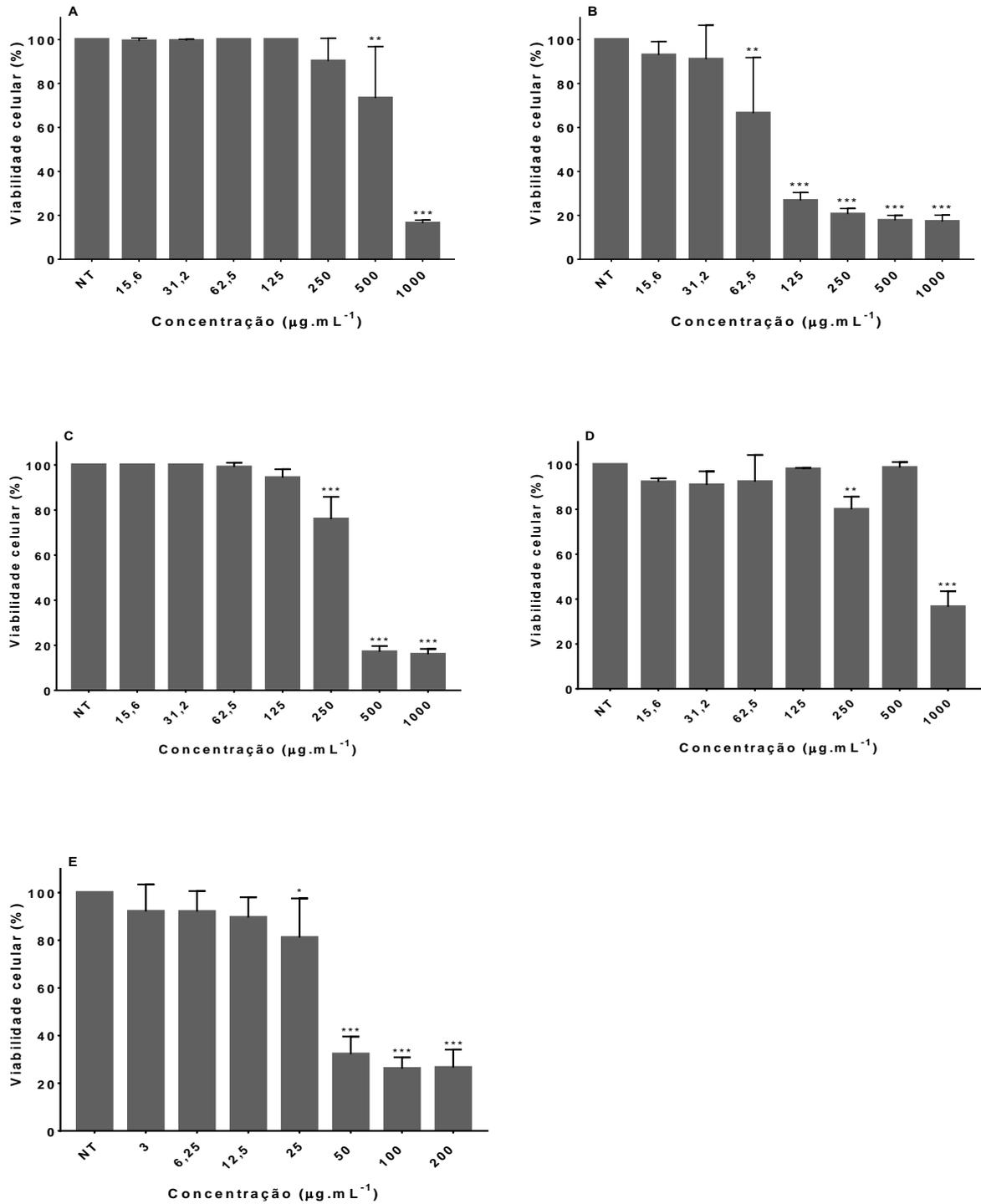


Tabela 5. Ensaio de viabilidade celular. A tabela descreve os valores da CMNT e CC₅₀ definidos para os compostos C1, C2, C3, C4 e da cardamonina, bem como a concentração inicial utilizada no ensaio.

Compostos testados	Concentração inicial ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CMNT ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CC ₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
C1	1000	250	> 500
C2	1000	31,2	71,2
C3	1000	125	290
C4	1000	125	> 500
cardamonina	200	25,0	32,7

CMNT: concentração máxima não tóxica; CC₅₀: concentração citotóxica em que houve redução de 50 % da viabilidade celular.

4.3.3 Ensaio antiviral

Após a determinação das CMNTs dos compostos C1, C2, C3, C4 e da cardamonina, os mesmos foram avaliados em relação à sua atividade inibitória *in vitro* contra o HHV-1. Este efeito foi expresso pelo índice de inibição viral (IIV) de acordo com o método de Reed e Muench (1938) e pelo percentual de inibição (PI) calculado pela fórmula proposta por Nishimura, Toku e Fukuyashu (1977). De acordo com os dados obtidos, o composto C1 apresentou PI de 99,9% na maior concentração testada ($250 \mu\text{g.mL}^{-1}$), reduzindo para 81,8 % e 42,5 % nas concentrações subsequentes ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $65,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Nas duas últimas concentrações ($31,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $15,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$), não foi observado inibição da replicação viral (Figura 8A). Para o composto C2 (Figura 8B), foram obtidas PI acima de 90 % nas quatro primeiras concentrações testadas ($30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e ausência de inibição viral na última concentração ($2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$). O composto C3 (Figura 8C) apresentou um perfil de inibição semelhante em concentrações maiores, com PI acima de 90 % em todas as concentrações testadas ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $7,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

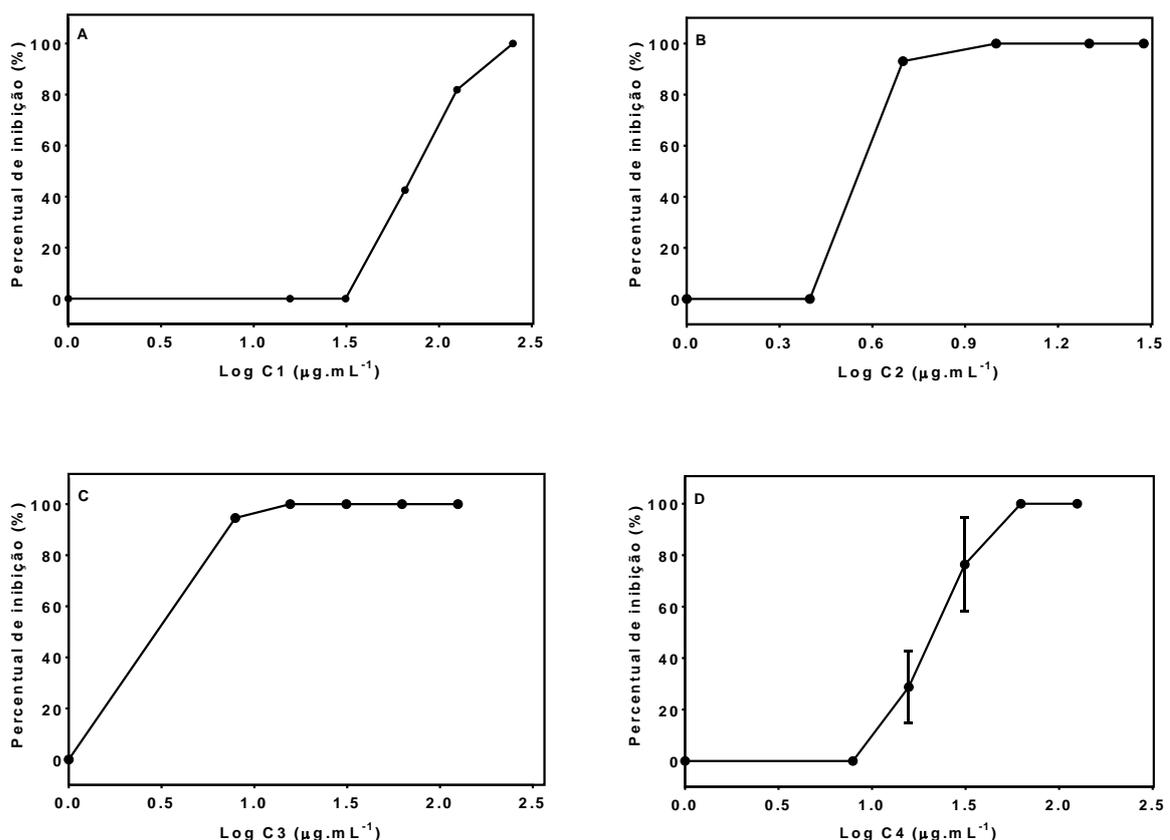
O composto C4 apresentou PI de 99,9 % nas duas maiores concentrações testadas ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Entretanto, houve alta variabilidade entre os valores obtidos nas concentrações subsequentes, com a PI oscilando de 58,1 % a 94,5 % ($31,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e de 14,6 % a 42,8 % ($15,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Na última concentração testada ($7,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$), não foi observado inibição da replicação viral (Figura 8D).

Conforme os resultados apresentados, todos os compostos testados apresentaram inibição da replicação viral em suas CMNTs. Entretanto, seriam

necessárias réplicas dos ensaios antivirais para definir a concentração capaz de inibir 50 % da replicação viral (CE_{50}), bem como para avaliar o perfil de segurança dos compostos C1, C2 e C3 por meio do índice de seletividade (IS).

Dentre os quatro compostos oriundos da *Campomanesia adamantium*, foram realizadas réplicas biológicas do ensaio antiviral apenas para C4, pois no decorrer dos ensaios, verificou-se que esses compostos não estavam puros, interferindo na confiabilidade dos dados, de acordo com os resultados descritos no item 4.3.1. Dessa forma, o cálculo do CE_{50} foi realizado apenas para C4, para o qual inferiu-se um IS acima de 23,5 (tabela 6)

Figura 8. Ensaio antiviral dos compostos oriundos da *Campomanesia adamantium*, contra o HHV-1. Os resultados foram expressos em percentual de inibição (PI), pelo log da concentração de cada composto ($\mu\text{g.mL}^{-1}$). As curvas dose-resposta dos compostos C1 (A), C2 (B) e C3 (C) foram realizadas com apenas uma réplica biológica. Para o composto C4 (D), os valores do PI representam as médias \pm desvio padrão (DP, $n=3$) e o CE_{50} foi calculado por regressão não linear. CE_{50} : concentração efetiva capaz de inibir 50 % da replicação viral. HHV-1: *Human alphaherpesvirus 1*.



Nos ensaios antivirais realizados com a cardamonina (Figura 9), observou-se significativa inibição da replicação viral nas três maiores concentrações ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $6,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), com PI acima de 90 %. Nas duas menores

concentrações testadas ($3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$) a PI obtida foi de 85,9 % e 63,4%, respectivamente. Apesar dos valores obtidos na curva dose-resposta, a variação nos resultados das réplicas para essa molécula foi alta, especialmente nas duas últimas concentrações ($3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$), em que os valores de PI podem variar de 70 % a 100 % e de 48,1 % a 78,7 %, respectivamente.

A partir da curva dose-resposta da cardamonina, foi determinado o CE_{50} , por regressão não linear, e o valor do IS, o qual deve ser maior ou igual a 10 para que a molécula tenha um bom perfil de segurança. Devido à variabilidade nos resultados entre réplicas biológicas dessa molécula, inferiu-se um valor aproximado de IS em torno de 21,8. Na tabela 6, estão descritos o CE_{50} e o IS da cardamonina, bem como o IIV e PI referente à CMNT utilizada no ensaio antiviral.

Figura 9. Ensaio antiviral. O efeito inibitório *in vitro* da cardamonina contra a replicação do HHV-1 foi expresso em percentual de inibição (PI) pelo log da concentração utilizada no ensaio. A análise dos dados foi realizada por regressão não linear para inferir o CE_{50} . Os valores do PI representam as médias \pm desvio padrão (DP, $n=3$). CE_{50} : concentração efetiva capaz de inibir 50 % da replicação viral em cultura celular. HHV-1: *Human alphaherpesvirus 1*.

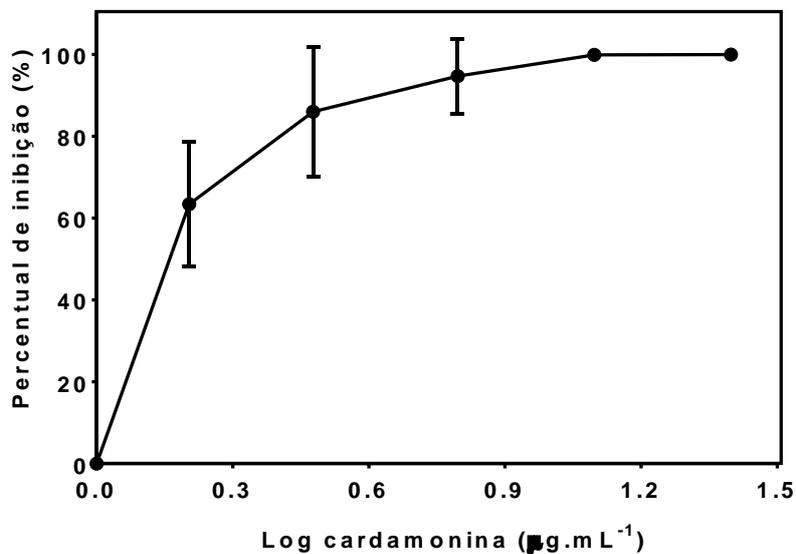


Tabela 6. Ensaio antiviral do composto C4 e da cardamonina contra o HHV-1. Na tabela estão descritos os valores do IIV e PI referentes à CMNT utilizada no ensaio, bem como o CE_{50} definido a partir das curvas dose-resposta por regressão não linear e o IS. HHV-1: *Human alphaherpesvirus 1*.

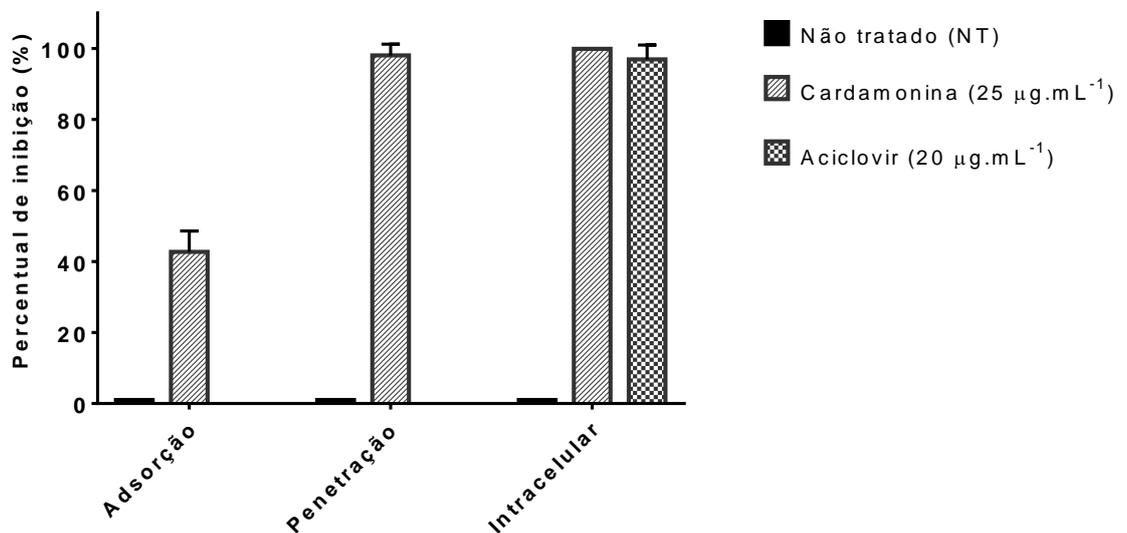
Composto testado	CMNT ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	IIV	PI (%)	CE_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	IS
C4	125	3,06	99,9	21,3	> 23,5
cardamonina	25,0	2,87	99,9	1,5	21,8

CMNT: concentração máxima não tóxica; IIV: índice de inibição viral; PI: percentual de inibição; CE_{50} : concentração efetiva capaz de inibir 50 % da replicação viral; IS: índice de seletividade.

4.3.4 Avaliação do efeito sobre o ciclo replicativo viral (*time of addition assay*)

Em virtude da ação inibitória apresentada pela cardamonina no ensaio antiviral, essa molécula foi selecionada para os ensaios por tempo de adição (*time of addition assay*), nos quais foram analisados os possíveis efeitos dessa molécula sobre as diferentes etapas do ciclo replicativo do HHV-1 (Figura 10). De acordo com os resultados obtidos, foi observada ação significativa da cardamonina sobre a replicação do HHV-1 no ensaio de inibição da penetração viral (98 % de inibição), comparado ao controle não tratado (NT). No ensaio de ação intracelular, a cardamonina apresentou inibição viral semelhante ao aciclovir (20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), com PI de 99,9 %. Entretanto, a atividade observada sobre a etapa de adsorção viral foi inferior, com PI de 42,7 %.

Figura 10. Ensaio de efeito por tempo de adição (*time of addition assay*) da cardamonina em sua CMNT, sobre o ciclo replicativo do HHV-1. A ação da molécula foi avaliada nas etapas de adsorção, penetração e durante a biossíntese viral, comparada ao controle não tratado. O aciclovir foi utilizado como controle positivo do ensaio intracelular. Os valores representam as médias \pm desvio padrão (DP, n=3). HHV-1: *Human alphaherpesvirus 1*.



5 CAPÍTULO 2: PEPTÍDEOS DE DEFESA DO HOSPEDEIRO COM POTENCIAL AÇÃO ANTIVIRAL

5.1 INTRODUÇÃO

Os peptídeos de defesa do hospedeiro (PDHs) são moléculas evolutivamente conservadas, expressas em todos os organismos multicelulares e são componentes essenciais do sistema imune inato, atuando na defesa contra inflamações e infecções microbianas (MANSOUR; FUENTE-NÚÑEZ; HANCOCK, 2015; PACHÓN-IBÁÑES et al., 2017). Até hoje, foram descritos mais de 2600 PDHs, com uma grande variabilidade de sequências e estruturas mesmo entre espécies de mamíferos, entretanto algumas propriedades essenciais para a função dos PDHs são conservadas. Esses peptídeos são relativamente pequenos, variando de 12 a 50 resíduos de aminoácidos, apresentam característica catiônica devido ao excesso de resíduos de lisina e arginina e tendem a adquirir estrutura anfipática em meio hidrofóbico, facilitando a interação dessas moléculas com membranas negativamente carregadas (SILVA et al., 2018).

Os PDHs apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo ação antimicrobiana direta contra bactérias, fungos e vírus, bem como atividade antibiofilme (SUN et al., 2018). Entretanto, foi observado que em concentrações fisiológicas de sódio, proteínas séricas ou lipoproteínas, a ação antimicrobiana desses peptídeos é consideravelmente reduzida, sugerindo que esta não é sua única função. Diante disso, foi estabelecido que além de seus efeitos em células bacterianas, os PDHs desempenham atividade imunomodulatória por meio de vários mecanismos, como o recrutamento e ativação de células imunes, angiogênese, modulação da resposta imune e reparo tecidual (HANCOCK; HANEY; GILL, 2016; MANSOUR; FUENTE-NÚÑEZ; HANCOCK, 2015).

Esses peptídeos desempenham funções de proteção do hospedeiro e podem ser produzidos mediante estímulos específicos ou de forma contínua. Além disso, PDHs com diferentes funções e especificidades podem ser produzidos simultaneamente, exercendo efeito sinérgico e neutralizando a infecção. Os humanos expressam apenas um peptídeo da família das catelecidinas (LL-37) por exemplo, e pelo menos dez peptídeos da família das defensinas, os quais são sintetizados por diversos tipos de células (SHARTOUNY; JACOB, 2018).

Desde a década de 1980, diversos PDHs tem sido isolados de fontes variadas, verificando-se um vasto espectro de atividades contra patógenos em um mesmo peptídeo, devido à sua promiscuidade (FINDLAY; CURRIE; DAVIDSON, 2013; GALDIERO et al., 2013). O primeiro estudo relacionado à atividade antiviral dos PDHs foi publicado em 1986, o qual demonstrou a ação da defensina HNP1, produzida por neutrófilos humanos, na inativação direta de diversos vírus, incluindo o HHV tipos 1 e 2, o citomegalovírus e o vírus influenza (DAHER; SELSTED; LEHRER, 1986). Desde então, outros estudos vêm buscando as propriedades antivirais dos PDHs, ampliando sua caracterização além da função antibacteriana, que tem sido extensivamente estudada. Apesar dos diversos exemplos de peptídeos antivirais presentes na literatura (Tabela 7), existem poucos estudos *in vivo*, sendo a maioria deles realizado apenas em cultura celular e além disso, seus mecanismos de ação são pouco conhecidos (FINDLAY; CURRIE; DAVIDSON, 2013; SHARTOUNY; JACOB, 2018).

Em relação à atividade antimicrobiana, um dos mecanismos dos PDHs envolve a interação e o rompimento da membrana bacteriana, sem causar toxicidade celular devido à sua capacidade de distinguir a superfície celular procariótica da eucariótica, por meio de interações eletrostáticas. Esse mecanismo também se aplica no caso de vírus envelopados, cuja interferência na bicamada lipídica do envelope leva à neutralização desse patógeno, impedindo sua entrada na célula (PACHÓN-IBÁÑES et al., 2017; SUN et al., 2018).

A capacidade de alguns peptídeos em causar inativação direta das partículas virais sem causar toxicidade à célula hospedeira pode ser explicada pela diferença entre o envelope viral e a membrana celular. Apesar de os vírus adquirirem seu envelope a partir da membrana celular, estes se diferem pela presença de proteínas e lipídeos de superfície virais, uma vez que o brotamento das partículas necessita do transporte e montagem de componentes essenciais, como as proteínas estruturais por exemplo, no local de brotamento, induzindo a formação do envelope e liberação da partícula infecciosa (LORIZATE; KRAUSSLICH, 2011).

A ação de defensinas na bicamada lipídica viral, depende de sua composição, sendo favorecida pela presença de fosfolipídeos com carga negativa, enquanto bicamadas neutras geralmente não sofrem ação desses peptídeos (WILSON; WIENS; SMITH, 2013). Um exemplo de peptídeo com ação direta no envelope viral é a caerina 1.9, isolada da pele de anfíbios, a qual demonstrou ação no envelope do vírus HIV, inibindo sua replicação sem causar toxicidade aos linfócitos T (VANCOMPENOLLE

et al., 2005). A indolicidina, sintetizada em neutrófilos bovinos, apresentou ação virucida, além de uma potente inativação do HHV-1 e HHV-2, reduzindo sua infectividade em mais de 99% para ambos os vírus (MATANIC; CASTILLA, 2004; YASIN et al., 2000). Outro exemplo de peptídeos com ação virucida, são os derivados de plantas ou ciclotídeos, os quais são capazes de interagir com o envelope lipídico causando seu rompimento e consequente destruição da partícula viral (HENRIQUES; CRAIK, 2010; NAWAE; HANNONGBUA; RUENGJITCHATCHAWALYA, 2017).

Outro possível mecanismo de neutralização viral consiste na inibição da adsorção do vírus aos receptores da célula hospedeira. Um estudo realizado por Wang e colaboradores (2004), demonstrou a ação de α -defensinas humanas (HNP1-4) e retrociclina contra o HIV, por meio da ligação à proteína gp120, bem como ao CD4 nas células T, impedindo a interação entre este receptor e a proteína viral. Outro estudo sobre a ação de defensinas humanas (HNP1-4, HD5, HD6 e hBD3) contra o HHV, demonstrou que esses peptídeos são capazes de se ligar às glicoproteínas gB e SH impedindo a entrada do vírus na célula hospedeira, além de prevenir a infecção genital pelo HHV-2, uma vez que o peptídeo HD5 também é produzido pelas células epiteliais do trato vaginal (HAZRATI et al., 2006).

Após a adsorção, os vírus envelopados induzem a fusão do envelope à membrana celular, de modo a liberar seu genoma no meio intracelular. Alguns peptídeos são capazes de inibir este processo, como o HNP-1 que inibe a fusão do HIV-1, mediada pela proteína gp41. A retrociclina 2 (RC2) e a β -defensina humana 3 (HBD3) também apresentaram ação contra o vírus da influenza aviária A (AIV-A), bloqueando a sua fusão com a membrana celular e criando uma rede de glicoproteínas imobilizadas nas superfícies virais e celulares, impedindo a fusão e penetração viral (LEIKINA et al., 2005). No caso de vírus não envelopados, como o adenovírus humano (HAdV) por exemplo, as α -defensinas (HNP1 e HD5) agem estabilizando o capsídeo viral, impedindo a liberação da proteína VI essencial para a lise da membrana endossomal. Dessa forma, o vírus não consegue liberar o genoma no citoplasma celular para replicação (BUCK et al., 2006; SMITH; NEMEROW, 2008).

Uma vez infectadas, as células hospedeiras são utilizadas para a produção de novas partículas virais, abrigo todas as etapas da biossíntese viral, as quais são alvos propícios para ação de peptídeos (WILSON; WIENS; SMITH, 2013). A defensina HNP1, por exemplo, é capaz de bloquear a expressão gênica e a transcriptase reversa do HIV-1, impedindo a disseminação de novas partículas infecciosas. Um estudo

realizado por Hazrati e colaboradores (2006), demonstrou a ação pós penetração viral das defensinas HNP1 e HD5, as quais foram capazes de se acumular nas células epiteliais cervicais e se ligar ao genoma do HHV-2, sugerindo que esses peptídeos causam a inibição da expressão gênica viral.

As defensinas HNP1, HNP2 e HD5 também induziram a agregação das partículas virais do AIV-A, HAdV e do vírus BK (BKV) respectivamente, no meio extracelular, impedindo sua entrada na célula hospedeira. No caso do AIV-A, não foi definido se essa atividade é necessária para a inibição da infecção, de maneira similar ao HAdV, cuja agregação não foi suficiente para impedir a evolução da infecção. Entretanto, esse mecanismo foi essencial para bloquear a adsorção do vírus BK às células hospedeiras e neutralizar as partículas virais (DUGAN et al., 2008; WILSON; WIENS; SMITH, 2013).

Seguindo a variedade de mecanismos antivirais de peptídeos, alguns deles são capazes de atuar em diferentes momentos do ciclo de vida viral. No estudo de Hong e colaboradores, dois peptídeos encontrados no veneno de escorpião (Hp1036 e Hp1239) demonstraram potente atividade virucida contra o HHV-1, bem como inibição da adsorção e penetração viral, além de ação na biossíntese viral após a infecção das células Vero, inativando as partículas virais intracelulares e impedindo sua proliferação (HONG et al., 2014). Outro estudo recente demonstrou a atividade inibitória dose-dependente do peptídeo Eval418, também purificado a partir do veneno de escorpião, contra o HHV-1. Os autores observaram que o peptídeo foi capaz de inibir a adsorção do vírus à célula hospedeira, entretanto o mesmo não ocorreu com a infecção estabelecida devido à sua baixa absorção celular. Diante disso, foram feitas modificações no peptídeo Eval418 por meio da inserção de resíduos de histidina, melhorando sua helicidade. Tal modificação originou o análogo Eval418-FH5, o qual além de apresentar uma menor toxicidade e potente inibição da adsorção viral, também apresentou atividade inibitória intracelular (ZENG et al., 2018).

Tabela 7. Exemplos de peptídeos com atividade antiviral descritos na literatura e seus possíveis mecanismos de ação.

Peptídeo	Origem	Vírus alvo	Mecanismo de inibição viral	Referências
Caerina 1.9	Pele de anfíbios.	HIV.	Virucida.	VANCOMPERNOLLE, 2005.
Indolicidina	Neutrófilos bovinos.	HHV-1, HHV-2.	Virucida.	CASTILLA, 2004; YASIN, 2000.
Kalata B1	<i>Oldenlandia affinis</i> .	HIV.	Virucida, inibição da fusão viral à membrana celular.	HENRIQUES; CRAIK, 2010; HENRIQUES et al., 2011.
HNP1	Leucócitos humanos.	HIV, HHV-1, HHV-2, HAdV, AIV-A, BKV.	Ação virucida, inibição da adsorção, penetração e inibição da expressão gênica viral.	WANG, 2004; HAZRATI, 2006.
HBD3	Leucócitos humanos.	AIV-A.	Inibição da adsorção e penetração viral.	LEIKINA, 2005.
HD5	Células de Paneth, células epiteliais do trato genital feminino.	HHV-2, HAdV, AIV-A, BKV.	Ação virucida e inibição da expressão gênica.	HAZRATI, 2006; SMITH, 2008; WILSON, 2013.
RC2	Leucócitos humanos.	IAV.	Inibição da adsorção e penetração.	LEIKINA, 2005.
Pa-MAP1	<i>Pleunorectus americanus</i> .	HHV-1, HHV-2.	Virucida.	MIGLIOLO et al., 2012; VILAS BOAS et al., 2017.
HS-1	<i>Hypsiboas semilineatus</i> .	DENV-2 e DENV-3.	Ação virucida e inibição da adsorção.	MONTEIRO et al., 2018.

Mastoparano 7	<i>Vespula lewisii.</i>	VZV.	Ação no envelope viral.	SAMPLE et al., 2013.
Temporina B	<i>Rana temporaria.</i>	HHV-1.	Virucida.	MARCOCCI et al., 2018.
Melitina	<i>Apis mellifera.</i>	HIV-1, HHV-1, HHV-2, JV.	Lise do envelope viral.	ALBIOL; CASTILLA, 2004; WACHINGER et al., 1998; GALDIERO et al., 2013.
Magainina 1 e 2	<i>Xenopus laevis.</i>	HHV-1, HHV-2.	Virucida.	ALBIOL; CASTILLA, 2004; EGAL et al., 1999.
Cecropina A	<i>Hyalophora cecropia.</i>	HIV, HHV-1, HHV-2, JV.	Inibição da expressão gênica.	WACHINGER et al., 1998; ALBIOL; CASTILLA, 2004.
Eva1418-FH5	<i>Euscorplops validus.</i>	HHV-1.	Inibição da adsorção viral e ação intracelular.	ZENG et al., 2018.
Hp1036 Hp1239	<i>Heterometrus petersii.</i>	HHV-1.	Ação virucida, inibição da adsorção e penetração, ação intracelular.	HONG, 2014.

HHV-1 – *Human alphaherpesvirus 1*; HHV-2 – *Human alphaherpesvirus 2*; HIV – vírus da imunodeficiência humana; HAdV – adenovírus humano; AIV-A – vírus da influenza aviária A; BKV – vírus BK; VZV – vírus varicela-zoster; HCV – vírus da hepatite C; DENV – dengue vírus; JV – junin vírus.

5.1.1 IDR-1018

O amplo espectro de funções desempenhadas pelos PDHs, levou ao desenvolvimento de análogos sintéticos denominados peptídeos reguladores de defesa inata (IDR), os quais foram gerados com melhor atividade biológica e citotoxicidade reduzida contra células de mamíferos. Além disso, esses peptídeos também regulam o efeito pró-inflamatório, prevenindo uma resposta imune exacerbada potencialmente prejudicial para o organismo (MANSOUR; FUENTE-NÚÑEZ; HANCOCK, 2015; NIYONSABA et al., 2013; PACHÓN-IBÁÑES et al., 2017).

Dentre os diversos IDRs desenvolvidos, está o peptídeo catiônico IDR-1018 (VRLIVAVRIWRR-NH₂), o qual foi sintetizado a partir da sequência de uma bacterecina isolada de neutrófilos bovinos (Bac2a) combinado a substituições pontuais e deleções, com o objetivo de tornar sua capacidade imunomodulatória superior à apresentada pela Bac2a. Os mecanismos de ação imunomodulatórios do IDR-1018 envolvem a regulação da expressão de citocinas inflamatórias, como o TNF- α , além da redução de mediadores pró-inflamatórios, bem como a modulação da diferenciação e ativação de macrófagos (M1 e M2) e neutrófilos (ACHTMAN et al., 2012; ANDRESEN; TENSION; HAURYLIUK, 2016; CHOE et al., 2015).

Um dos primeiros estudos realizados em relação à atividade imunomodulatória *in vivo* do IDR-1018, demonstrou a indução cicatricial de feridas, no qual observou-se um fechamento mais rápido das lesões em camundongos em relação ao veículo controle, sendo superior a outros peptídeos como a LL-37 (STEINSTRAESSER et al., 2012). O IDR-1018 também apresentou eficácia como terapia adjuvante contra malária cerebral em modelos animais, condição na qual acredita-se que a morte do hospedeiro ocorra devido à inflamação maciça nos tecidos cerebrais (ACHTMAN et al., 2012; MANSOUR; FUENTE-NÚÑEZ; HANCOCK, 2015; STEINSTRAESSER et al., 2012).

Outros estudos com esse peptídeo demonstraram atividade imunomodulatória em modelos animais infectados com microrganismos resistentes, incluindo o *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina, *Mycobacterium tuberculosis* e *Escherichia coli*. Adicionalmente, o IDR-1018 apresentou ação antifúngica contra *Candida albicans*, atividade antibiofilme e forte sinergismo com antibióticos convencionais, além da eliminação de biofilmes pré-existentes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*,

Staphylococcus aureus MRSA e *Salmonella. typhimurium* (FREITAS et al., 2017; MANSOUR; FUENTE-NÚÑEZ; HANCOCK, 2015; PACHÓN-IBÁÑES et al., 2017).

Em relação às propriedades antivirais do IDR-1018, Shestakov e colaboradores realizaram a avaliação de quatro peptídeos sintéticos (1002, 1006, 1018 e HH-2) contra o HHV-2, os quais demonstraram ação antiviral *in vitro* reduzindo a infecção viral em células Vero de forma dose-dependente. Nos ensaios de mecanismo de ação, os peptídeos apresentaram inibição da adsorção e da penetração, mas não tiveram ação intracelular, além disso também foram efetivos no teste contra o HHV-2 em sêmen humano. Além dos efeitos citados, o IDR-1018 também apresentou ação *in vivo*, em modelo murino de infecção genital, quando misturado com o vírus antes da administração, e mesmo diante de altas doses infectivas preveniu a disseminação viral e desenvolvimento da doença nesses animais (SHESTAKOV et al., 2013).

Os estudos relacionados às propriedades antivirais do IDR-1018 são escassos, se comparados à quantidade de trabalhos sobre a ação antibacteriana e imunomodulatória disponíveis na literatura. Além disso, a maioria dos trabalhos demonstrando a ação antiviral de PDHs naturais e sintéticos são realizados em sistema *ex vivo*, sendo de grande importância a realização de testes *in vivo* antes de extrapolar a ação de peptídeos sintéticos como potenciais microbicidas (SHESTAKOV et al., 2013).

5.1.2 DJK-6

Descrito pela primeira vez por Fuente-Núñez em 2015, o peptídeo DJK-6 possui 12 resíduos de aminoácidos (VQWRRIRVWVIR-NH₂) e foi desenhado com base nas propriedades inerentes ao IDR-1018 e outros peptídeos antimicrobianos estudados pelo referido pesquisador. Esse peptídeo consiste em um D-enantiômero resistente a proteases, com um grande espectro de ação antibiofilme, apresentando um potencial dez vezes maior que outros peptídeos previamente identificados. O desenvolvimento de peptídeos D-enantiômeros pode ser utilizado para evitar a resistência adquirida por bactérias contra os PDHs, devido a sua suscetibilidade à degradação por proteases bacterianas ou proteases do hospedeiro presentes nos sítios de infecção (FUENTE-NÚÑEZ et al., 2015; RIBEIRO et al., 2015; SHARTOUNY; JACOB, 2018).

O DJK-6 e seu similar DJK-5, demonstraram melhora da atividade dos antibióticos β -lactâmicos meropenem, imipenem e cefepime na prevenção da formação de biofilme pela *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase. Além disso, a combinação desse peptídeo com o meropenem foi capaz de destruir biofilmes previamente formados desses isolados clínicos. Esses peptídeos também demonstraram atividade *in vitro* contra infecção por *Pseudomonas aeruginosa* em organismos invertebrados (FUENTE-NÚÑEZ et al., 2015; RIBEIRO et al., 2015). Apesar dos estudos citados, não há dados na literatura sobre a ação antiviral do DJK-6.

5.2 METODOLOGIA

Os materiais, reagentes e suplementos utilizados no cultivo de células Vero, bem como as condições em que este foi realizado, estão descritos na metodologia capítulo 1, item 1.1. Da mesma forma, a multiplicação e preparo do estoque viral, bem como a titulação do HHV-1 foram realizadas de acordo com a metodologia descrita no capítulo 1, item 4.2.

5.2.1 Peptídeos utilizados no estudo

Os peptídeos IDR-1018 e DJK-6 foram sintetizados em laboratório (Aminotech, Brasil) e adquiridos pelo Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas da Universidade Católica de Brasília (CAPB). Para confirmação da pureza, foi realizada a determinação das massas moleculares por espectrômetro de massa do tipo MALDI ToF/ ToF Ultraflex III (Bruker Daltonics) (Anexo B). A quantificação do peptídeo DJK-6 foi realizada de acordo com a metodologia de Murphy e Kies (1960) e para a quantificação do peptídeo IDR-1018, foi realizada leitura na faixa de λ 280 nm e uso de extinção molar como fator de conversão obtido por meio da ferramenta *Expsasy Protparam*.

5.2.2 Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado para se definir a concentração máxima não tóxica (CMNT) dos peptídeos IDR-1018 E DJK-6 em cultura de células Vero. Dessa forma, foram realizadas diluições seriadas de ambos os peptídeos em DMEM sem SFB, nas concentrações de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 6,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 3,125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As diferentes concentrações de cada molécula, foram inoculadas em placa de 96 poços, com monocamada de células Vero previamente preparada, em quadruplicata. Após o inóculo, as células foram incubadas por 48 h em estufa contendo 5 % de CO_2 , a 37 °C, em atmosfera úmida. Após o tempo de incubação, foi realizada a avaliação da viabilidade celular por meio da técnica de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium), conforme descrito por Mosmann (1983). Na placa previamente inoculada com as células Vero e os peptídeos IDR-1018 E DJK-6 em diferentes concentrações, foram

adicionados em todos os poços 20 μL de MTT (Sigma-Aldrich, EUA) a 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. A placa foi incubada por 3 h em estufa a 37 $^{\circ}\text{C}$, contendo 5 % de CO_2 . Após a incubação, o DMEM sem SFB foi descartado juntamente com o MTT e foram adicionados 100 μL de DMSO (Sigma-Aldrich, EUA) na placa. Após a adição do DMSO, a placa foi armazenada em temperatura ambiente por 15 a 20 min para a solubilização dos cristais de formazan, cuja conversão é realizada pelas desidrogenases mitocondriais das células viáveis. Por fim, foi realizada a leitura da absorbância em uma leitora de microplacas a 490 nm (TAKEUCHI; BABA; SHIGETA, 1991, com modificações). A viabilidade celular foi calculada pela razão entre a média da absorbância dos poços contendo os peptídeos e a média da absorbância dos poços contendo apenas a células (controle). A partir disso, definiu-se a CMNT como a concentração correspondente a 80 % de viabilidade celular (CC_{20}). Adicionalmente, definiu-se a concentração em que 50 % das células apresentaram viabilidade (CC_{50}).

5.2.3 Ensaio antiviral

Partindo da CMNT definida conforme o item 5.2.2, foram realizadas diluições seriadas a fim de se obter cinco concentrações dos peptídeos IDR-1018 (25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 6,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 1,6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e DJK-6 (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 6,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Inicialmente, foram preparadas as soluções de cada peptídeo nas CMNTs, com volume final de 2 mL. Em outros quatro tubos *ependorf*, foi adicionado 1 mL de DMEM sem SFB. A diluição foi realizada partindo de 1 mL da solução inicial dos peptídeos. Para o ensaio antiviral, foram inoculados 1 mL de células Vero, com concentração entre 10^5 e 10^6 células mL^{-1} em uma placa de 24 poços, a qual foi incubada em atmosfera úmida por 48 h a 37 $^{\circ}\text{C}$ com 5 % de CO_2 . Após o tempo de incubação, o DMEM com SFB foi descartado e as células foram tratadas com 1 mL de cada concentração dos peptídeos previamente diluídos e 100 μL da suspensão viral a 100 TCID_{50} , com exceção dos poços com controle de células e controle de vírus. Após o inóculo, a placa foi incubada novamente em estufa por 48 h e após a análise do efeito citopático (ECP), foi submetida a um ciclo de congelamento e descongelamento para a lise das células e liberação das partículas virais no sobrenadante.

5.2.3.1 Ensaio de redução do título viral

O método de redução do título viral foi utilizado para inferir a atividade antiviral *in vitro* dos peptídeos IDR-1018 E DJK-6. Após o descongelamento da placa de 24 poços, foram feitas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-7}) do sobrenadante de cada poço contendo os peptídeos e do controle de vírus, utilizando-se o DMEM sem SFB como diluente. Cada diluição foi inoculada em monocamadas de células Vero previamente preparadas em placas de 96 poços, nas quais foram adicionados 100 μ L de DMEM sem SFB e 25 μ L de cada diluição dos peptídeos em seis poços da placa. Em todas as microplacas, a última linha foi reservada para o controle, contendo apenas a monocamada de células Vero e DMEM sem SFB. Após o inóculo, as microplacas foram incubadas por 48 h a 37°C em estufa contendo 5 % de CO₂. A leitura e o cálculo do título viral foram realizados de acordo com a metodologia de Reed e Muench (1938), conforme descrito no capítulo 1, item 4.2.2.1. A partir desses títulos, inferiu-se o grau de atividade antiviral, por meio do índice de inibição viral (IIV) e porcentagem de inibição (PI). O valor do IIV foi calculado segundo a fórmula proposta por Lagrota (1978):

$$\text{IIV} = B - A$$

na qual B corresponde ao título viral na cultura de células não tratada (controle de vírus) e A corresponde ao título do vírus na cultura celular tratada .

A PI foi obtida de acordo com a fórmula proposta por Nishimura, Toku e Fukuyashu (1977):

$$\text{PI} = [1 - (\text{antilog T} / \text{antilog C})] \times 100$$

em que T corresponde às unidades infecciosas nas culturas de células tratadas e C corresponde às mesmas unidades em células não tratadas (controle de vírus).

5.2.3.2 Curva dose-resposta e determinação do índice de seletividade

As curvas dose-resposta demonstram o efeito dos peptídeos IDR-1018 e DJK-6 (PI) em função de sua concentração (log), sobre a replicação do HHV-1 em cultura de células Vero. A partir desses dados, determinou-se a concentração dos peptídeos capaz de inibir 50 % da replicação viral (CE₅₀) e o índice de seletividade (IS = CC₅₀/CE₅₀). O IS é utilizado para estimar a segurança de um fármaco e quanto maior

o valor deste, maior a diferença entre a dose efetiva para reduzir a replicação viral (CE_{50}) e a dose capaz de causar toxicidade (CC_{50}). Considera-se um bom perfil de segurança quando a molécula apresenta valor de IS acima ou igual a 10 (DEZENGRINI et al., 2010; TAMARGO; LE HEUZEY; MABO, 2015).

5.2.4 Avaliação do efeito sobre o ciclo replicativo viral (*time of addition assay*)

5.2.4.1 Ensaio de inibição da adsorção viral

Para inferir a possível ação dos peptídeos IDR-1018 e DJK-6 sobre os receptores celulares, aos quais as partículas virais interagem na etapa de adsorção, as monocamadas de células Vero previamente preparadas em placas de 24 poços, foram mantidas em contato com as soluções dos peptídeos nas CMNTs ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), por 1 h a 4°C . Após esse período, o sobrenadante foi descartado, os poços foram lavados com DMEM sem SFB frio e foram adicionados $100 \mu\text{L}$ da suspensão viral a 100TCID_{50} às células tratadas e não tratadas (controle). As placas foram incubadas a 37°C por 48 h e depois congeladas, conforme protocolo modificado de Martins et al. (2009). Após o descongelamento, a replicação viral foi avaliada conforme descrito no item 4.2.2.1 do capítulo 1.

5.2.4.2 Ensaio de inibição da penetração viral

Para verificar a possível ação dos peptídeos IDR-1018 e DJK-6 sobre a etapa de penetração viral em cultura de células Vero, foram inoculados $100 \mu\text{L}$ da suspensão viral a 100TCID_{50} em monocamadas de células Vero confluentes, previamente preparadas em placas de 24 poços e incubadas por 1 h a 4°C . Após o tempo de adsorção, as células Vero foram lavadas com DMEM sem SFB, tratadas com 1 mL das soluções dos peptídeos nas CMNTs ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e novamente incubadas por 1 h a 37°C . Posteriormente, uma nova lavagem foi realizada e o DMEM sem SFB foi adicionado às placas, as quais foram incubadas a 37°C por 48 h em atmosfera úmida com 5 % de CO_2 . As placas foram submetidas a um ciclo de congelamento e descongelamento, conforme protocolo modificado de Martins et al.

(2009). A avaliação da replicação viral foi realizada de acordo com o item 4.2.2.1 do capítulo 1.

5.2.4.3 Ensaio de ação intracelular

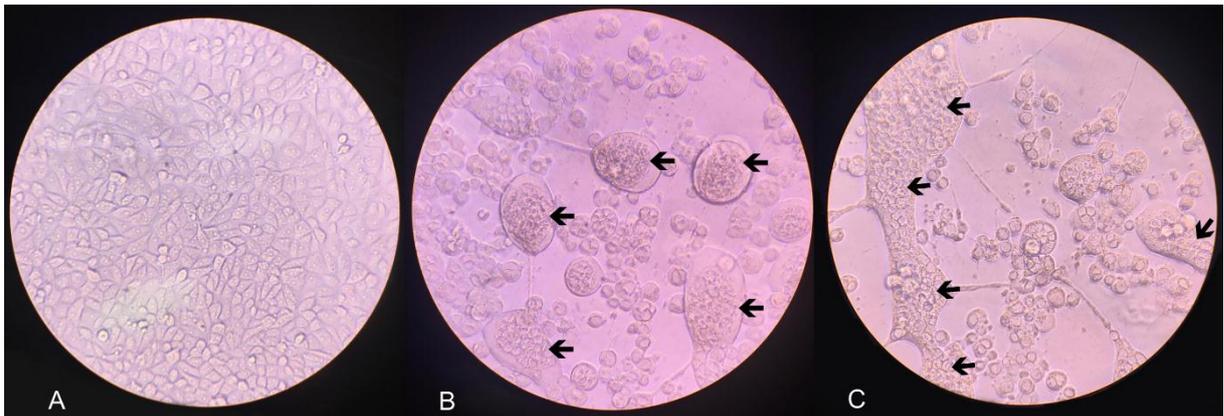
Para inferir se os peptídeos IDR-1018 e DJK-6 possuem atividade sobre alguma etapa da biossíntese viral, monocamadas de células Vero previamente preparadas em placas de 24 poços, foram mantidas em contato com as suspensões virais (100 TCID_{50}) por 1 h a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, as células Vero foram lavadas e novamente incubadas com DMEM sem SFB por 1 h a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Após esse período, as células foram tratadas com 1 mL das soluções dos peptídeos nas CMNTs ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e incubadas por 18 h a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (os poços controle foram mantidos apenas com o DMEM sem SFB). Além dos controles de células e de vírus, o aciclovir ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi utilizado como controle positivo do ensaio. Por fim, as células Vero foram lavadas e incubadas com o DMEM sem SFB por 24 h a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em atmosfera úmida, sendo congeladas após esse período, conforme protocolo modificado de Martins et al. (2009). Dado o descongelamento, a titulação viral foi avaliada conforme o item 4.2.2.1 do capítulo 1.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Efeito citopático (ECP) do HHV-1 sobre as células Vero

Nos ensaios de redução do título viral realizados, a inibição da replicação viral foi avaliada de acordo com a presença ou ausência de ECP na cultura celular, após 48 h do inóculo viral. As figuras 11B e 11C demonstram alterações morfológicas observadas após a infecção pelo HHV-1 em cultura de células Vero. Essas alterações têm sido caracterizadas pelo aumento do núcleo e arredondamento das células, as quais permanecem ligadas umas às outras por prolongamentos citoplasmáticos, formando focos semelhantes a cachos de uva. Também foi possível observar a destruição da monocamada celular, além da presença de estruturas multinucleadas (sincícios) formadas pela fusão das células, indicadas na figura pelas setas pretas. Os efeitos citopáticos descritos foram comparados ao controle de células, utilizado como parâmetro de normalidade morfológica dos ensaios (Figura 11A).

Figura 11. Ensaio de redução do título viral. (A) Controle celular após 48 h de crescimento em DMEM (aumento: 400x). (B) Monocamada de células Vero 48 h após o inóculo do HHV-1 no título de 100 TCID₅₀ (aumento: 400x). (C) Efeito citopático característico do HHV-1 em células Vero, com destruição da monocamada celular após 48 h do inóculo viral (aumento:400x). As setas pretas indicam a formação de sincícios na cultura celular. HHV-1: *Human alphaherpesvirus 1*.

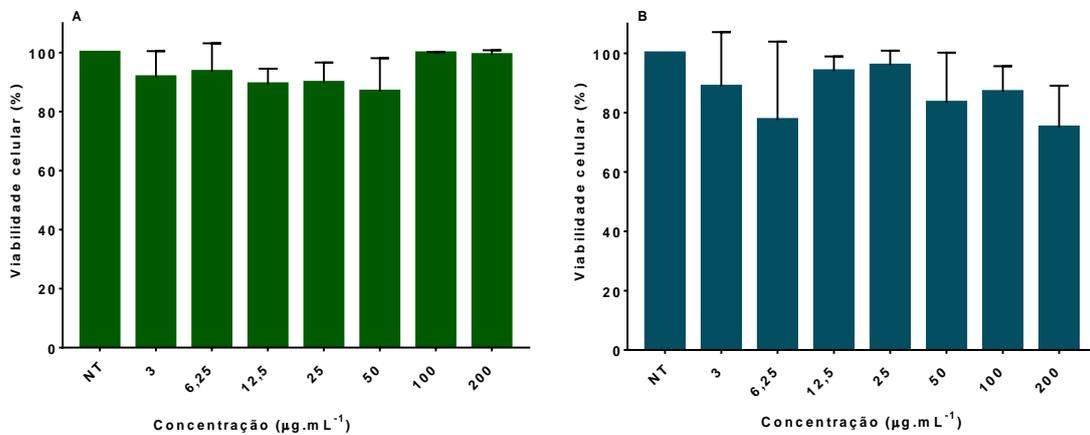


5.3.2 Ensaio de viabilidade celular

Para realizar os ensaios antivirais, inicialmente foram definidas as concentrações máximas não tóxicas (CMNT) das moléculas, como a concentração em que pelo menos 80 % das células permaneceram viáveis, ou seja, sem alterações em sua morfologia. De acordo com os resultados, o peptídeo IDR-1018 não

apresentou toxicidade em cultura de células Vero e não houve diferença estatística entre as concentrações utilizadas e o controle não tratado (Figura 12A). De maneira semelhante, o peptídeo DJK-6 também não apresentou diferença estatística comparado ao controle não tratado. Entretanto, foi observado viabilidade celular acima de 80 % a partir da concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a qual foi definida como a CMNT desta molécula (Figura 12B).

Figura 12. Ensaio de viabilidade celular dos peptídeos IDR-1018 (A, barras em verde), DJK-6 (B, barras em azul). Foram avaliados os perfis de citotoxicidade das moléculas em células Vero após 48 h de tratamento em diferentes concentrações pela técnica de MTT. Os valores representam as médias \pm DP (n=4) e foram analisados pelo one-way ANOVA e teste de Dunnett, $p < 0,05$, comparando ao grupo não tratado (NT).



No ensaio de viabilidade celular, também foram definidas as concentrações em que 50 % das células apresentaram-se viáveis (CC_{50}) para cada peptídeo avaliado. Na tabela 7 estão descritos os valores da CMNT e CC_{50} definidos para cada peptídeo, bem como a concentração inicial utilizada no ensaio de viabilidade celular. Não foi possível calcular a CC_{50} dos peptídeos IDR-1018 e DJK-6, visto que estes apresentaram viabilidade acima de 80 % nas concentrações máximas. Dessa forma, considerou-se um valor acima de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para ambos os peptídeos.

Tabela 8. Ensaio de viabilidade celular. A tabela descreve os valores da CMNT e CC_{50} definidos para os peptídeos IDR-1018 e DJK-6, bem como a concentração inicial utilizada no ensaio.

Moléculas testadas	Concentração inicial ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CMNT ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
IDR-1018	200	200	> 200
DJK-6	200	100	> 200

CMNT: concentração máxima não tóxica; CC_{50} : concentração em que 50 % das células apresentaram viabilidade.

5.3.3 Ensaio antiviral

A partir das CMNTs determinadas no ensaio de viabilidade celular foi realizada a avaliação do efeito inibitório *in vitro* dos peptídeos IDR-1018 e DJK-6 contra o HHV-1. Este efeito foi expresso pelo índice de inibição viral (IIV) de acordo com o método de Reed e Muench (1938), e pelo percentual de inibição (PI) calculado pela fórmula proposta por Nishimura, Toku e Fukuyashu (1977).

Ambos os peptídeos apresentaram inibição significativa da replicação viral nas concentrações máximas testadas. O ensaio com o peptídeo IDR-1018 foi iniciado com a CMNT de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 13A). Entretanto houve inibição da replicação viral acima de 90 % nas maiores concentrações desse peptídeo. Dessa forma, foram selecionadas as concentrações do peptídeo IDR-1018 a partir de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a curva dose-resposta, a qual apresentou PI de 98,9 %. Na segunda e terceira concentrações testadas (12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 6,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), a PI foi de 86,7 % e 13,7 % respectivamente, com ausência de inibição viral nas duas últimas concentrações do peptídeo (3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 1,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Para o peptídeo DJK-6, o ensaio antiviral foi iniciado com a CMNT de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, na qual foi observada inibição da replicação viral de 99,8 %. Na concentração do peptídeo de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, o valor da PI se manteve significativo, com 93,5 % de inibição viral, caindo para 53,3 % na concentração subsequente (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Nas duas últimas concentrações testadas (12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 6,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), não foi observada inibição da replicação viral na cultura celular (Figura 13B).

As curvas dose-resposta foram realizadas com o objetivo de definir a concentração capaz de inibir 50 % da replicação viral (CE_{50}) de cada peptídeo por regressão não linear. A partir dos valores do CC_{50} e CE_{50} foi calculado o índice de seletividade (IS), o qual deve apresentar um valor maior ou igual a 10 para que a molécula tenha um bom perfil de segurança. Devido ao perfil não citotóxico apresentado pelos peptídeos IDR-1018 e DJK-6, não foi possível determinar o CC_{50} dos mesmos e por isso, inferiu-se um IS maior que 22,9 e maior que 8,2, respectivamente. Na tabela 8, estão descritos o CE_{50} e o IS de cada peptídeo testado, bem como o IIV e PI referentes à concentração máxima utilizada no ensaio antiviral.

Figura 13. Ensaio antiviral. O efeito inibitório *in vitro* dos peptídeos IDR-1018 (A) e DJK-6 (B) contra a replicação do HHV-1 foi expresso em percentual de inibição (PI) e analisado por regressão não linear para cálculo do CE_{50} , a partir das curvas dose-resposta. Os valores das PI (eixo Y) representam as médias \pm DP ($n=3$). CE_{50} : concentração efetiva capaz de inibir 50 % da replicação viral em cultura celular. HHV-1: *Human alphaherpesvirus 1*.

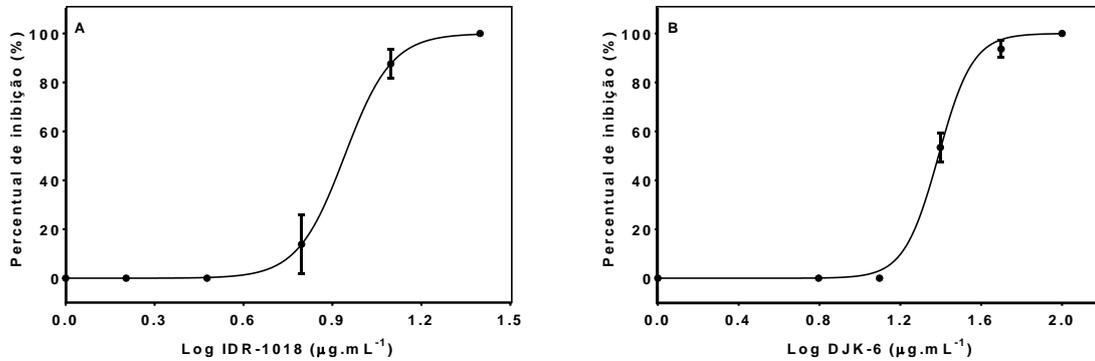


Tabela 9. Ensaio antiviral dos peptídeos IDR-1018 e DJK-6 contra o HHV-1. Na tabela estão descritos os valores do IIV e PI referentes à concentração inicial utilizada no ensaio, bem como o CE_{50} , definido a partir das curvas dose-resposta por regressão não linear e o IS.

Molécula testada	Concentração inicial ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	IIV	PI (%)	CE_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	IS
IDR-1018	25	1,97	98,9	8,7	> 22,9
DJK-6	100	2,85	99,8	24,5	> 8,2

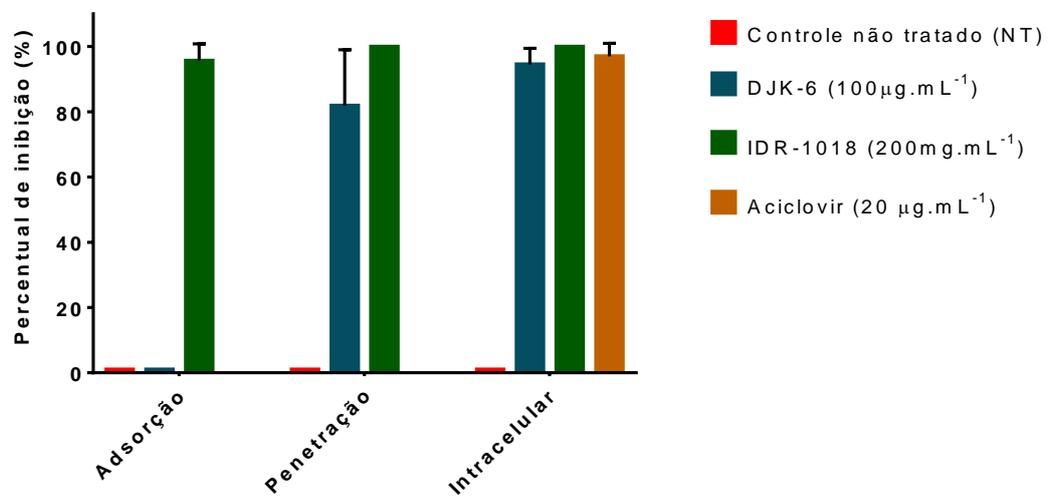
IIV: índice de inibição viral; PI: percentual de inibição; CE_{50} : concentração efetiva capaz de inibir 50 % da replicação viral; IS: índice de seletividade.

5.3.4 Avaliação do efeito sobre o ciclo replicativo viral (*time of addition assay*)

A partir dos resultados dos ensaios antivirais, nos quais os peptídeos IDR-1018 e DJK-6 apresentaram valores significativos de inibição *in vitro* do HHV-1 em suas CMNTs, foi realizada a análise do possível efeito dessas moléculas sobre as diferentes etapas do ciclo replicativo viral (Figura 14). O peptídeo IDR-1018 apresentou atividade nos três ensaios por tempo de adição (*time of addition assay*), com PI significativa de 95,6 % no ensaio de inibição da adsorção e PI de 99,9 % no ensaio de inibição da penetração e ensaio de ação intracelular. O peptídeo DJK-6 apresentou ação nos ensaios de inibição da penetração e intracelular, com PI de 81,8 % e 94,5 %, respectivamente. Entretanto, não foi observada nenhuma influência dessa molécula durante a fase de adsorção viral, comparado ao controle não tratado.

Nos ensaios de efeito intracelular, os peptídeos IDR-1018 e DJK-6 apresentaram redução significativa da replicação viral, comparados aos controles não tratados. Ambos os peptídeos apresentaram ação inibitória em concentrações superiores ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) comparadas ao aciclovir (ACV), utilizado como controle positivo do teste ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Figura 14. Ensaio de efeito do tratamento com os peptídeos IDR-1018 e DJK-6 em suas respectivas CMNTs, sobre o ciclo replicativo do HHV-1. A ação dos peptídeos foi avaliada nas etapas de adsorção, penetração e durante a biossíntese viral, comparada ao controle não tratado. O aciclovir foi utilizado como controle positivo do ensaio intracelular. Os valores representam as médias \pm DP (n=3). HHV-1: *Human alphaherpesvirus 1*.



6 DISCUSSÃO

As infecções causadas pelos herpesvírus humanos (HHV) constituem um importante problema de saúde pública devido à sua característica contagiosa, capacidade de estabelecer latência no hospedeiro com episódios de recorrência da infecção, além de mutabilidade e potencial epidêmico. O tratamento pode ser realizado por meio dos análogos de nucleosídeos, incluindo o aciclovir, os quais agem inibindo a DNA polimerase viral. Entretanto, o uso prolongado desses antivirais tem favorecido o surgimento de resistência, causando infecções graves principalmente em neonatos e pacientes imunocomprometidos, com altas taxas de mortalidade. Além disso, os análogos de nucleosídeos não são capazes de prevenir o processo de latência e reativação da doença, uma vez que esses fármacos agem apenas nas partículas virais em replicação ativa (KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014; RECHENCHOSKI et al., 2017).

Diante disso, tem sido imperativo o desenvolvimento de novos antivirais com diferentes mecanismos de ação para o tratamento das infecções pelo HHV. Nesse sentido, o presente estudo visou avaliar a atividade antiviral de diferentes biomoléculas contra o HHV-1 em duas vertentes: compostos derivados de produtos naturais e peptídeos imunomodulatórios. Dessa forma, foram avaliados quatro compostos isolados da espécie *Campomanesia adamantium* e a chalcona cardamonina, sintetizada em laboratório, contra a replicação do HHV-1 em cultura celular. Adicionalmente, os peptídeos IDR-1018 E DJK-6 foram analisados quanto à sua capacidade inibitória *in vitro* contra o HHV-1, bem como sua possível ação nas diferentes etapas do ciclo replicativo viral.

Dentre as inúmeras abordagens para o desenvolvimento de novas moléculas antivirais, os compostos derivados de plantas medicinais têm ganhado destaque devido à sua atividade sobre os diferentes estágios da replicação viral. No presente estudo, os compostos C1, C2, C3 e C4, isolados da espécie *Campomanesia adamantium*, apresentaram ação significativa contra a replicação do HHV-1 em cultura de células Vero, com 99,9 % de inibição viral em suas respectivas CMNTs. Entretanto, a análise por espectrometria de massas constatou a presença de contaminantes nos compostos analisados, comprometendo os resultados obtidos. Diante disso, foi dada continuidade apenas aos ensaios com a chalcona cardamonina.

As chalconas constituem uma estrutura comum presente na natureza, especialmente em produtos naturais derivados de plantas. Na química medicinal, as chalconas são consideradas moléculas privilegiadas devido à sua estrutura simples, de fácil identificação e síntese. Esses fatores combinados ao vasto espectro de atividades biológicas apresentados por estas moléculas têm incentivado estudos relacionados às suas propriedades antimicrobianas, bem como a identificação de alvos específicos de ação (ZHUANG et al., 2017). No presente estudo, a chalcona cardamonina apresentou atividade *in vitro* significativa contra a replicação do HHV-1, com inibição completa do efeito citopático viral nas duas maiores concentrações testadas (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A partir da curva dose-resposta, inferiu-se a concentração efetiva capaz de inibir 50 % da replicação viral (CE_{50}) como 1,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sugerindo que mesmo em concentrações pequenas, a molécula pode interferir na infecção pelo HHV-1 em cultura celular.

Os estudos relacionados à atividade antiviral da cardamonina na literatura são escassos, especialmente contra vírus da família *Herpesviridae*. No estudo realizado por Murakami e colaboradores (1993), a atividade inibitória *in vitro* da cardamonina foi observada contra o vírus Epstein-Barr (EBV) na presença do promotor tumoral teleocidina B-4. De acordo com os dados, a cardamonina apresentou inibição completa da ativação do EBV na concentração de 6,75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, com EC_{50} de 0,83 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Em outro estudo, Cole et al. (2016) realizou a avaliação da atividade anti-HIV de uma série de flavonoides em cultura de células e os compostos mais promissores foram utilizados como modelo para a síntese de novas moléculas mais potentes e com menor toxicidade. Dentre elas, as chalconas apresentaram o melhor equilíbrio entre potência de ação antiviral e toxicidade celular, uma vez que as chalconas 8o e 8p (10 μM) apresentaram porcentagem de inibição acima de 92 % sem afetar a viabilidade da linhagem celular pró-mielocítica (PM1). Adicionalmente, observou-se aumento significativo da inibição viral (60 % a 90 %) ao realizar a pré-incubação das células com a chalcona 8o, sugerindo que essa molécula pode ser promissora para a terapia contra o HIV-1.

Na avaliação de citotoxicidade da cardamonina em cultura de células Vero, observou-se viabilidade celular acima de 80 % nas concentrações menores que 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a qual foi definida como a CMNT desta molécula. Adicionalmente, foi definida a concentração da molécula capaz de reduzir 50 % da viabilidade celular

(CC₅₀) em 32,7 µg.mL⁻¹. Um estudo realizado por Aderogba et al. (2012) avaliou a citotoxicidade da cardamonina isolada da espécie *Combretum apiculatum* em células Vero. De acordo com os dados, houve considerável redução da viabilidade celular nas concentrações acima de 50 µg.mL⁻¹. Em outro estudo realizado por Li et al. (2008), a toxicidade da cardamonina e de outras três chalconas denominadas *flavokawain A, B* e *C* (100 µM) foram avaliadas em linhagem de células hepáticas humanas (L-02) e em células de hepatoma humano (HepG2). Dentre as quatro chalconas avaliadas, a cardamonina apresentou maior toxicidade, com CC₅₀ de 30,90 para a L-02 e CC₅₀ de 22,63 para a HepG2.

A curva dose-resposta também pode ser utilizada para gerar informações a respeito da margem de segurança de uma determinada molécula, utilizada para produzir um efeito específico. Tal medida pode ser inferida por meio do índice de seletividade (IS), o qual expressa a diferença entre a dose efetiva para reduzir a replicação viral (EC₅₀) e a dose capaz de causar toxicidade (CC₅₀). Portanto, quanto maior o valor do IS, maior será a segurança da molécula testada, sendo que um IS igual ou acima de 10 é considerado o valor desejável, segundo a literatura (DEZENGRINI et al., 2010; TAMARGO; LE HEUZEY; MABO, 2015). Devido à alta variabilidade observada entre as réplicas dos ensaios antivirais com a cardamonina, inferiu-se um valor aproximado de IS em torno de 21,8, indicando que essa molécula pode ser promissora no estudo e desenvolvimento de novos antivirais contra o HHV-1.

O amplo espectro de bioatividade apresentado pelas chalconas indica que essas moléculas possuem um perfil de ação promíscuo, podendo agir em diversos alvos diferentes (MATEEVA et al., 2017; ZHOU; XING, 2015). Nos ensaios de efeito por tempo de adição (*time of addition assay*), a cardamonina apresentou potente atividade contra o HHV-1 nas etapas de penetração viral e intracelular. Por outro lado, a ação na etapa de adsorção viral foi inferior comparada aos ensaios anteriores, com inibição viral de 42,7 %. A partir desses resultados, sugere-se que a cardamonina pode atuar principalmente inibindo a fusão e entrada do HHV-1 na célula hospedeira, o que pode ocorrer pela destruição do envelope viral ou pela interação de proteínas responsáveis pela fusão deste com a membrana celular, por exemplo. Outra hipótese é que a cardamonina atue inibindo a biossíntese viral, por meio da supressão da expressão gênica ou inibição da síntese de proteínas estruturais e não estruturais, por

exemplo. Estudos mais detalhados são necessários para determinar os alvos de ação específicos da cardamonina e a forma de interação molecular que leva à inibição da infecção *in vitro* pelo HHV-1.

A identificação de alvos moleculares em estudos com compostos bioativos, especialmente produtos naturais, é uma etapa decisiva na pesquisa farmacêutica. Diversas estratégias têm sido utilizadas para explorar os alvos diretos de interação das chalconas nas infecções virais como por exemplo, a ferramenta de *docking* molecular. Estudos realizados por meio desta ferramenta, demonstraram a ação de chalconas sintéticas contra o HIV-1, pela interação com a enzima integrase viral (DENG et al., 2007) e com a enzima transcriptase reversa (RT). Neste último caso, observou-se que a inibição da enzima RT pode estar relacionada com os tipos e posições das substituições estruturais, interferindo na hidrofobicidade da molécula (HAMEED et al., 2016). Outro estudo demonstrou ainda a ação da tetrahidroximetoxichalcona, licochalcona A e licochalcona B contra o promotor do vírus HIV induzido por TPA, sugerindo que essas chalconas são capazes de suprimir a expressão gênica viral (UCHIUMI et al., 2003).

A ação das chalconas em alvos específicos também foi demonstrada contra as proteases quimotripsina-like (3CL^{pro}) e papaína-like (PL^{pro}), essenciais para a replicação do coronavírus causador da síndrome respiratória aguda (SARS-CoV). Neste estudo, a atividade antiviral de chalconas e cumarinas isoladas da espécie *Angelica keiskei* foram analisadas e dentre elas, a chalcona 6 demonstrou atividade inibitória mais potente, com EC₅₀ de 11,4 µM e 1,2 µM nos testes com a 3CL^{pro} e PL^{pro}, respectivamente. Além disso, a análise detalhada da inibição proteica demonstrou que as chalconas isoladas dessa espécie de planta atuam por inibição competitiva contra a 3CL^{pro} e por inibição não-competitiva contra a PL^{pro} (PARK et al., 2015).

Além da pesquisa relacionada a compostos derivados de produtos naturais, a busca de moléculas antivirais com diferentes alvos de ação também envolve a predição e desenho racional de peptídeos, que permitem o desenvolvimento de análogos sintéticos com melhor atividade antimicrobiana e toxicidade reduzida. Os peptídeos de defesa do hospedeiro (PDHs) podem ser encontrados em todos os organismos vivos e apresentam atividade imunomodulatória além de um amplo espectro de ação antimicrobiana, incluindo inibição de diferentes tipos de infecções virais, especialmente contra vírus envelopados. Diversas estratégias têm sido utilizadas para o desenvolvimento de análogos sintéticos baseados em sequências de

PDHs, visando otimizar seus parâmetros físico-químicos, melhorando suas ações biológicas e diminuindo sua toxicidade (GALDIERO et al., 2013; MANSOUR; FUENTE-NÚÑEZ; HANCOCK, 2015). Um exemplo de análogos sintéticos são o peptídeo IDR-1018, desenvolvido a partir da batenecina bovina Bac2a, e o peptídeo DJK-6, desenhado com base nas propriedades inerentes ao IDR-1018.

No presente estudo, ambos os peptídeos IDR-1018 e DJK-6 demonstraram ação inibitória dose-dependente contra o HHV-1. Para o peptídeo IDR-1018, observou-se completa inibição do efeito citopático viral em cultura de células Vero, na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Nos testes com concentrações menores, a ação do peptídeo permaneceu significativa, com inibição acima de 90 % a 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e acima de 80 % numa dose de 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O peptídeo DJK-6 também apresentou redução significativa da replicação viral nas maiores concentrações utilizadas (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Por outro lado, sua ação em concentrações menores foi inferior se comparado ao IDR-1018. O CE_{50} definido para o DJK-6 foi de 24,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto o IDR-1018 apresentou CE_{50} de 8,7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sugerindo que apesar de ambos os peptídeos apresentarem ação antiviral *in vitro*, o IDR-1018 apresenta maior potência devido à sua capacidade em inibir 50 % da replicação viral em uma dose menor, comparado ao DJK-6.

A ação do IDR-1018 bem como de outros análogos da Bac2a contra o HHV-2 foi demonstrada no estudo realizado por Shestakov et al. (2013), no qual todos os peptídeos apresentaram ação inibitória dose-dependente nos ensaios *in vitro*. Os peptídeos IDR-1018 e IDR-1002 apresentaram redução do número de plaques acima de 75 % na concentração de 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e maior que 50 % na dose de 31 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Por outro lado, os peptídeos 1006 e HH-2 tiveram uma ação inferior, com redução do plaque menor que 50 % na concentração de 62 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Adicionalmente, todos os peptídeos apresentaram ausência de toxicidade em cultura de células Vero (SHESTAKOV et al., 2013). Esse perfil não citotóxico também foi observado no presente estudo, onde não houve redução da viabilidade celular na presença da CMNT utilizada para o ensaio com o peptídeo IDR-1018 (200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Por outro lado, no ensaio com o peptídeo DJK-6, as células apresentaram viabilidade inferior a 80 % nas concentrações acima de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Entretanto, estatisticamente a diferença entre a viabilidade apresentada nessa concentração e o controle do ensaio não foi significativa.

Devido ao perfil não citotóxico dos peptídeos IDR-1018 e DJK-6, foram inferidos valores de IS aproximados para ambos os peptídeos. O peptídeo IDR-1018 apresentou um IS acima de 22,9, sugerindo que o mesmo possui um bom perfil de segurança e pode ser uma molécula promissora para o desenvolvimento de um novo antiviral contra o HHV-1. Por outro lado, o peptídeo DJK-6 apresentou um valor de IS inferior comparado ao IDR-1018. Entretanto, conforme mencionado anteriormente, esses valores são aproximados e esses dados podem ser utilizados como um direcionamento para novos estudos sobre o potencial antiviral do peptídeo DJK-6, os quais são escassos na literatura até o momento.

Devido à atividade inibitória apresentada pelos peptídeos IDR-1018 e DJK-6 nos ensaios antivirais contra a replicação do HHV-1, foram realizados os ensaios de efeito por tempo de adição (*time of addition assay*) para inferir a possível ação dos peptídeos sobre as diferentes etapas do ciclo replicativo viral. Os estágios iniciais da infecção pelo HHV-1 consistem na adsorção e subsequente entrada do vírus na célula hospedeira, por meio da interação de glicoproteínas presentes no envelope viral e as glicosaminoglicanas celulares (KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014). O sulfato de heparan (HS) é a principal glicosaminoglicana expressa na superfície e na matriz extracelular de diversos tipos de células e funciona como receptor para as glicoproteínas gC e gB na etapa de adsorção do HHV-1, levando à hipótese de que o bloqueio deste receptor pode impedir a adsorção e entrada do vírus na célula hospedeira (JENSSEN, 2009; TIWARI; TARBUTTON; SHUKLA, 2015; ZHU; LI; LIANG, 2011). Esta hipótese já foi demonstrada em estudos anteriores utilizando células recombinantes com ausência de expressão do receptor HS e com remoção enzimática de glicosaminoglicanas, as quais apresentaram redução da susceptibilidade à infecção pelo HHV (JENSSEN, 2009; MÅRDBERG et al., 2002).

Nos testes realizados, o peptídeo IDR-1018 apresentou atividade contra o HHV-1 na etapa de adsorção e penetração viral, com 95,6 % e 99,9 % de inibição respectivamente. Esse resultado corrobora com os dados apresentados no estudo de Shestakov et al. (2013), no qual todos os peptídeos análogos da Bac2a testados (1002, 1006, 1018 e HH-2) apresentaram inibição significativa da adsorção do HHV-2 em cultura celular e redução de plaque de aproximadamente 50 % no ensaio de penetração. Adicionalmente, todos os peptídeos apresentaram alta taxa de ligação ao receptor HS. Diante disso, sugere-se que a ação antiviral observada nos ensaios por tempo de adição com o peptídeo IDR-1018, possa estar ocorrendo devido à interação

desse peptídeo com o receptor HS da célula hospedeira. Essa interação pode estar impedindo a adsorção e entrada do HHV-1 na célula, por meio da ligação entre as glicoproteínas do envelope viral e o receptor HS.

Outro fator relacionado à interação de peptídeos com o receptor HS consiste em seu alto potencial catiônico, de modo que análogos sintéticos com resíduos de arginina possuem afinidade consideravelmente maior por glicosaminoglicanos presentes na superfície celular. Essa característica pode ser observada no estudo de Jenssen et al. (2004), no qual peptídeos sintéticos com ação inibitória contra o HHV-1 e HHV-2 apresentaram maior afinidade pelo receptor HS proporcional ao aumento de aminoácidos catiônicos na sequência peptídica. Além disso, os dados demonstraram que mais de 43 % de resíduos catiônicos são necessários para que esses peptídeos apresentem atividade contra o HHV-1 e HHV-2. Borst et al. (2013) demonstrou a ação inibitória do peptídeo CYVIP, derivado de hemofiltrado humano, na adsorção do citomegalovírus humano (CMV) à célula hospedeira. Por meio de estudos de estrutura-atividade, os autores demonstraram que os resíduos de arginina e lisina presentes no peptídeo CYVIP são fundamentais para sua interação com o receptor HS, impedindo a adsorção viral. Diante disso, sugere-se que a ação inibitória apresentada pelo peptídeo IDR-1018 na etapa de adsorção do HHV-1, possa estar relacionada ao seu potencial catiônico e aos resíduos de arginina presentes na sequência desse peptídeo.

Nos ensaios de efeito por tempo de adição com peptídeo DJK-6, não foi observada atividade inibitória contra a adsorção do HHV-1. Entretanto, esse peptídeo demonstrou ação na etapa de penetração viral, com percentual de inibição acima de 80 %. Diferentes mecanismos de ação foram propostos para peptídeos capazes de inibir a entrada do vírus na célula hospedeira como ação direta no envelope viral, levando ao seu rompimento ou agregação. Adicionalmente, estudos demonstraram que peptídeos hidrofóbicos ou anfipáticos são capazes de estabelecer interações com a membrana do envelope viral e com as proteínas responsáveis pela fusão deste com a membrana celular, impedindo que as partículas virais adsorvidas completem o processo de entrada na célula hospedeira (BADANI; GARRY; WIMLEY, 2014; FRANCI et al., 2017).

A ação inibitória contra a penetração do HHV-1 foi demonstrada no estudo de Hong et al. (2014) com os peptídeos Hp1036 e Hp1239, derivados do veneno de escorpião. Ambos os peptídeos demonstraram atividade inibitória *in vitro* contra o

HHV-1 ($EC_{50} = 0,43 \mu\text{M}$ e $0,41 \mu\text{M}$, respectivamente) por meio da ruptura do envelope viral e alteração morfológica dos vírions. Além disso, os autores sugerem que os peptídeos também são capazes de agir nas partículas virais ligadas à membrana celular, impedindo sua fusão e entrada na célula hospedeira. O estudo realizado por Marcocci et al. (2018) demonstrou a ação dose-dependente do peptídeo temporina B (TB), derivado da pele de anfíbios, contra o HHV-1 em cultura de células Vero (EC_{50} : $2.507 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Os resultados demonstraram significativa redução da infecção viral na etapa de penetração do vírus na célula hospedeira, além de ação direta na partícula viral. Entretanto, não foi observada atividade inibitória após o pré-tratamento da monocamada celular com o peptídeo TB, indicando que os receptores celulares possivelmente não são alvos de ação deste peptídeo.

Uma característica de fundamental importância apresentada pelos PDHs é sua capacidade de ação em múltiplos alvos, conferindo a esses peptídeos uma menor propensão de induzir mecanismos de resistência em microrganismos, comparados aos medicamentos convencionais (NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011). Dessa forma, um mesmo peptídeo antiviral pode apresentar diferentes mecanismos de ação, interagindo diretamente com a partícula viral, com os receptores celulares ou bloqueando a fusão e entrada do vírus na célula hospedeira. Além desses mecanismos, o peptídeo também pode atuar de forma intracelular, inibindo a expressão gênica e síntese proteica viral (MULDER et al., 2013). Esse perfil de ação em múltiplos alvos foi observado para os peptídeos IDR-1018 e DJK-6, os quais além de apresentarem os resultados citados anteriormente, também demonstraram atividade no ensaio de efeito intracelular. Ambos os peptídeos apresentaram significativa inibição da replicação viral de forma semelhante ao aciclovir, utilizado como controle positivo do ensaio.

Um exemplo de peptídeo antiviral com múltiplos alvos de ação é a temporina B, a qual além de apresentar atividade virucida e inibição da penetração viral, também foi capaz de suprimir a expressão de proteínas da fase tardia, incluindo a gB. Adicionalmente, observou-se que a temporina B interferiu no espalhamento do HHV-1 das células infectadas para as células não infectadas adjacentes, levando à hipótese de que a supressão da gB pode inibir a disseminação da infecção pelo HHV-1 em cultura celular (MARCOCCHI et al., 2018). A lactoferricina, derivada da lactoferrina bovina, também possui ação intracelular contra o HHV-1 em diferentes alvos. Um estudo realizado por Marr et al. (2009) demonstrou que além de inibição da adsorção

viral por meio da interação com o receptor HS, a lactoferricina também age interferindo no deslocamento do capsídeo viral ao longo dos microtúbulos até o núcleo celular, impedindo a replicação do HHV-1. Outros estudos demonstraram a ação da lactoferricina em infecções genitais causadas pelo HHV-2 em modelos murinos (SHESTAKOV et al., 2013) além de ação intracelular em outros vírus como o HIV-1, no qual houve redução nuclear da integrase, impedindo a integração do material genético viral na célula hospedeira (WANG et al., 2016).

7 CONCLUSÕES

Neste estudo foi realizada a avaliação antiviral de compostos provenientes de diferentes fontes contra a replicação *in vitro* do *Human alphaherpesvirus 1* (HHV-1), visando a identificação de moléculas capazes de atuar em diferentes etapas do ciclo replicativo viral, com mínima toxicidade celular. Os resultados obtidos permitiram observar a gama de possibilidades disponíveis no que diz respeito ao estudo de moléculas antivirais. Dentre os compostos derivados de produtos naturais testados, a chalcona cardamonina apresentou inibição da penetração e biossíntese viral, além de demonstrar o efeito inibitório esperado em pequenas concentrações. Em relação aos peptídeos imunomodulatórios, o análogo IDR-1018 apresentou maior potência além de um melhor perfil de segurança comparado ao DJK-6. Entretanto, vale ressaltar que até o momento, este é o primeiro estudo de atividade contra o HHV-1 realizado com o peptídeo DJK-6 e os dados obtidos podem contribuir para novas pesquisas relacionadas à ação antiviral desse peptídeo.

Estudos como este, em que se avaliam relações dose-efeito quantais de compostos antivirais, são importantes para determinar a toxicidade e a potência destas moléculas além de seu perfil de segurança, a partir dos quais ensaios adicionais podem ser realizados para a elucidação do mecanismo de ação antiviral. Essas informações são essenciais em estudos de farmacologia e extremamente úteis para a identificação de moléculas promissoras para o desenvolvimento de novos antivirais. A partir dos ensaios por tempo de adição, foi possível inferir que tanto a cardamonina quanto os peptídeos IDR-1018 e DJK-6 foram capazes de atuar em diferentes etapas do ciclo replicativo do HHV-1, contribuindo para o direcionamento de estudos futuros visando a identificação de alvos específicos de ação dessas moléculas bem como as interações moleculares envolvidas nesse processo.

9 BIBLIOGRAFIA

- ACHTMAN, A. H. et al. Effective Adjunctive Therapy by an Innate Defense Regulatory Peptide in a Preclinical Model of Severe Malaria. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 135, p. 1–10, 2012.
- ADEROGBA, M. A. et al. Isolation of antioxidant constituents from *Combretum apiculatum* subsp. *apiculatum*. **South African Journal of Botany**, v. 79, p. 125–131, 2012.
- ANDRESEN, L.; TENSON, T.; HAURYLIUK, V. Cationic bactericidal peptide 1018 does not specifically target the stringent response alarmone (p) ppGpp. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–6, 2016.
- ANDRIGHETTI-FROHNER, C. R. **Síntese e avaliação da atividade antiviral de diferentes classes de compostos sintéticos**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.
- ANN COSTA CLEMNS, S.; KAIRALLA FARHAT, C. Soroprevalência de anticorpos contra vírus herpes simples 1-2 no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 4, p. 726–734, 2010.
- AOKI, N. et al. C-Geranylated chalcones from the stems of *Angelica keiskei* with superoxide-scavenging activity. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1308–1310, 2008.
- ARDUINO, P. G.; PORTER, S. R. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinic-pathological features*. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 37, n. 2, p. 107–121, 2007.
- BADANI, H.; GARRY, R. F.; WIMLEY, W. C. Peptide entry inhibitors of enveloped viruses: The importance of interfacial hydrophobicity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1838, n. 9, p. 2180–2197, 2014.
- BEHLING, E. B. et al. Flavonóide Quercetina : Aspectos Gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição - Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 15, n. 3, p. 285–292, 2004.
- BHAT, A. I. et al. Current status of viral diseases affecting black pepper and cardamom. **Journal of Spices and Aromatic Crops**, v. 27, n. 1, p. 1–16, 2018.
- BHATTA, A. K. et al. Vertical transmission of herpes simplex virus : an update. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft.**, p. 1–8, 2018.
- BIRKMANN, A.; ZIMMERMANN, H. HSV antivirals - Current and future treatment options. **Current Opinion in Virology**, v. 18, p. 9–13, 2016.
- BLOOM, D. C. HSV LAT and neuronal survival. **International Reviews of Immunology**, v. 23, p. 187–198, 2004.

BORST, E. M. et al. A peptide inhibitor of cytomegalovirus infection from human hemofiltrate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 4751–4760, 2013.

BREAK, M. K. A. BIN. **Semi-synthesis of novel cardamonin analogues and identification of a highly active Cu(II)-cardamonin complex that inhibits migration and induces apoptosis via inhibition of MTOR expression**. [s.l.] University of Nottingham, 2018.

BRYAN-MARRUGO, O. L. et al. History and progress of antiviral drugs: From acyclovir to direct-acting antiviral agents (DAAs) for Hepatitis C. **Medicina Universitaria**, v. 17, n. 68, p. 165–174, 2015.

BUCK, C. B. et al. Human alpha-defensins block papillomavirus infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 103, p. 1516–1521, 2006.

CAMERON, A. et al. **The World Medicines Situation 2011. Medicines prices, availability and affordability**. 3. ed. Geneva: World Health Organization, 2011.

CARDONE, G. et al. Viral Molecular Machines. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 726, p. 423–439, 2012.

CARRIEL-GOMES, M. C. et al. In vitro antiviral activity of antimicrobial peptides against herpes simplex virus 1, adenovirus, and rotavirus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 4, p. 469–72, 2007.

CHANG, L. K. et al. Inhibition of Epstein-Barr virus lytic cycle by (-)-epigallocatechin gallate. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 301, n. 4, p. 1062–1068, 2003.

CHANTRILL, B. H. et al. The action of plant extracts on a bacteriophage of *pseudomonas pyocyanea* on influenza A virus. **Journal of General Microbiology**, v. 6, p. 74–84, 1952.

CHOE, H. et al. Immunomodulatory Peptide IDR-1018 Decreases Implant Infection and Preserves Osseointegration. **Clinical Orthopaedics and Related Research®**, v. 473, n. 9, p. 2898–2907, 2015.

CHONG, H. et al. Design of Novel HIV-1/2 Fusion Inhibitors with High Therapeutic Efficacy in Rhesus Monkey Models. **Journal of Virology**, v. 92, n. 16, 2018.

COLE, A. L. et al. Synthesis and Bioevaluation of Substituted Chalcones, Coumaranones and other Flavonoids as anti-HIV agents. **BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY**, p. 1–35, 2016.

COSTA, B. P. F. **Síntese de diazabiciclos a partir de aziridinas chalcônicas de interesse biológico**. [s.l.] Universidade do Vale do Itajaí, 2015.

COUTINHO, I. D. **Estudo químico e atividades biológicas de Campomanesia**

adamantium (cambess.) O. Berg (Myrtacea). [s.l.] Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2008.

DA FONSECA, J. C. F. Histórico das hepatites virais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 322–330, 2010.

DAHER, K. A.; SELSTED, M. E.; LEHRER, R. I. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. **Journal of virology**, v. 60, n. 3, p. 1068–1074, 1986.

DE CLERCQ, E. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 695–747, 2016.

DE CLERCQ, E.; FIELD, H. J. Antiviral prodrugs - The development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. 1, p. 1–11, 2006.

DE MELLO, C. P. P.; BLOOM, D. C.; PAIXÃO, I. C. N. P. Herpes simplex virus type-1: Replication, latency, reactivation and its antiviral targets. **Antiviral Therapy**, v. 21, n. 4, p. 277–286, 2016.

DE SURJO, K.; HART, J. C. L.; BREUER, J. Herpes simplex virus and varicella zoster virus. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 28, n. 6, p. 589–595, 2015.

DENG, J. et al. Discovery of structurally diverse HIV-1 integrase inhibitors based on a chalcone pharmacophore. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 14, p. 4985–5002, 2007.

DEZENGRINI, R. et al. Activity of three antiviral drugs against bovine herpesviruses 1, 2 and 5 in cell culture. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 10, p. 855–860, 2010.

DUGAN, A. S. et al. Human alpha-defensins inhibit BK virus infection by aggregating virions and blocking binding to host cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 3, p. 1125–1132, 2008.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016.

ELSAWY, K. M. et al. Peptide inhibitors of viral assembly: A novel route to broad-spectrum antivirals. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 3, p. 770–776, 2012.

ENQUIST, L. W. Virology in the 21st Century. **Journal of Virology**, v. 83, n. 11, p. 5296–5308, 2009.

EVERTS, M. et al. Accelerating Drug Development : Antiviral Therapies for Emerging Viruses as a Model. **Reviews in Advance**, v. 57, p. 1–15, 2017.

EVANOS AKSÖZ, B.; ERTAN, R. Chemical and structural properties of chalcones I.

Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 36, n. 4, p. 223–242, 2011.

FINDLAY, E. G.; CURRIE, S. M.; DAVIDSON, D. J. Cationic host defence peptides: Potential as antiviral therapeutics. **BioDrugs**, v. 27, n. 5, p. 479–493, 2013.

FLINT, S. J. et al. **Principles of virology: molecular biology, pathogenesis and control of animal viruses**. 2. ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2004.

FRANCI, G. et al. Infectivity inhibition by overlapping synthetic peptides derived from the gH/gL heterodimer of herpes simplex virus type 1. **Journal of Peptide Science**, v. 23, n. 4, p. 311–319, 2017.

FREITAS, C. G. et al. An Immunomodulatory Peptide Confers Protection in an Experimental Candidemia Murine Model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 8, p. 1–11, 2017.

FUENTE-NÚÑEZ, C. DE LA et al. D-enantiomeric peptides that eradicate wild-type and multi-drug resistant biofilms and protect against lethal *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Chemistry & Biology**, v. 22, n. 2, p. 196–205, 2015.

GALDIERO, S. et al. Peptide inhibitors against herpes simplex virus infections. **Journal of Peptide Science**, v. 19, n. 3, p. 148–158, 2013.

GARBER, D. A.; SCHAFFER, P. A.; KNIPE, D. M. A LAT associated function reduces productive-cycle gene expression during acute infection of murine sensory neurons with herpes simplex virus type 1. **Journal of Virology**, v. 71, n. 8, p. 5885–5893, 1997.

GIAMOGANTE, F. et al. Comparative analysis of the interaction between different flavonoids and PDIA3. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1–12, 2016.

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

GONÇALVES, L. M.; VALENTE, I. M.; RODRIGUES, J. A. An Overview on Cardamonin. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 6, p. 633–640, 2014.

HAMEED, A. et al. Anti-HIV cytotoxicity enzyme inhibition and molecular docking studies of quinoline based chalcones as potential non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRT). **Bioorganic Chemistry**, v. 65, p. 175–182, 2016.

HANCOCK, R. E. W.; HANEY, E. F.; GILL, E. E. The immunology of host defence peptides : beyond antimicrobial activity. **Nature Reviews**, v. 16, n. 5, p. 321–334, 2016.

HAZRATI, E. et al. Human α - and β -Defensins Block Multiple Steps in Herpes Simplex Virus Infection. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 12, p. 8658–8666, 2006.

HENRIQUES, S. T.; CRAIK, D. J. Cyclotides as templates in drug design. **Drug Discovery Today**, v. 15, p. 57–64, 2010.

HERENCIA, F. et al. Synthesis and anti-inflammatory activity of chalcone derivatives. **Bioorganic e Medicinal Chamistry Letters**, v. 8, p. 1169–1174, 1998.

HILL, J. M. et al. Herpes simplex virus latent phase transcription facilitates in vivo reactivation. **Virology**, v. 174, p. 117–125, 1990.

HONG, W. et al. Inhibitory activity and mechanism of two scorpion venom peptides against herpes simplex virus type 1. **Antiviral Research**, v. 102, p. 1–10, 2014.

HOSSAIN, H.; SHAHID-UD-DAULA, A.; JAHAN, I. Evaluation of antinociceptive and antioxidant potential from the leaves of *Spilanthes paniculata* growing in Bangladesh. **International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research**, v. 1, p. 178–186, 2012.

HUNG, P. Y. et al. *Houttuynia cordata* targets the beginning stage of herpes simplex virus infection. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–19, 2015.

HUSSAIN, W. et al. Medicinal plants: A repository of antiviral metabolites. **Future Virology**, v. 12, n. 6, p. 299–308, 2017.

ISRAF, D. A. et al. Cardamonin inhibits COX and iNOS expression via inhibition of p65NF-kappaB nuclear translocation and Ikappa-B phosphorylation in RAW 264.7 macrophage cells. **Molecular Immunology**, v. 44, n. 5, 2007.

JAMAL, H.; ANSARI, W. H.; RIZVI, S. J. Evaluation of chalcones: a flavonoid subclass, for, their anxiolytic effects in rats using elevated plus maze and open field behaviour tests. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 22, n. 6, p. 673–681, 2008.

JAMES, S. et al. Cardamonin inhibits colonic neoplasia through modulation of MicroRNA expression. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2017.

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

JENSSEN, H. et al. A wide range of medium-sized, highly cationic, α -helical peptides show antiviral activity against herpes simplex virus. **Antiviral Research**, v. 64, n. 2, p. 119–126, 2004.

JENSSEN, H. Therapeutic approaches using host defence peptides to tackle herpes virus infections. **Viruses**, v. 1, n. 3, p. 939–964, 2009.

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

KANG, H. et al. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a

patent review. **Journal of Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 1–12, 2017.

KARKHANEH, L. et al. Effect of transchalcone on atheroma plaque formation, liver fibrosis and adiponectin gene expression in cholesterol-fed NMRI mice. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 4, p. 720–727, 2016.

KATSORI, A. M.; LITINA, D. H. Chalcones in cancer: understanding their role in terms of QSAR. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 9, p. 1062–1081, 2009.

KENT, J. R. et al. Herpes simplex virus latency-associated transcript gene function. **Journal of Neurovirology**, v. 9, n. 3, p. 285–290, 2003.

KIAT, T. S. et al. Inhibitory activity of cyclohexenyl chalcone derivatives and flavonoids of fingerroot, *Boesenbergia rotunda* (L.), towards dengue-2 virus NS3 protease. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 12, p. 3337–3340, 2006.

KIM, H.; SON, K.; CHANG, H. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 96, p. 229–245, 2004.

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

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

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids : An Overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1–16, 2013.

LAGROTA, M. H. C. **Atividade antiviral in vitro de substâncias sintéticas e naturais**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1978.

LEIB, D. A.; BOGARD, C. L.; KOSZ-VNENCHACK, M. A deletion mutant of the latency associated transcript of herpes simplex virus type 1 reactivates from the latent state with reduced frequency. **Journal of Virology**, v. 63, p. 2893–2900, 1989.

LEIKINA, E. et al. Carbohydrate-binding molecules inhibit viral fusion and entry by crosslinking membrane glycoproteins. **Nature Immunology**, v. 6, n. 10, p. 995–1001, 2005.

LEJEUNE, T. M.; TSUI, H. Y.; PARSONS, L. B. Mechanism of action of two flavone isomers targeting cancer cells with varying cell differentiation status. **PLoS ONE**, v. 10, 2015.

LI, G. R. et al. Rational design of peptides with anti-HCV/HIV activities and enhanced specificity. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 78, n. 5, p. 835–843, 2011.

LI, N. et al. Comparative Evaluation of Cytotoxicity and Antioxidative Activity of 20 Flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 3876–3883,

2008.

LI, W. et al. Traditional chinese medicine as a potential source for hsv-1 therapy by acting on virus or the susceptibility of host. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10, p. 1–23, 2018.

LI, Y. et al. Cardamonin induces ROS-mediated G2/M phase arrest and apoptosis through inhibition of NF- κ B pathway in nasopharyngeal carcinoma. **Cell death & disease**, v. 8, n. 8, p. e3024, 2017.

LIU, X. et al. Screening and Rational Design of Hepatitis C Virus Entry Inhibitory Peptides Derived from GB Virus A NS5A. **Journal of Virology**, v. 87, n. 3, p. 1649–1657, 2013.

LOOKER, K. J. et al. First estimates of the global and regional incidence of neonatal herpes infection. **Lancet Glob Health**, v. 5, n. 3, p. 300–309, 2018.

LÓPEZ-LABRADOR, F. X.; BERENGUER, M.; NAVARRO, D. Overcoming drug resistance in HSV, CMV, HBV and HCV infection. **Future Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 1759–1766, 2015.

LORIZATE, M.; KRAUSSLICH, H.-G. Role of lipids in virus replication. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, p. 1–20, 2011.

LU, S. et al. Cardamonin reduces chemotherapy resistance of colon cancer cells via the TSP50/NF- κ B pathway in vitro. **Oncology Letters**, v. 15, p. 9641–9646, 2018.

MAHAPATRA, D. K.; BHARTI, S. K.; ASATI, V. Chalcone Derivatives: Anti-inflammatory Potential and Molecular Targets Perspectives. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 3146–3169, 2017.

MANSOUR, S. C.; FUENTE-NÚÑEZ, C. D. LA; HANCOCK, R. E. W. Peptide IDR-1018 : modulating the immune system and targeting bacterial biofilms to treat antibiotic-resistant bacterial infections. **Journal of Peptide Science**, v. 21, p. 323–329, 2015.

MANVAR, D. et al. Identification and evaluation of antihepatitis C virus phytochemicals from *Eclipta alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 3, p. 545–554, 2012.

MARCOCCI, M. E. et al. The Amphibian Antimicrobial Peptide Temporin B Inhibits In Vitro Herpes Simplex Virus 1 Infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 5, p. 1–13, 2018.

MÅRDBERG, K. et al. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein C is necessary for efficient infection of chondroitin sulfate-expressing gro2C cells. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 2, p. 291–300, 2002.

MARR, A. K. et al. Bovine lactoferrin and lactoferricin interfere with intracellular trafficking of Herpes simplex virus-1. **Biochimie**, v. 91, n. 1, p. 160–164, 2009.

MARTINS, F. O. et al. In vitro inhibitory effect of *Urera baccifera* (L.) Gaudich. extracts against herpes simplex. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 3, n. 11, p. 581–584, 2009.

MATANIC, V. C. A.; CASTILLA, V. Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against Junin virus and herpes simplex virus. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, n. 4, p. 382–389, 2004.

MATEEVA, N. et al. Functional evaluation of synthetic flavonoids and chalcones for potential antiviral and anticancer properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 2017.

MELLO, M. V. P. et al. A comprehensive review of chalcone derivatives as antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 150, p. 920–929, 2018.

MENENDEZ, C. M.; CARR, D. J. J. Defining nervous system susceptibility during acute and latent herpes simplex virus-1 infection. **Journal of Neuroimmunology**, v. 308, p. 43–49, 2017.

MERCORELLI, B.; PALÙ, G.; LOREGIAN, A. Drug Repurposing for Viral Infectious Diseases : How Far Are We ? **Trends in Microbiology**, v. 20, p. 1–12, 2018.

MIN, N. et al. A flavonoid compound library screen revealed potent antiviral activity of plant-derived flavonoids on human enterovirus A71 replication. **Antiviral Research**, v. 17, 2018.

MIROSSAY, L.; VARINSKÁ, L.; MOJŽIŠ, J. Antiangiogenic effect of flavonoids and chalcones: An update. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 1–28, 2018.

MOSMANN, T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

MUCSI, I.; GYULAI, Z.; BÉLÁDI, I. Combined effects of flavonoids and acyclovir against herpesviruses in cell cultures. **Acta Microbiologica Hungarica**, v. 39, n. 2, p. 137–147, 1992.

MULDER, K. C. L. et al. Current scenario of peptide-based drugs : the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1–23, 2013.

MURAKAMI, A. et al. Possible anti-tumor promoting properties of edible plants from thailand, and identification of an active constituent, cardamonin, of *boesenbergia pandurata*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, n. 11, p. 1971–1973, 1993.

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

- NAJAFIAN, M. et al. Core structure of flavonoids precursor as an antihyperglycemic and antihyperlipidemic agent: an in vivo study in rats. **Acta Biochimica Polonica**, v. 57, n. 4, p. 553–560, 2010.
- NAWAE, W.; HANNONGBUA, S.; RUENGJITCHATCHAWALYA, M. Molecular dynamics exploration of poration and leaking caused by Kalata B1 in HIV-infected cell membrane compared to host and HIV membranes. **Scientific Reports**, 2017.
- NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 464–472, 2011.
- NI, L.; MENG, C. Q.; SIKORSKI, J. A. Recent advances in therapeutic chalcones. **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 14, n. 12, p. 1669–1691, 2004.
- NISHIMURA, T.; TOKU, H.; FUKUYASHU, H. Antiviral compounds. XII. Antiviral activity of amidinohydrazones of alkoxyphenyl-substituted carbonyl compounds against influenza virus in eggs and in mice. **Kitasato Archives of Experimental Medicine**, v. 50, p. 39–46, 1977.
- NIYONSABA, F. et al. The innate defense regulator peptides human neutrophil functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 94, p. 159–170, 2013.
- NOWAKOWSKA, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 125–137, 2007.
- OLIVEIRA, A. F. C. DA S. et al. Potential Antivirals: Natural Products Targeting Replication Enzymes of Dengue and Chikungunya Viruses. **Molecules**, v. 22, n. 3, p. 505, 2017.
- PACHÓN-IBÁÑES, M. E. et al. Perspectives for clinical use of engineered human host defense antimicrobial peptides. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 323–342, 2017.
- PALHARES, R. M. et al. Medicinal plants recommended by the world health organization: DNA barcode identification associated with chemical analyses guarantees their quality. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–29, 2015.
- PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, n. 47, p. 1–15, 2016.
- PARK, J.-Y. et al. Chalcones isolated from *Angelica keiskei* inhibit cysteine proteases of SARS-CoV. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, p. 1–8, 2015.
- PARK, N. .; PAVAN-LANGSTON, D.; MCLEAN, S. . Acyclovir in oral and ganglionic herpes simplex virus infections. **Journal of Infectious Diseases**, v. 140, n. 5, p. 802–806, 1979.

PERNG, G. C. et al. Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency- associated transcript. **Science**, v. 287, p. 1500–1503, 2000.

PINNINTI, S. G.; KIMBERLIN, D. W. Neonatal herpes simplex virus infections. **Seminars in Perinatology**, v. 42, n. 3, p. 168–175, 2018.

PIRET, J.; BOIVIN, G. Antiviral resistance in herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections: Diagnosis and management. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 29, n. 6, p. 654–662, 2016.

POSSAS, C. et al. Zika puzzle in Brazil: peculiar conditions of viral introduction and dissemination - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, 2017.

QAVI, H. B.; HESSEL, T. The Efficacy of Antiviral Components from Plant Products against Herpes Simplex Virus Type 1. **Annals of Virology and Research**, v. 1, n. 1, p. 1001, 2015.

RABINSTEIN, A. A. Herpes Virus Encephalitis in Adults: Current Knowledge and Old Myths. **Neurologic Clinics**, v. 35, n. 4, p. 695–705, 2017.

RECHENCHOSKI, D. Z. et al. Herpesvirus: an underestimated virus. **Folia Microbiologica**, v. 62, n. 2, p. 151–156, 2017.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent end points. **The American Journal of Hygiene**, v. 27, n. 5, 1938.

RIBEIRO, S. M. et al. Antibiofilm peptides increase the susceptibility of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to β -lactam antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 7, p. 3906–3912, 2015.

SAHU, N. K. et al. Exploring Pharmacological Significance of Chalcone Scaffold: A Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 209–225, 2012.

SALES, E. K.; MOHADDES, G.; ALIPOUR, M. R. Chalcones as putative hepatoprotective agents: Preclinical evidence and molecular mechanisms. **Pharmacological Research**, v. 129, p. 177–187, 2018.

SANTOS, N. S. DE O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Virologia Humana**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

SHARTOUNY, J. R.; JACOB, J. Mining the tree of life : Host defense peptides as antiviral therapeutics. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, p. 1–9, 2018.

SHESTAKOV, A. et al. Synthetic analogues of bovine bactenecin dodecapeptide reduce herpes simplex virus type 2 infectivity in mice. **Antiviral Research**, v. 100, n. 2, p. 455–459, 2013.

SILVA, O. N. et al. Host-defense peptides and their potential use as biomarkers in human diseases. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 9, p. 1666–1671, 2018.

SIMEON, S. et al. PepBio: Predicting the bioactivity of host defense peptides. **The Royal Society of Chemistry Advances**, v. 7, n. 56, p. 35119–35134, 2017.

SKOREŃSKI, M.; SIENĆZYK, M. Anti-herpesvirus agents: a patent and literature review (2003 to present). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 24, n. 8, p. 925–41, 2014.

SMITH, J. G.; NEMEROW, G. R. Mechanism of adenovirus neutralization by human alpha-defensins. **Cell Host & Microbe**, v. 3, p. 11–19, 2008.

SRIVASTAVA, N.; BEZWADA, R. **Flavonoids: The Health Boosters**. Hillsborough NJ: Indofine Chemical Company, 2015.

STEINSTRÄESSER, L. et al. Innate Defense Regulator Peptide 1018 in Wound Healing and Wound Infection. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. 1–7, 2012.

SUN, E. et al. Host defense (antimicrobial) peptides. In: **Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering**. Vancouver, Canadá: Elsevier Ltd, 2018. p. 253–285.

TAKEUCHI, H.; BABA, M.; SHIGETA, S. An application of tetrazolium (MTT) calorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. **Journal of Virological Methods**, v. 33, p. 61–71, 1991.

TAMARGO, J.; LE HEUZEY, J. Y.; MABO, P. Narrow therapeutic index drugs: A clinical pharmacological consideration to flecainide. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 71, n. 5, p. 549–567, 2015.

TEWTRAKUL, S. et al. HIV-1 protease inhibitory substances from the rhizomes of *Boesenbergia pandurata* Holtt. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 25, n. 4, p. 503–508, 2003.

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

TIWARI, V.; TARBUTTON, M. S.; SHUKLA, D. Diversity of heparan sulfate and HSV entry: Basic understanding and treatment strategies. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2707–2727, 2015.

TSUCHIYA, H. Effects of red wine flavonoid components on biomembranes and cell proliferation. **International Journal of Wine Research**, v. 3, n. 1, p. 9–17, 2011.

TSUCHIYA, H. Membrane interactions of phytochemicals as their molecular mechanism applicable to the discovery of drug leads from plants. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 18923–18966, 2015.

TYRING, S. K.; BAKER, D.; SNOWDEN, W. Valacyclovir for Herpes Simplex Virus Infection: Long-Term Safety and Sustained Efficacy after 20 Years' Experience with

Acyclovir. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. s1, p. 40–46, 2002.

UCHIUMI, F. et al. Transcriptional Suppression of the HIV Promoter by Natural Compounds. **antiviral Research**, v. 58, n. 1, p. 89–98, 2003.

VANCOMPERNOLLE, S. E. et al. Antimicrobial Peptides from Amphibian Skin Potently Inhibit Human Immunodeficiency Virus Infection and Transfer of Virus from Dendritic Cells to T Cells. **Journal of Virology**, v. 79, n. 18, p. 11598–11606, 2005.

VIEIRA, M. DO C.; VIEIRA, S. C. H.; ZÁRATE, N. A. H. **Características agromedicinais de quatro espécies de plantas do cerrado: no estado nativo e cultivadas**. 1. ed ed. Dourados, MS: Seriemá, 2016.

VILAS BOAS, L. C. P. **Avaliação da atividade antiviral de peptídeos sintéticos contra o Herpes vírus humano 1 e o Aichivírus**. [s.l.] Universidade Católica de Brasília, 2014.

VISINTINI, J. M. F. et al. In vitro antiviral activity of plant extracts from Asteraceae medicinal plants. **Virology Journal**, v. 10, 2013.

WANG, W. et al. Activity of - and -Defensins against Primary Isolates of HIV-1. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 1, p. 515–520, 2004.

WANG, W. Y. et al. Bovine Lactoferrampin, Human Lactoferricin, and Lactoferrin 1-11 Inhibit Nuclear Translocation of HIV Integrase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 179, n. 7, p. 1202–1212, 2016.

WHITLEY, R. J.; ROIZMAN, B. Herpes Simplex Virus Infections. **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant**, v. 357, p. 1513–1518, 2001.

WILSON, S. S.; WIENS, M. E.; SMITH, J. G. Antiviral Mechanisms of Human Defensins. **Journal of Molecular Biology**, v. 425, n. 24, p. 1–26, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO guidelines for the treatment of genital herpes simplex virus**. Geneva, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Herpes simplex virus**. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>>. Acesso em: 20 set. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Managing epidemics: key facts about major deadly diseases**. Geneva, 2018.

YAMAMOTO, T. et al. Anti-allergic activity of naringenin chalcone from a tomato skin extract. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 68, n. 8, p. 1706–1711, 2004.

YASIN, B. et al. Evaluation of the Inactivation of Infectious Herpes Simplex Virus by Host-Defense Peptides. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 19, n. 3, p. 187–194, 2000.

ZAKARYAN, H. et al. Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. **Archives of Virology**, v. 162, n. 9, p. 2539–2551, 2017.

ZENG, Z. et al. Histidine-rich modification of a scorpion-derived peptide improves bioavailability and inhibitory activity against HSV-1. **Theranostics**, v. 8, n. 1, p. 199–211, 2018.

ZHOU, B.; XING, C. Diverse Molecular Targets for Chalcones with Varied Bioactivities. **Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 8, p. 388–404, 2015.

ZHU, W.; LI, J.; LIANG, G. How does Cellular Heparan Sulfate Function in Viral Pathogenicity? **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 24, n. 1, p. 81-87, 2011.

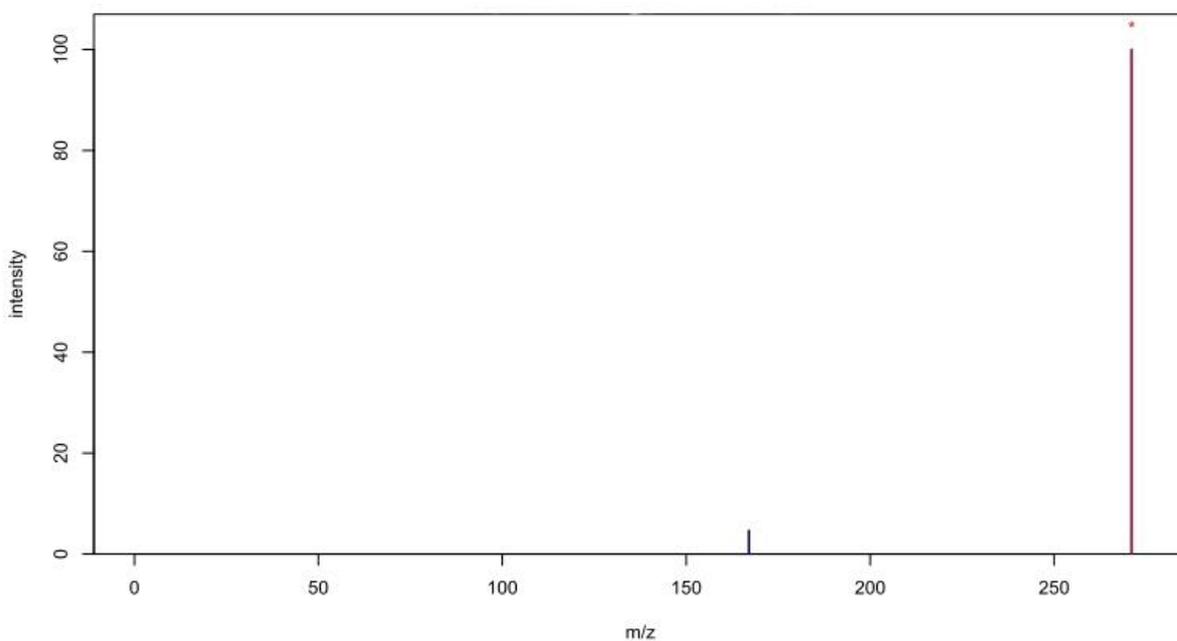
ZHUANG, C. et al. Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 12, p. 7762–7810, 2017.

ANEXO

ANEXO A

Espectro de massas da chalcona cardamonina (massa: 270.08). A molécula foi sintetizada em laboratório e analisada em espectrômetro de massas (Sigma-Aldrich). As informações sobre as massas, fórmula química e estrutura estão disponíveis no banco de dados de metabolômica METLIN:

(<http://metlin.scripps.edu/metaboinfo.php?molid=52049>).



ANEXO B

Espectros dos peptídeos IDR-1018 (A) e DJK-6 (B), analisados em espectrômetro de massas MALDI-ToF/ToF.

