



BIANCA REAL BIANCHI

**“ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-HERPÉTICA DE ISOLADOS DE  
ORGANISMOS MARINHOS”**

**CAMPINAS  
2012**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

**BIANCA REAL BIANCHI**

**“ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-HERPÉTICA DE ISOLADOS DE  
ORGANISMOS MARINHOS”**

**Orientadora: Profa. Dra. Clarice Weis Arns**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Luciana Konecny Kohn**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para  
obtenção de título de Mestre(a) em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA  
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA BIANCA REAL  
BIANCHI E ORIENTADO PELO PROF. DR. CLARICE WEIS  
ARNS.**

Assinatura do Orientador(a)

-----

**CAMPINAS**  
**2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

B47e Bianchi, Bianca Real, 1987-  
Estudo da atividade anti-herpética de isolados de organismos marinhos / Bianca Real Bianchi. --  
Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Clarice Weis Arns.  
Coorientador : Luciana Konecny Kohn.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Herpesvirus humano 1. 2. Antivirais. 3. Triagem. I.  
Arns, Clarice Weis, 1956-. II. Kohn, Luciana Konecny  
III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Study of anti-herpetic activity of isolated from marine organisms.

**Palavras-chave em inglês:**

Herpesvirus 1, Human

Antiviral agents

Diagnosis

**Área de concentração:** Clínica Médica

**Titulação:** Mestra em Clínica Médica

**Banca examinadora:**

Clarice Weis Arns [Orientador]

Carmem Lucia Queiroga

Maria Judite Bittencourt Fernandes

**Data da defesa:** 12-12-2012

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Médica

---

**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO**

BIANCA REAL BIANCHI

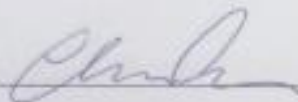
---

Orientador (a) PROF(A). DR(A). CLARICE WEIS ARNS

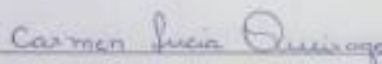
---

**MEMBROS:**

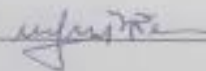
1. PROF(A). DR(A). CLARICE WEIS ARNS



2. PROF(A). DR(A). CARMEN LUCIA QUEIROGA



3. PROF(A). DR(A). MARIA JUDITE BITTENCOURT FERNANDES



---

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas

Data: 12 de dezembro de 2012



## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha família, mãe, Rafa pela compreensão e estarem sempre ao meu lado. Dedico ao meu marido pelo seu carinho, atenção, apoio, e por acreditar em mim.*

*Dedico também aos meu avós, Emília e Carlos (in memoriam), pelo apoio que sempre me deram e, ao meu avô, por ter sido o exemplo de homem que foi em minha vida.*





## AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente à Deus, pela vida e pela melhor indicação dada à mesma;*

*Minha família, mãe e irmão, por sempre me apoiarem e acreditarem no meu potencial;*

*Meu marido, por estar sempre ao meu lado, acreditando em mim e me apoiando;*

*Aos meu avós, Emília e Carlos (in memoriam), por todo apoio e carinho que sempre me deram;*

*À minha orientadora Profa. Dra. Clarice Weis Arns, por acreditar no meu trabalho e ter me dado esta oportunidade;*

*À minha co-orientadora Lu Kohn, pela paciência e orientação;*

*Aos meu colegas de laboratório (LVA) pelo aprendizado que vai além do profissional e pela amizade que construí com alguns de vocês;*

*Aos professores da banca, por terem aceitado meu convite;*

*À UNICAMP e ao LVA, pelo apoio material e uso de equipamentos;*

*À FCM pelo espaço cedido;*

*À CAPES e FUNCAMP pelo apoio financeiro;*

*E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho!*



*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;  
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.  
As facilidades nos impedem de caminhar.  
Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”*

*Chico Xavier*



## SUMÁRIO

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| <b>1.</b> | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                    | <b>01</b> |
|           | <b>1.1. Herpesvírus.....</b>              | <b>01</b> |
|           | <b>1.1.1. Morfologia do HSV-1.....</b>    | <b>02</b> |
|           | <b>1.1.2. Manifestações Clínicas.....</b> | <b>04</b> |
|           | <b>1.1.3. Ciclo Replicativo.....</b>      | <b>05</b> |
|           | <b>1.1.4. Latência.....</b>               | <b>11</b> |
|           | <b>1.2. Organismos Marinhos.....</b>      | <b>16</b> |
|           | <b>1.2.1. Antivirais.....</b>             | <b>18</b> |
| <b>2.</b> | <b>OBJETIVOS.....</b>                     | <b>23</b> |
|           | <b>2.1. Geral.....</b>                    | <b>23</b> |
|           | <b>2.2. Específicos.....</b>              | <b>23</b> |
| <b>3.</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>            | <b>25</b> |
|           | <b>3.1. Linhagem Celular e Vírus.....</b> | <b>25</b> |
|           | <b>3.2. Multiplicação Viral.....</b>      | <b>26</b> |
|           | <b>3.3. Titulação Viral.....</b>          | <b>27</b> |
|           | <b>3.4. Preparo dos extratos.....</b>     | <b>28</b> |
|           | <b>3.5. Avaliação Antiviral.....</b>      | <b>29</b> |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 3.5.1.   | Ensaio Antiviral (Triagem).....  | 30 |
| 3.5.2.   | Ensaio Colorimétrico MTT.....  | 32 |
| 3.5.2.1. | Curva de crescimento viral.....  | 33 |
| 3.5.2.2. | Cálculo do Índice de Seletividade.....                                       | 34 |
| 3.5.3.   | Estudo da Atividade Antiviral nas diferentes fases do ciclo replicativo..... | 36 |
| 4.       | RESULTADOS.....  | 39 |
| 4.1.     | Ensaio Antiviral (Triagem).....  | 39 |
| 4.2.     | Curva de Crescimento Viral.....  | 47 |
| 4.2.1.   | Cálculo do Índice de Seletividade.....                                       | 48 |
| 4.3.     | Estudo da Atividade Antiviral em diferentes fases do ciclo replicativo.....  | 49 |
| 5.       | DISCUSSÃO.....   | 51 |
| 6.       | CONCLUSÃO.....   | 55 |
| 6.1.     | Geral.....   | 55 |
| 6.2.     | Específicos.....   | 55 |
| 7.       | REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....  | 57 |

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 01:** Desenho esquemático da morfologia do HSV-1. Disponível em <http://moikompa.ru/compas/netesov>, acesso em 18/10/2012.....02

**Figura 02:** Lesões labiais causadas pelo HSV-1. Disponível em <http://www.mdsaude.com/2012/04/herpes-labial.html>, acesso em 18/10/2012.....04

**Figura 03:** Esquema representativo da adsorção e penetração do HSV-1 na célula hospedeira. a.) na fase de adsorção, os receptores de heparan sulfato presentes na membrana celular ligam-se com as gB e gC., b.) após a ligação de gB e gC, ocorre a ligação de gD em três diferentes receptores celulares secundários. c.) no início da fase de penetração, ocorre a fusão da membrana celular com o vírus. d.) ocorre a penetração do vírus sem seu envelope, ocorrendo uma segunda fusão na membrana nuclear, onde o vírus transportará para dentro do núcleo apenas seu material genético. Disponível em <http://darwin.bio.uci.edu/~faculty/wagner/hsv4f.htm>, acesso em 15/, acesso em 25/02/2011.....07

**Figura 04:** Esquema representativo montagem do nucleocapsídeo viral no interior do núcleo celular. Disponível em <http://darwin.bio.uci.edu/~faculty/wagner/hsv4f.htm>, acesso em 15/, acesso em 25/02/2011.....09

**Figura 05:** Esquema representativo das fusões das membranas interna e externa do núcleo celular com o vírus, re-envelopamento viral, finalizando na liberação das partículas virais da célula hospedeira. Disponível em <http://darwin.bio.uci.edu/~faculty/wagner/hsv4f.htm>, acesso em 15/, acesso em 25/02/2011.....10

**Quadro 01:** Proteínas e Glicoproteínas envolvidas no processo de latência do HSV-1.....13

**Figura 06:** Esquema representativo das etapas de infecção e latência do HSV-1. A.) Infecção Primária: originada pela infecção de células epiteliais. Após o vírus chegar ao neurônio, o nucleocapsídeo é transportado através do mesmo até o núcleo, onde o DNA viral é liberado e os genes associados à latência são expressos. B.) Infecção Recorrente: Após estímulos ainda não identificados, ocorre a reativação do ciclo, iniciando a expressão dos genes de infecção lítica. Os nucleocapsídeos são transportados para a porção terminal do neurônio, onde as partículas virais serão liberadas a partir do axônio, infectando as células epiteliais, resultando na infecção recorrente. Adaptado de LUCKEMEYER, 2009.....16

**Figura 07:** Desenho esquemático das diferentes fases do ciclo replicativo onde o vírus poderá interferir: A: Inativação Viral; B: Adsorção; C: Replicação. Figura adaptada de Flint et al., 2000.....19

**Figura 08:** Linhagem Celular Vero (50x de aumento).....25

**Figura 09:** Linhagem Celular Vero, com efeito citopático viral (direita) (100x de aumento).....26

**Figura 10:** Microplaca de 96 orifícios com diluições sequenciais do HSV-1 na base 10....27

**Figura 11:** Desenho esquemático da disposição de extratos, vírus e controles na microplaca de 96 orifícios, utilizada para o ensaio antiviral.....31



|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 12:</b> o MTT, que possui coloração amarela, liga-se à enzima LDH de mitocôndrias de células viáveis, formando cristais de formazan de coloração violeta.....  | 32 |
| <b>Figura 13:</b> Esquema do espaço utilizado na microplaca e suas diversas concentrações virais.....  | 34 |
| <b>Tabela 01:</b> Lista de todas as amostras testadas, bem como os resultados diários comparados com o controle viral. Em destaque encontram-se os extratos ativos, ou seja, aqueles que apresentaram 97% ou mais de inibição viral..... | 40 |
| <b>Tabela 02:</b> Porcentagem de Inibição Viral apresentada pelas amostras consideradas ativas.....  | 46 |
| <b>Tabela 03:</b> Extratos ativos identificados, utilizados para próximas análises.....  | 47 |
| <b>Gráfico 1:</b> Determinação do tempo de leitura e concentração viral para as análises de ensaio colorimétrico MTT.....  | 48 |
| <b>Tabela 04:</b> Identificação da fase do ciclo replicativo nas quais os extratos ativos agem, inibindo o efeito viral.....   | 49 |
| <b>Tabela 05:</b> Valores dos índices de Seletividade apontados para extratos de fungos e esponjas que mostraram-se ativos.....  | 50 |



## LISTA DE NOTAÇÕES

|                  |                           |
|------------------|---------------------------|
| %                | Porcentagem               |
| $\geq$           | Maior ou igual            |
| °C               | Graus Celsius             |
| $\mu\text{g/mL}$ | Microgramas por mililitro |
| $\mu\text{L}$    | Microlitro                |
| antilog          | Anti-logaritmo            |
| g                | Gramas                    |
| h / hs           | Hora / horas              |
| Kb               | Quilobases                |
| log              | Logarítimo                |
| $\text{mg/mL}$   | Miligramas por mililitro  |
| mL               | Mililitro                 |
| nm               | Nanômetro                 |



## LISTA DE ABREVIATURAS

|                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| AcOEt                                 | Acetato de Etila  |
| ACV                                   | Aciclovir trifosfatado  |
| AZT                                   | azidotimidina   |
| C                                     | Citosina  |
| CC50                                  | Concentração de extrato capaz de inibir 50% crescimento celular |
| CMNT                                  | Concentração máxima não tóxica                                  |
| CO <sub>2</sub>                       | Dióxido de carbono  |
| CPE                                   | Efeito citopático   |
| Ct                                    | Controle  |
| DI                                    | Doses infectantes   |
| DMSO                                  | Dimetilsulfóxido de sódio                                       |
| DNA                                   | Ácido desoxirribonucléico                                       |
| FAPESP                                | Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo            |
| G                                     | Guanina   |
| gB, gC, gD, gE, gG,<br>gI, gH, gL, gM | Glicoproteínas  |
| HIV                                   | Human immunodeficiency vírus                                    |
| HSV-1                                 | Vírus do herpes simplex tipo 1                                  |
| HSV-2                                 | Vírus do herpes simplex tipo 2                                  |

|                |  |
|----------------|--|
| HSV-3          | Vírus do herpes simplex tipo 3   |
| HSV-4          | Vírus do herpes simplex tipo 4   |
| HSV-5          | Vírus do herpes simplex tipo 5   |
| HSV-6          | Vírus do herpes simplex tipo 6   |
| HSV-7          | Vírus do herpes simplex tipo 7   |
| HVEM           | Mediador de entrada de herpesvírus   |
| IC50           | Concentração de extrato capaz de inibir 50% crescimento viral                                  |
| IE             | Genes imediatos precoces   |
| IIV            | Índice de inibição viral   |
| IQSC-USP       | Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo                                 |
| IS             | Índice de seletividade   |
| LAT            | Transcritos associados à latência  |
| LDH            | lactato desidrogenase  |
| LVA-IB-UNICAMP | Laboratório de Virologia Animal – Instituto de Biologia –<br>Universidade Estadual de Campinas |
| MEM            | Meio essencial mínimo  |
| MeOH           | Metanol  |
| MOI            | Multiplicity of Infection  |
| mRNA           | RNA mensageiro   |
| MTT            | [3-(4,5-dimethylthiazol-z-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide]                                |
| NGF            | Fator de crescimento dos nervos  |
| pG1            | Glicoproteína específica do tipo 1   |

|      |  |
|------|--|
| pG2  | Glicoproteína específica do tipo 2     |
| PI   | Porcentagem de inibição                |
| SFB  | Soro fetal bovino                      |
| T    | Tratado                                |
| TQ   | Timina quinase                         |
| UFSC | Universidade Federal de Santa Catarina |
| VERO | African green monkey kidney cells      |





## RESUMO

O vírus herpes simples do tipo 1 (HSV-1), agente etiológico do herpes labial em humanos, é facilmente transmitido e têm o grande problema de causar infecções latentes, sendo que uma vez infectado, o indivíduo passa a ser o portador do vírus por toda a vida. O medicamento mais apropriado contra este tipo de vírus deve ter ação inibitória em qualquer estágio de sua replicação, além de baixa toxicidade, para que as células do hospedeiro não sejam afetadas. Os organismos marinhos representam uma vasta biodiversidade que inclui cerca de 80% de todas as espécies do planeta, o que nos leva a uma grande quantidade de informações que ainda poderão ser descobertas, inclusive acerca de compostos com atividade antiherpética, já que atualmente temos poucos medicamentos disponíveis e nem sempre de total eficácia. Para o estudo com HSV-1 foi escolhida a cepa KOS, por ser resistente ao medicamento considerado mais eficaz para o herpes humano, o aciclovir. Foi utilizada a linhagem celular VERO para o estudo da atividade antiviral de extratos de organismos marinhos. Inicialmente foi realizada uma triagem com 129 extratos. Utilizou-se a concentração de 50µg/ml para todos os extratos, considerando ativos aqueles que apresentaram 97% de inibição do crescimento viral. Dentro dos grupos analisados foram identificados 6 extratos brutos de fungos e 7 extratos brutos de esponjas marinhas como possíveis antivirais. O cálculo do Índice de Seletividade foi realizado para as amostras de fungos *Demateaceous* (grupo) e *Trichoderma* sp., apresentando os valores 0,03 e 0,3, com atividade nas fases de adsorção e inativação viral, respectivamente e, para as amostras de esponjas, *Monanchora arbuscula* e *Hemimycale* sp., ambas apresentando o valor 0,1, com atividade também nas fases de adsorção e inativação viral, respectivamente.



## ABSTRACT

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1), the etiologic agent of herpes labialis in humans, is transmitted easily and have great problem to cause latent infections, and once infected, the individual becomes the carrier of the virus by life. The most suitable medicament against such virus should have inhibitory action at any stage of its replication as well as low toxicity to the host cells are not impaired. Marine organisms represent a wide biodiversity that includes about 80% of all species on the planet, which leads to a large amount of information that can still be found, including about compounds that may help a possible treatment of symptoms caused by this virus, since currently available medicines have few and not always fully effective. For the study of HSV-1, the KOS strain was chosen because it is resistant to the drug considered most effective for the human herpes, the acyclovir. Was used the cell lines VERO (African Green Monkey - ATCC CCL 81) for the study the antiviral activity of extracts of marine organisms. Initially was realized a screening with 129. We used the concentration of 50µg/ml for all the extracts, whereas those with active 97% inhibition of viral growth. Within the groups analyzed were identified 6 extracts of fungus and 7 crude extracts of marine sponges as possible antiviral. The calculation of the Selectivity Index was conducted for samples of fungi Demateaceous (group) and *Trichoderma* sp., presenting the values 0.03 and 0.3 with activity phases of adsorption and viral inactivation, respectively, and for samples of sponges, *Monanchora arbuscula* and *Hemimycale* sp. both presenting the value 0.1, with activity also in the phases of adsorption and viral inactivation, respectively.

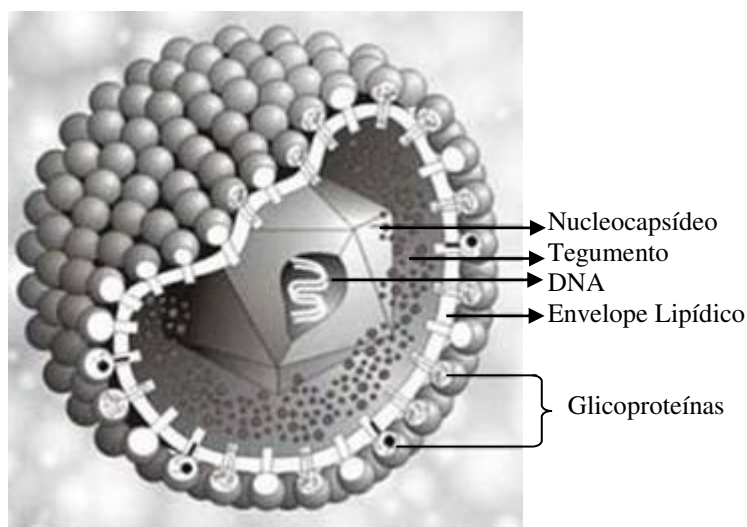
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Herpesvírus

O vírus do herpes humano, tipo 1 (HSV-1) pertence à família *Herpesviridae* e à sub-família *Alphaherpesvirinae* (Cunha et al., 2008). Dentro da família *Herpesviridae*, foram isolados cerca de 100 herpesvírus, deste sendo 8 patogênicos para o ser humano: HSV-1 e 2 (subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Simplexvirus*), com quadro clínico de herpes lábil e genital, respectivamente; HSV-3 (subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus*), com quadro clínico de catapora e herpes-zóster; HSV-4 (subfamília *Betaherpesvirinae* e gênero *Lymphocryptovirus*), com quadro clínico de linfomas e leucoplasia pilosa; HSV-5 (subfamília *Betaherpesvirinae* e gênero *Cytomegalovirus*), com quadro clínico de citomegalia; HSV-6 e 7 (subfamília *Gammaherpesvirinae* e gênero *Roseolovirus*), com quadro clínico de exantema súbito para o HSV-6 e nenhum para o HSV-7; e HSV-8 (subfamília *Gammaherpesvirinae* e gênero *Rhadinovirus*), com quadro clínico de sarcoma de Kaposi (Mehnert & Candeias, 2004). Entre si não são identificados por aspectos morfológicos, mas sim antigenicamente por sorologia e molecular. Além disso, uma diferença que pode ser observada é o fato dos vírus da sub-família *Alphaherpesvirinae* apresentarem lesões na pele e mucosas e os das sub-famílias *Beta* e *Gammaherpesvirinae* apresentarem manifestações sistêmicas (Mehnert & Candeias, 2004).

### 1.1.1. Morfologia do HSV-1

Com tamanho variando entre 120-300nm (Mehnert & Candeias, 2004), é considerada uma partícula grande, constituída de 4 partes: *core* eletrodens com DNA viral (Miranda et al., 2002); capsídeo icosaédrico, circundante ao *core*; camada protéica não estruturada entre o capsídeo e o envelope, denominada tegumento; envelope de bicamada lipídica exterior com picos em sua superfície (Yousefi, 2011) (Figura 01).



**Figura 01:** Desenho esquemático da morfologia do HSV-1. Disponível em <http://moikompa.ru/compas/netesov>, acesso em 18/10/2012.

O *core* é composto de DNA fita dupla, linear, em forma de tora, com distância que varia de 125-240kb, mantida por fibrilas protéicas presas ao capsídeo (Mehnert & Candeias, 2004) e nucleocapsídeo viral com uma única cópia do DNA duplo linear

(Boehmer & Nimonkar, 2003), sendo que o conteúdo de C+G varia de 31-75% (Mehnert & Candeias, 2004).

O capsídeo é composto por 162 capsômeros arranjados em um T=16 com simetria icosaédrica, sendo 150 hexaméricos e 12 pentaméricos (Miranda et al., 2002). A outra casaca do capsídeo consiste em 4 proteínas: VP5, VP26, VP23 e VP19, sendo que a VP5 é a maior proteína do capsídeo, presente tanto nos capsômeros pentâmeros quanto nos hexômeros. A VP26 está presente nos capsômeros hexômeros. Uma molécula de VP19 e duas de VP23 compõem a tríplice que liga os capsômeros adjacentes. O capsídeo também contém VP24, a protease e UL16 que está envolvida na encapsidação do DNA (Yousefi, 2011).

Entre o capsídeo e o envelope há uma camada de proteínas amorfas, o tegumento, importante para a regulação do ciclo replicativo viral (Miranda et al., 2002). Composto de no mínimo 20 proteínas virais com a capacidade de degradação celular e mRNA viral, o tegumento possui proteínas como VP22, que desempenha a função de espalhar o vírus de célula para célula e VP16, que possui o virion com fator transativador (Yousefi, 2011).

Seu envelope é derivado de uma membrana citoplasmática hospedeira, contém uma bicamada lipídica com 11 proteínas transmembranas virais incorporadas, como as glicoproteínas gB, gC, gD, gE, gG, gI, gH, gL, gM e duas intrínsecas não glicosiladas membranas protéicas Us9 e UL20 (Yousefi, 2011). Este envelope externo possui variabilidade genética limitada, além de não haver variação sazonal na incidência de sua infecção (Cunha et al., 2008).

Sua partícula viral é frágil, visto que o envelope lipídico é susceptível ao tratamento químico com solventes orgânicos, detergentes e proteases, e tratamento físico como calor (60°C) ou radiação ionizante e não-ionizante (Santos et al., 2002).

### 1.1.2. Manifestações Clínicas

Este vírus é o agente etiológico de 80-90% dos casos de herpes labial e 10-20% dos casos de herpes genital, ao contrário do HSV-2. Uma das diferenças entre o HSV-1 e o HSV-2 é a glicoproteína específica, sendo a pG1 para o HSV-1 e a pG2 para o HSV-2 (Costa et al., 2010). Sua transmissão ocorre por contato direto da mucosa ou da pele com algum tipo de lesão (Figura 02), com as secreções que contenham este vírus (Brady & Bernstein, 2004).



**Figura 02:** Lesões labiais causadas pelo HSV-1. Disponível em <http://www.mdsauade.com/2012/04/herpes-labial.html>, acesso em 18/10/2012.

Podem ocorrer três tipos de infecções: infecção primária, que pode ser assintomática ou sintomática, apresentando, neste caso, quadros de febre, úlceras na garganta, lesões vesiculares e ulcerativas, gengivo-estomatite, edema e outros; infecção neonatal, que pode ocorrer *in utero*, durante ou após o parto; e infecção do sistema nervoso central, que pode apresentar encefalite hemorrágica focal (Santos et al., 2002; Mehnet & Candeias, 2004).

### **1.1.3. Ciclo Replicativo**

Todo os tipos de infecções deste vírus utilizam-se do ciclo replicativo do mesmo, que inicia-se com a adsorção, passando pelas etapas de penetração e desnudamento, transcrição, tradução e replicação, e finalmente, a fase de montagem e liberação dos vírions.

Na primeira etapa, a *adsorção*, há a ligação dos receptores de membrana celulares com os receptores da partícula viral. O heparan sulfato, por exemplo, apresenta sítio de adsorção celular, podendo ligar-se tanto com as glicoproteínas B (gB) quanto com as glicoproteínas C (gC) do envelope viral. Após esta primeira ligação, a glicoproteína D (gD) do envelope viral pode ligar-se com até 3 tipos distintos de receptores celulares secundários:



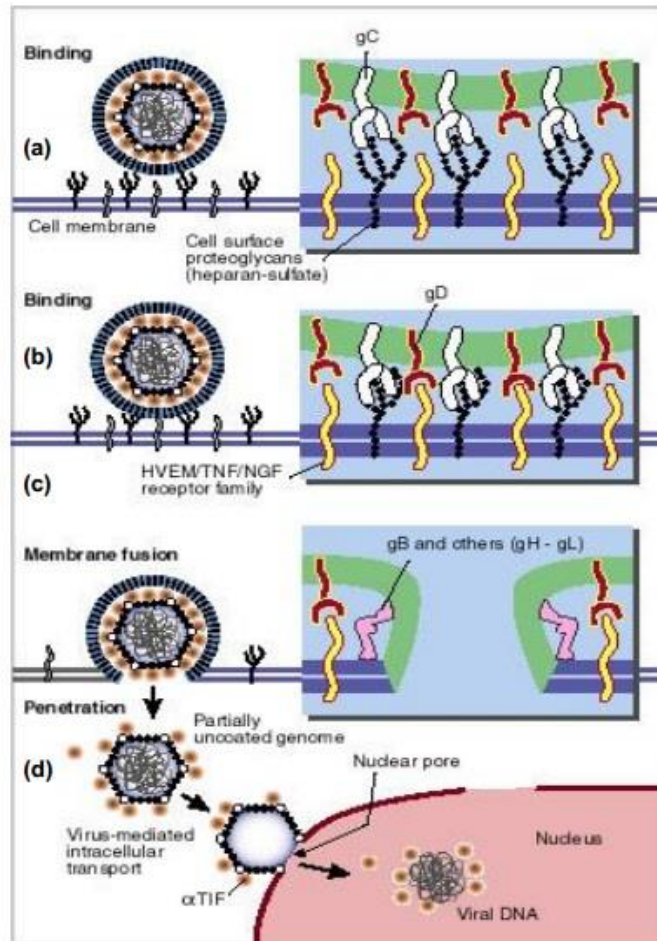
- o mediador de entrada de herpesvírus (HVEM- herpes entry mediator), membro da superfamília dos receptores do TNF/NGF;

- os receptores da família da Nectina-1 e Nectina-2, membro da superfamília das imunoglobulinas;

- e moléculas de heparan sulfato modificadas em sítios específicos pela ação da enzima 3-O-sulfotransferase.

Apesar da gD ser encontrada abundantemente nas células infectadas, sua quantidade necessária é mínima. Estas ligações secundárias são as responsáveis pela entrada do vírus na célula hospedeira (Barbosa, 2009).

Na segunda etapa, a de *penetração e desnudamento*, ocorre uma fusão da membrana da superfície celular com o vírus, fazendo com que este perca seu envelope e penetre na célula hospedeira, migrando para o núcleo celular apenas com as proteínas do tegumento aparentemente acopladas ao capsídeo. Quando o nucleocapsídeo alcança os poros do núcleo ocorre outra fusão, fazendo com que apenas o material genético seja transportado para dentro do núcleo (Whitley & Roizman, 2001) (Figura 03).

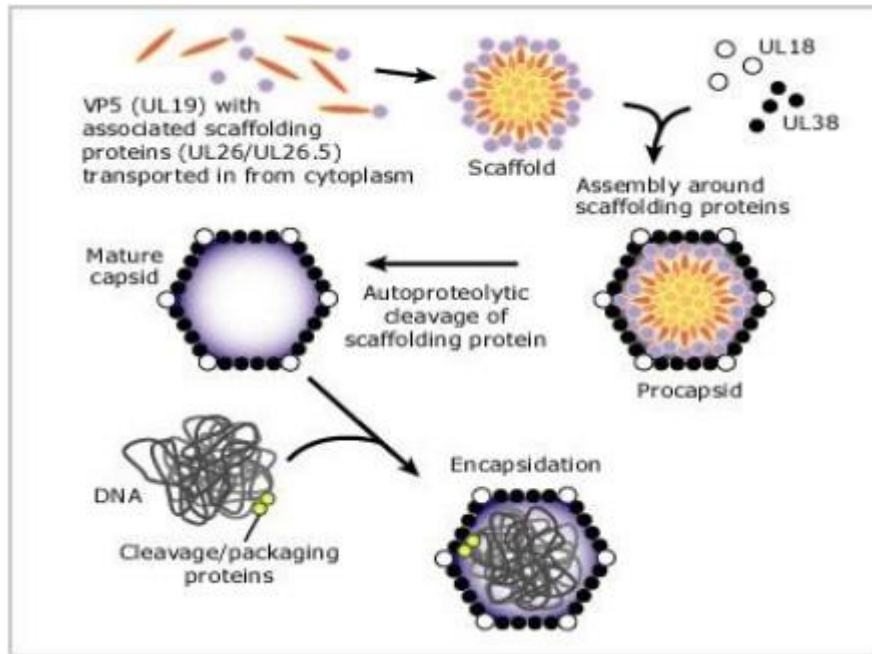


**Figura 03:** Esquema representativo da adsorção e penetração do HSV-1 na célula hospedeira. a.) na fase de adsorção, os receptores de heparan sulfato presentes na membrana celular ligam-se com as gB e gC., b.) após a ligação de gB e gC, ocorre a ligação de gD em três diferentes receptores celulares secundários. c.) no início da fase de penetração, ocorre a fusão da membrana celular com o vírus. d.) ocorre a penetração do vírus sem seu envelope, ocorrendo uma segunda fusão na membrana nuclear, onde o vírus transportará para dentro do núcleo apenas seu material genético. Disponível em <http://darwin.bio.uci.edu/~faculty/wagner/hsv4f.htm>, acesso em 15/, acesso em 25/02/2011.

A terceira etapa é dividida em três partes: *transcrição, tradução e replicação*. Nesta etapa, a transcrição e síntese protéica ocorrem de forma coordenada, reguladas em 3 fases inter-dependentes:  $\alpha$  (imediate);  $\beta$  (precoce) e  $\gamma$  (tardia) (Hancock et al., 2006). A fase

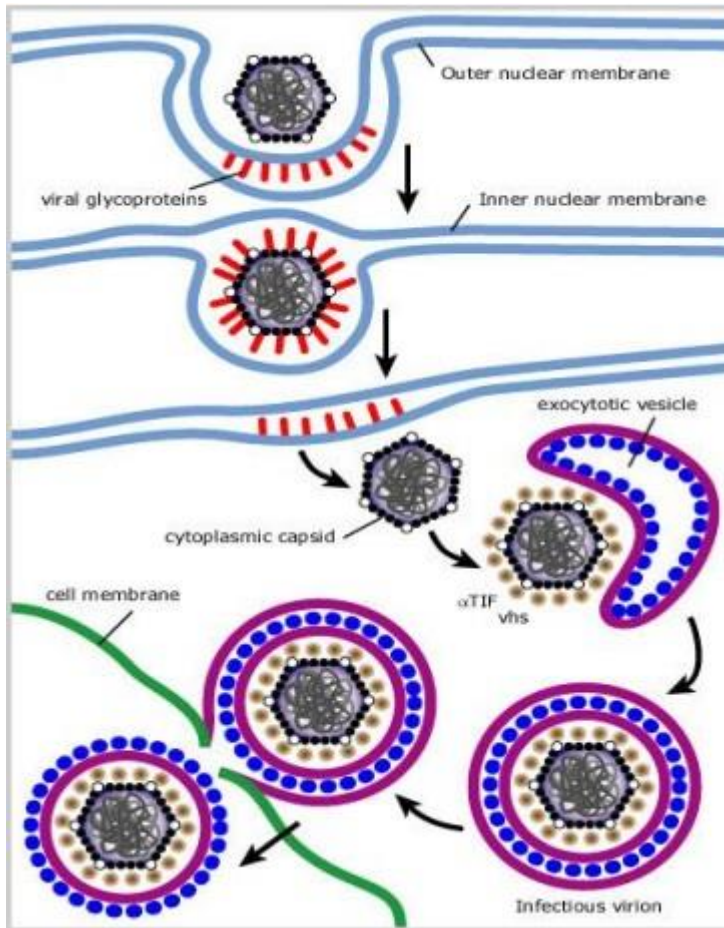
$\alpha$  inicia-se quando a proteína viral  $\alpha$ -TIF liga-se ao TATA Box do genoma viral, com auxílio dos fatores nucleares OCT-1 e HCF. Desta forma, inicia-se a síntese protéica da fase  $\alpha$ : ICP4, ICP27 e ICP47, responsáveis pela regulação positiva das fases subsequentes, além de inibir a ação de proteínas TAP, inibindo assim a apresentação de antígenos virais pelo MHC de classe I; a fase  $\beta$  é responsável pela síntese de enzimas análogas às celulares, possibilitando a replicação do DNA, como a timina quinase (TQ) e UL30/UL42 (DNA polimerase viral); a última fase, denominada fase  $\gamma$ , sintetiza as proteínas estruturais do vírion, que serão utilizadas para a montagem da partícula viral (Roizman & Sears, 1996; Whitley, 1996; Boehmer & Lehman, 1997).

A última etapa, *montagem e liberação dos vírions*, inicia-se com o transporte das proteínas do capsídeo para o núcleo, onde poderão permanecer vazias ou ser preenchidas com DNA, montando assim o nucleocapsídeo viral (Melancon et al., 2004) (Figura 04).



**Figura 04:** Esquema representativo d montagem do nucleocapsídeo viral no interior do núcleo celular. Disponível em <http://darwin.bio.uci.edu/~faculty/wagner/hsv4f.htm>, acesso em 15/, acesso em 25/02/2011.

Após a montagem do nucleocapsídeo viral no núcleo da célula hospedeira ocorre o envelopamento do vírus através da fusão com a membrana nuclear interna, havendo acúmulo de vírus envelopados no espaço perinuclear. Para que as partículas virais possam ser liberadas deste espaço perinuclear, ocorre uma fusão entre o envelope viral e a membrana nuclear externa, liberando apenas os capsídeos no citoplasma, ou seja, durante esta fusão o vírus perde seu envelope. Os capsídeos serão re-envelopados por vesículas derivadas do complexo de Golgi. Esta última etapa pode ser mediada por interações entre as proteínas do tegumento viral e porções citoplasmáticas de glicoproteínas virais, que já estariam inseridas nas vesículas derivadas do Golgi (Melancon et al., 2004) (Figura 05).



**Figura 05:** Esquema representativo das fusões das membranas interna e externa do núcleo celular com o vírus, re-envelopamento viral, finalizando na liberação das partículas virais da célula hospedeira. Disponível em <http://darwin.bio.uci.edu/~faculty/wagner/hsv4f.htm>, acesso em 15/, acesso em 25/02/2011.

#### **1.1.4. Latência**

Um dos maiores problemas do HSV-1 é sua habilidade de persistir indefinidamente, estabelecendo infecção latente que pode levar à recorrência dos sintomas (Boehmer & Nimonkar, 2003), demonstrada pela primeira vez por Brunet e Buddingh, em 1950, após uma infecção primária (Mehnert & Candeias, 2004). Esta latência utiliza-se do mesmo ciclo reprodutivo de outros membros da mesma família ou através de infecções líticas, com ciclo replicativo curto (Santos et al., 2002). Assim como todos os herpesvírus, estabelece infecções latentes ao longo da vida do hospedeiro, podendo ser reativado periodicamente ao longo da vida produzindo doenças, especialmente a herpes labial (Whitley, 2007).

O HSV-1 envolve tanto as fases de latência (não produtivas) quanto as infecções líticas (produtivas) (Yousefi, 2011).

Durante a fase de latência, alguns RNAs (transcritos associados à latência - LATs) podem ser encontrados em elevados níveis (transcrição contínua). Uma pequena quantidade de neurônios no gânglio é infectada, abrigando múltiplas cópias do genoma viral, mas nem todos os neurônios expressam LAT. A latência ocorre em neurônios dependentes do fator de crescimento dos nervos (NGF), pois na ausência de NGF ocorre uma rápida expressão do vírus (Fields, 2002).

Já a fase lítica inicia-se com a primeira exposição da célula epitelial hospedeira ao vírus, seguido da replicação viral nas células dos neurônios sensoriais inervados na pele. Após estabelecer infecção lítica nas células do sítio da primeira infecção (mucosa ou

epiderme), os vírus penetram pelas terminações nervosas e são transportados pelos axônios (sentido retrógrado ao estímulo nervoso) para o gânglio sensorial (Fields, 2002). A latência é então estabelecida em células dos gânglios sensoriais que enervam o local da infecção primária, predominantemente o gânglio trigeminal (Boehmer & Nimonkar, 2003), onde podem estabelecer infecções latentes por toda vida do hospedeiro (Brady & Bernstein, 2004). Na fase lítica, a replicação viral é estimulada pelo hospedeiro, causando uma lesão (afta), que cura em poucos dias (Yousefi, 2011).

Durante a infecção lítica, mais de 80 genes de HSV são altamente expressos com regulação em cascata. Genes imediatos precoces (IE) são muito expressos logo após a infecção. As seis proteínas designadas são: ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 e US1. A ICP0 e a ICP4 são ativadoras transcricionais, sendo a ICP0 uma proteína tanto viral quanto celular (Yousefi, 2011). Em seguida, os genes expressos pelo HSV são os chamados genes precoces (E). Estes são expressos com aproximadamente 4-8 horas após a infecção e para sua expressão eles requerem a presença funcional da proteína ICP4. Este conjunto codifica para proteínas que são necessárias para a replicação viral, incluindo a timina quinase (TQ) e DNA polimerase (Yousefi, 2011). Os últimos genes a serem expressos, denominados genes tardios (L), incluem os códigos genéticos para US11, gC (UL44), gB (UL27), VP16 e VHS. Eles são os últimos genes a serem expressos. Sua expressão atinge níveis de pico depois de começar a síntese do DNA viral (Yousefi, 2011).

O sucesso de um ciclo de replicação depende da realização de uma série de medidas, incluindo a ligação e a penetração do vírion, com a subsequente expressão do vírus precoce ( $\alpha$ ), genes tais como proteínas de células infectadas 0 (ICP0) e genes ICP27,

precoce ( $\beta$ ), genes incluindo DNA polimerase e genes timidina e quinase tardias (Y1 e Y2), genes que codificam para a glicoproteína C (gC), gD e gE e replicação de DNA desemparelhado. A inibição de qualquer estágio de replicação é um alvo potente para a terapia antiviral (Whitley, 2007). O quadro abaixo mostra todos os polipeptídeos e glicoproteínas envolvidos no processo de latência do HSV-1:

**Quadro 01:** Proteínas e Glicoproteínas envolvidas no processo de latência do HSV-1.

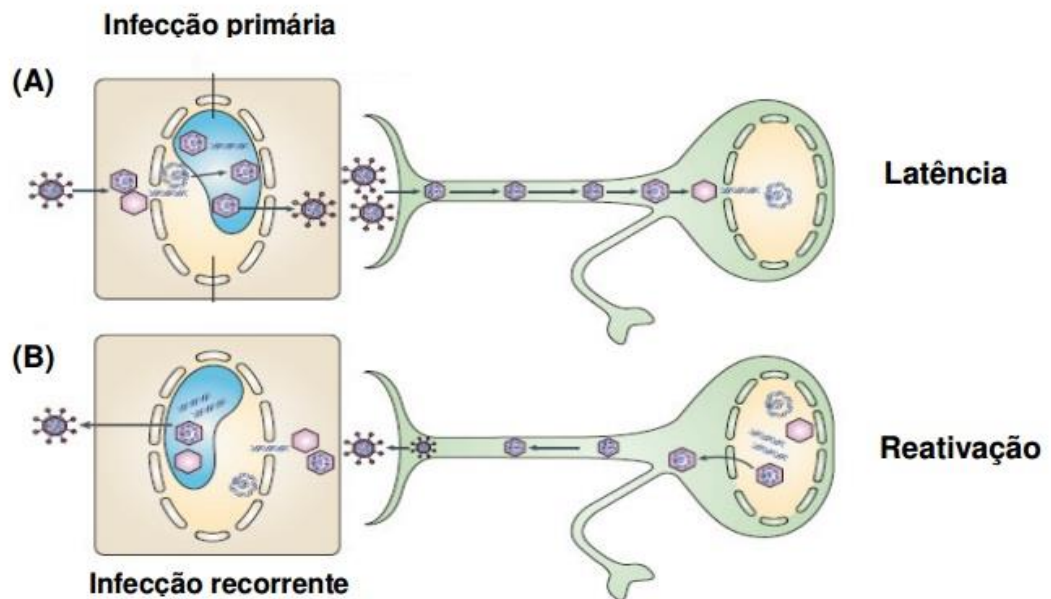
| <b>Proteínas</b> | <b>Função</b>  |
|------------------|--|
| $\alpha$ -TIF    | Tegumento; Induz genes $\alpha$ por interação com PTN do hospedeiro (HCF e Oct-1).   |
| VHS              | Degrada RNAm; Interrompe síntese macromolecular da célula após a infecção; Fosforilada.  |
| ICP0             | Fosfoproteína, transativador de genes por transfecção ou infecção; Melhora atividade com ICP4; É necessária para início da replicação do ácido nucléico viral.                         |
| ICP4             | Fosfoproteína que regula positivamente genes $\alpha$ e $\beta$ e negativamente si mesma, ORF P e ICP0, e algumas ptn $\gamma$ .   |
| ICP22            | Ptn regulatória fosforilada necessária p expressão completa de ICP0 e algumas ptn $\gamma$ .   |
| ICP27            | Ptn regulatória multifuncional necessária p expressão de genes tardios; regula negativamente expressão dos genes iniciais; causa redistribuição de snRNP e inibe processamento do RNA. |
| ICP47            | Bloqueia a apresentação de antígenos pelo MHC de classe 1 em células infectadas.   |



| <b>Glicoproteínas</b> | <b>Função</b>  |
|-----------------------|--|
| gB                    | Interação com GAG (adsorção); adsorção e fusão da célula hospedeira, epitopos direcionados para resposta imune; sítios <i>Syn</i> (form. sincício) na região carboxi-term. |
| gC                    | Interação com GAG (adsorção); afinidade pelo fator do complemento C3.  |
| gD                    | Adsorve o receptor não GAG; fusão; epitopos direcionados para resposta imune; espalhamento do vírus célula-célula e transinápico do vírus; não contém sítios <i>Syn</i> .  |
| gE                    | Receptor para fração Fc de imunoglobulinas.  |
| gI                    | Complexo com gE: adsorve a receptores intracelulares, mediando espalhamento transinápico cél-cél.  |
| gH                    | Complexo com gL: inicia fusão envelope-membrana, estabilizando adsorção; não contém sítios <i>Syn</i> ; epitopos direcionados para resposta imune.                         |
| gL                    | Complexo com gH.   |
| gK                    | Membrana celular apenas (não constitutiva dos vírions); transporte do vírion através do citoplasma; envelopamento; sítios <i>Syn</i> .                                     |
| gM                    | Interação com receptores intracelulares, mediando espalhamento transinápico célula-célula.   |

Os sintomas desta fase desaparecem, mas a infecção persiste em estado latente nos neurônios sensoriais. Reativações periódicas podem ocorrer quando o hospedeiro é afetado por uma variedade de estímulos como febre, queimadura de sol, inflamação e estresse fisiológico ou psicológico (Yousefi, 2011). Após o estímulo, ocorre uma reação em cadeia até a expressão de genes virais: há elevação local de prostaglandinas E e F,

sintetizadas na membrana plasmática em resposta a injúria tissular, que são liberadas nos espaços extracelulares, ativando a liberação intracitoplasmática de AMPc que, por sua vez, ativa as proteínocinases celulares, fosforilando outras proteínas, ativando, assim, a expressão de genes virais (Fields, 2002). Seguido da reativação, o vírus se replica nos neurônios e viaja de volta ao longo dos axônios até o local original de entrada do vírus, causando infecção e produzindo lesões e sintomas clínicos (Yousefi, 2011) (Figura 06). Terminações nervosas de outros tecidos adjacentes podem ser estendidas até o tecido com a lesão, ascendendo por outros neurônios, causando infecção persistente e conseqüente reativação em outros sítios, próximos ao local da primeira infecção. Sugere-se ainda que os vírus possam permanecer latentes e serem reativados em tecidos periféricos, causando uma transmissão do vírus em períodos assintomáticos (Fields, 2002).



**Figura 06:** Esquema representativo das etapas de infecção e latência do HSV-1. A.) Infecção Primária: originada pela infecção de células epiteliais. Após o vírus chegar ao neurônio, o nucleocapsídeo é transportado através do mesmo até o núcleo, onde o DNA viral é liberado e os genes associados à latência são expressos. B.) Infecção Recorrente: Após estímulos ainda não identificados, ocorre a reativação do ciclo, iniciando a expressão dos genes de infecção lítica. Os nucleocapsídeos são transportados para a porção terminal do neurônio, onde as partículas virais serão liberadas a partir do axônio, infectando as células epiteliais, resultando na infecção recorrente. Adaptado de LUCKEMEYER, 2009.

## 1.2. Organismos Marinhos

A natureza é uma fonte promissora de novos compostos com atividade farmacológica e, dentre as diferentes áreas de produtos naturais, deve-se destacar os organismos marinhos que representam metade da biodiversidade global. Estima-se que

80% dos animais e plantas do planeta crescem nos oceanos e a variedade de bactérias pode chegar de 500-100 milhões (Zhang & Kim, 2009).

A vida surgiu no mar há cerca de 3,5 bilhões de anos e seus habitantes constituem o sistema mais diversificado do planeta. Dos organismos às algas e animais, quase a totalidade dos filos tem representantes nos mares. Esses seres vivos guardam muitas substâncias desconhecidas que atuam na comunicação entre espécimes, na defesa contra herbívoros ou predadores, entre competidores, na reprodução ou simplesmente como produto de seu metabolismo. Uma substância que atua como mediador químico para um organismo pode também ser a esperança para o tratamento ou cura de muitas doenças conhecidas (Ministério da Saúde, 2010).

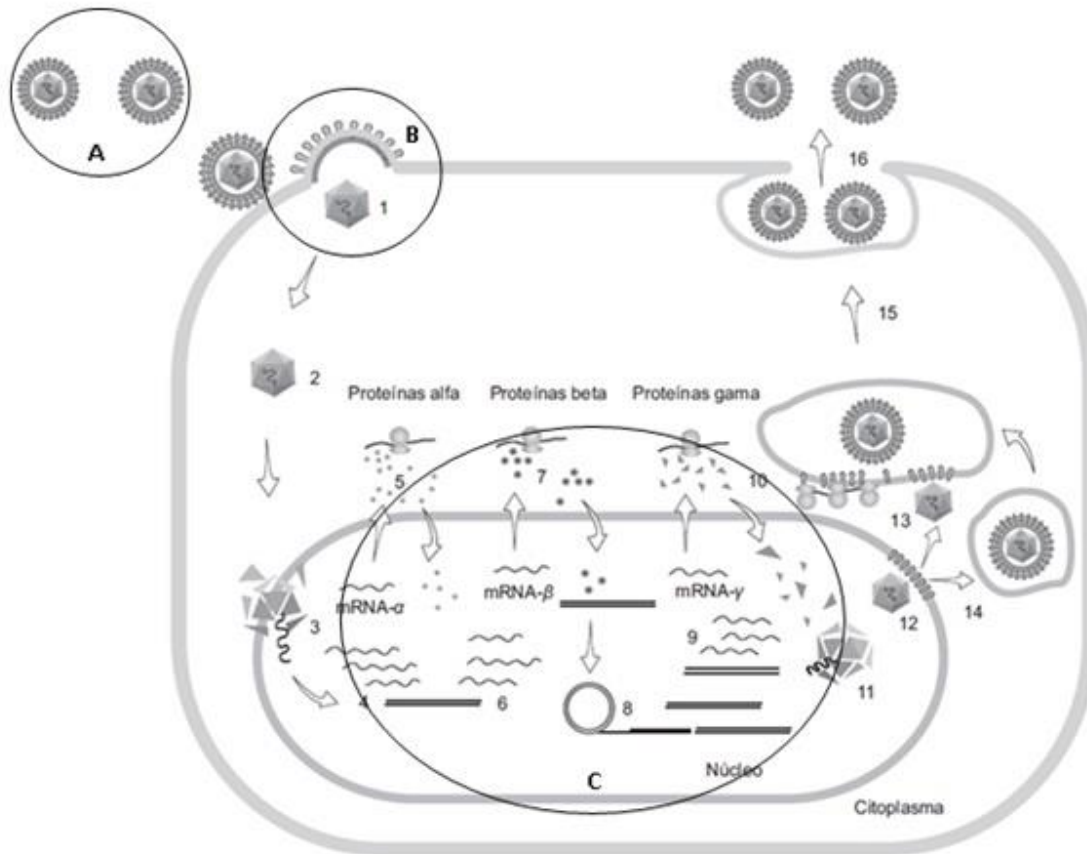
O desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais marinhos iniciou-se nos anos 50 com Bergman e colaboradores (Pinto et al., 2002) e a obtenção de novos compostos obtidos a partir de organismos marinhos aumentou significativamente nas últimas 3 décadas. A variedade de novas estruturas com diferentes atividades farmacológicas encontrados na fauna ou na flora marinha é uma grande motivação para se procurar novos compostos com atividade antiviral. Foram descobertos alcalóides (Coscinamides 60-62 e Chondriamides 63-65) anti-HIV, nucleosídeo (Ara-A) isolados da esponja *Cryptotethia crypta* que originaram diferentes compostos a partir de modificações estruturais (ara-C, acyclovir, e azidotimidina) servindo como modelo para o desenvolvimento de inúmeros antivirais como AZT. Polissacarídeos contra o vírus herpes simples tipo 1 e 2, diterpenos inibindo transcriptase reversa do HIV e terpenos inibindo citomegalovirus e paramixovirus (Tziveleka et al., 2003; Mayer et al., 2009).

Nos últimos cinco anos o número de isolados tem sido surpreendente, aproximando-se de 20.000 compostos isolados de organismos marinhos com mais de 30 compostos em fases clínicas distintas (MarinLit, 2009; Blunt et al., 2010).

### **1.2.1. Antivirais**

O desenvolvimento da resistência do HSV-1 aos anti-herpéticos vêm aumentando significativamente, levando assim à busca por novas alternativas terapêuticas e também a procura por compostos com potente atividade e baixa toxicidade (Barbosa, 2009). Daikoku, T. et al. (2011), por exemplo, testaram polifenóis, incluindo catequina (de chá verde), que apresentaram ampla gama de atividade antiviral frente ao HSV. Luganini et al. (2011), identificando o peptídeo B105 e seu derivado SB105\_A10 como ativos na fase de adsorção celular. Xiong et al. (2011) testaram o composto emodina (antraquinona extraída de raízes de *Rheum tanguticum*), descobrindo a atividade antiviral contra o HSV-2, mais potente do que contra o HSV-1 e a ação com inativação viral direta ou bloqueio de adsorção na célula.

Os antivirais podem interferir em um ou mais processos durante a biossíntese viral ou inativar o vírus extracelular (Cos et al., 2006). A Figura 06 mostra as fases do ciclo replicativo que foram analisadas neste estudo.



**Figura 07:** Desenho esquemático das diferentes fases do ciclo replicativo onde o antiviral poderá interferir: A: Inativação Viral; B: Adsorção; C: Replicação. Figura adaptada de Flint et al., 2000.

Assim, os extratos antivirais podem inativar o vírus em três fases do ciclo replicativo: **(A)** diretamente na partícula viral, desestabilizando-as ou ligando-se a elas de forma irreversível, impedindo assim que estas se liguem aos receptores celulares e desencadeiem o processo infeccioso. (Tafuri, 2011). Neste caso não haveria o tratamento dos sintomas, mas sim uma forma de profilaxia; **(B)** adesão celular, inibindo a ação do vírus na fase de Adsorção (Stephens et al., 2009). O fármaco seria utilizado como um preventivo da primeira infecção, evitando a penetração do vírus às células hospedeiras; ou

(C), na fase de replicação celular, onde o antiviral pode se ligar às enzimas virais (essenciais para a replicação do vírus), aos receptores celulares utilizados pelos vírus, bloqueando-os, ou ainda ao local de ligação viral que media o transporte viral da membrana plasmática até a membrana nuclear (Santos, 2008). O medicamento seria então utilizado assim que se manifestassem os primeiros sintomas virais.

A terapia antiviral disponível atualmente para HSV consiste basicamente de análogos de nucleosídeos, que são substratos para a polimerase viral. Desta forma, o antiviral ideal é aquele que não interfere nos mecanismos normais de defesa celular, complementando sua imunidade e resposta humoral de anticorpos para deter a replicação viral (Luckemeyer, 2009).

O *Aciclovir* (ACV), aciclovir trifosfatado (Brady & Bernstein, 2004; Gilbert et al., 2002), é o anti-herpético de primeira escolha, pois este atua na replicação viral sem interferir nas células hospedeiras (Luckemeyer, 2009). Após administrado, o ACV é transportado para o interior da célula, por difusão passiva ou transportadores de nucleotídeos, onde desencadeará uma reação em cadeia: será ativado pela timidina quinase (TQ) sofrendo fosforilação à ACVMF; o ACVMF é fosforilado em seguida, por TQ celulares, à ACVTF; o ACVTF inibirá a DNA polimerase, ligando-se à ele de forma irreversível. De todas as drogas disponíveis esta é a única que possui seletividade, uma vez que as polimerases de DNA têm pouca afinidade à ACVTF, sendo necessária a ativação da mesma pelas TQ celulares, fazendo com que a droga possua toxicidade reduzida. Além disso, o ACVTF é uma substância muito polar, o que dificulta seu transporte pela

membrana plasmática, elevando assim sua concentração no interior das células, onde permanece retido (Santos, 2008).

O *Penciclovir*, trifosfato de penciclovir, possui mecanismo de ação similar ao do ACV. Possui cerca de cem vezes menos potencia na inibição da replicação viral, entretanto atinge maior elevação de sua concentração no interior das células e maior tempo de meia-vida nas células infectadas (Brady & Bernstein, 2004; Gilbert et al., 2002).

O *Fanciclovir*, éster diacetil do penciclovir, é bem absorvido no trato gastrointestinal e a sua conversão em penciclovir ocorre através da hidrólise de dois grupos acetil e de uma oxidação na posição 6 (Brady & Bernstein, 2004; De Clercq, 2004).

O *Foscarnet*, base conjugada do ácido fosfonofórmico (análogo do pirofosfato), possui mecanismo de bloqueio do local de ligação do pirofosfato à polimerase de DNA, não necessitando de ativação. A desvantagem deste antiviral é não distinguir células infectadas de células saudáveis, apresentando toxicidade para as mesmas. Além disso, por ser muito hidrofílico, sua entrada nas células é dificultada e, por esta razão, a biodisponibilidade torna-se baixa (Santos, 2008).

O *Ganciclovir* atua na DNA polimerase viral, onde é fosforilado à trifosfato de ganciclovir. Desta forma, é incorporado ao DNA viral, impedindo sua replicação (Luckemeyer, 2009).

Como exemplo de antiviral atuante na fase de adsorção, o *Docosanol* inibe a fusão entre a membrana plasmática celular e o envelope do HSV, bloqueando a entrada do vírus. É utilizado para tratamento de herpes labial recorrente (Luckemeyer, 2009).



Para o presente trabalho foi escolhida a cepa KOS, resistente ao aciclovir, que é uma droga considerada segura para o tratamento de pacientes com lesões herpéticas, devido à sua baixa citotoxicidade. Apesar de sua eficácia, têm-se identificado cada vez mais números de cepas de HSV-1 resistentes à esta droga, principalmente as que foram isoladas de pacientes imunocomprometidos (Abrantes, 2006). O presente estudo visa realizar uma triagem de extratos obtidos de organismos marinhos frente ao HSV-1 e estudar esta atividade em relação à fase do ciclo replicativo, além de determinar seu índice de seletividade, a fim de determinar se o extrato é ou não promissor para ser base de um possível medicamento antiviral.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

- Determinar a atividade antiviral frente ao HSV-1 de extratos brutos obtidos a partir de organismos marinhos.

### **2.2. Específicos**

- Calcular o Índice de Seletividade dos extratos considerados ativos.
- Realizar estudo da atividade antiviral, sugerindo o possível mecanismo de ação dos extratos considerados ativos.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Linhagem Celular

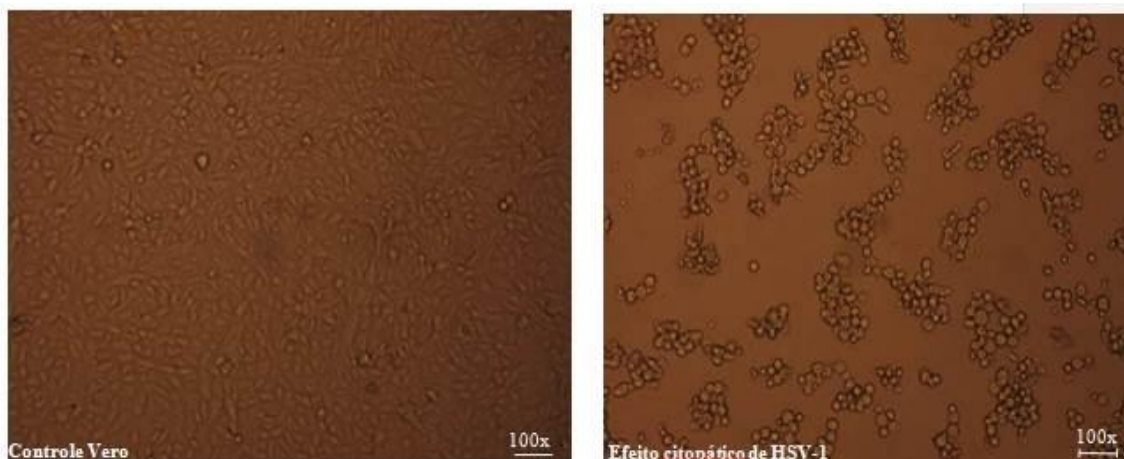
A linhagem celular utilizada foi a VERO (fibroblastos de rins do macaco verde) (Figura 08), cedida pela Profa. Dra. Claudia Simões – UFSC. As células foram cultivadas em meio mínimo de Eagle (MEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas a 37°C.



**Figura 08:** Linhagem Celular Vero (50x de aumento).

### 3.2. Multiplicação Viral

O vírus utilizado é o HSV-1, cepa KOS (cedida pela Profa. Dra. Claudia Simões - UFSC). Inoculou-se 1 mL de amostra viral em cada garrafa de cultivo celular, permanecendo durante 1 h a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> e 100% de umidade. Após este período, adicionou-se 9 mL de meio mínimo de Eagle (MEM) sem SFB em cada garrafa de cultivo celular, voltando à incubação sob condições ideais. Quando a monocamada apresentou 80% de efeito citopático, caracterizado por arredondamento e refringência das células, a garrafa foi congelada a -80°C e, após ser descongelada, a mistura célula-vírus foi centrifugada e, o sobrenadante, distribuído em alíquotas em microtubos de 0,5mL. O estoque de vírus foi preparado, titulado com base no método de Reed & Muench (1938) e armazenados a -80° C (Figura 09).

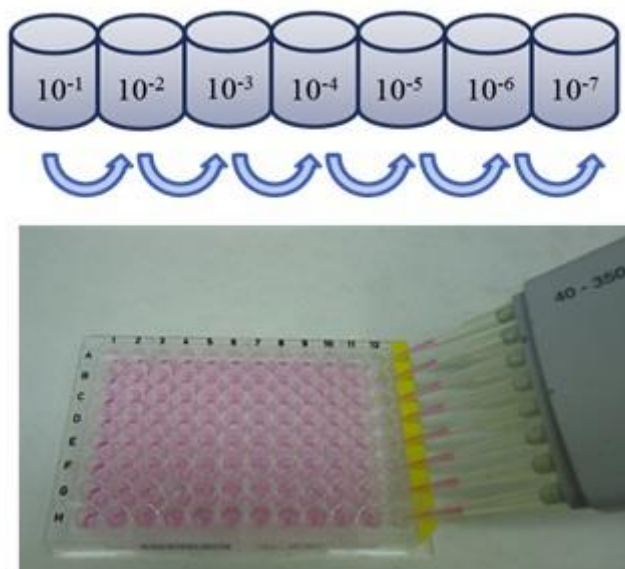


**Figura 09:** Linhagem Celular Vero, com efeito citopático viral (direita) (100x de aumento).

### 3.3. Titulação Viral

As titulações virais foram realizadas de acordo com metodologias usuais. Diluições seqüenciais na base 10 foram inoculadas em volumes de 50 µL/orifício, em quadruplicata, em microplacas de cultivos celulares contendo 100 µL de células inoculadas com 24hs de antecedência (Figura 10). Após o inóculo, as microplacas foram incubadas sob à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> durante 1 h. Após este período, adicionou-se 100 µL/orifício de meio mínimo de Eagle (MEM) sem SFB. As células infectadas foram mantidas em estufa à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> durante 72h. As leituras foram feitas 24, 48 e 72 horas após a inoculação, em busca do Efeito Citopático (CPE) característico. Os títulos foram calculados com base no método de Reed & Muench (1938).

Placa de Diluição – diluições sequenciais na base 10



**Figura 10:** Microplaca de 96 orifícios com diluições sequenciais do HSV-1 na base 10.

### **3.4. Preparo dos extratos**

Os 129 extratos de organismos marinhos foram coletados e preparados pela equipe do Professor Dr. Roberto Berlinck do IQSC-USP, coordenador do projeto temático no qual este estudo está vinculado, intitulado “Investigação do potencial biotecnológico e metabólico de organismos marinhos para processos de biorremediação e produção de substâncias com atividades anti-virais, anti-Leishmania e anti-inflamatória” (Processo-FAPESP 2010/50190-2), e enviados ao LVA-IB-UNICAMP para a realização do bioensaio de avaliação da atividade antiviral.

Para os organismos marinhos invertebrados, como esponjas e ascídias, foi realizada a extração deixando 50g de cada amostra imersa em 100mL de Metanol (MeOH) por uma noite. Após este período, o extrato foi filtrado e realizou-se uma evaporação do solvente em aparelho Speedvac, para posterior secagem e congelamento a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Alíquotas de cada extrato bruto seco foram pesadas em frascos de vidro e enviadas para o bioensaio.

Para os micro-organismos marinhos associados aos invertebrados, como bactérias e micélios de fungos, após seu crescimento em 250mL em meio de cultura, foi realizada uma trituração em liquidificador com 250mL de Acetato de Etila (AcOEt). Esta mistura foi filtrada e submetida à uma partição líquido-líquido, onde a fração orgânica foi coletada, evaporada, seca e armazenada à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Devido ao baixo rendimento disponível de cada amostra (aproximadamente 1mg), e levando em consideração a experiência do laboratório e suas análises anteriores,

padronizou-se 50µg/mL como sendo a concentração máxima não tóxica (CMNT) para todos os extratos.

### **3.5. Avaliação Antiviral**

O efeito antiviral foi calculado pelo método de Reed & Muench, 1938 que é amplamente utilizado por ser um método simples e rápido. A avaliação é visual através da observação em microscópio dos orifícios à procura da ocorrência do CPE. Considera-se resultado negativo a ocorrência de CPE e positivo quando não apresentar o CPE, isto é, o extrato inibiu a ação viral sobre a célula.

O índice de inibição viral (IIV) para cada concentração da substância é calculado através da diferença entre o log do título do controle (**Ct**) e o log do título do tratado (**T**), considerando como positivo se IIV for igual ou acima de 1,5 log.

A porcentagem de inibição (**PI**) é calculada através da fórmula:

$$\mathbf{(PI) = (1 - T/C) \times 100}$$

onde T é o antilog dos títulos virais tratados (com extrato) e C é o antilog do título viral controle (sem extrato). Considera-se positivo a PI igual ou acima de 97%. O vírus estudado induz o efeito citopático (CPE) nas células que pode ser observado microscopicamente.



### **3.5.1. Ensaio Antiviral (Triagem)**

Para determinar a atividade antiviral foi realizada a titulação dos vírus com 100µL de células com uma concentração de 1,5 a 3,0 x 10<sup>4</sup> células/orifício na presença dos em quadruplicata e a adição do vírus em diluições sequenciais na base 10. As placas foram incubadas em estufa à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e 100% de umidade. A leitura foi realizada em busca do CPE característico. Os títulos foram calculados com base no método de Reed & Muench (1938)

Os extratos ativos foram avaliados na curva concentração resposta na qual as células foram cultivadas. Foi realizado o cultivo celular em placas de 96 orifícios e, após 24hs, foram adicionados 50 µL do extrato diluído em 4 diferentes concentrações. Após 1 hora de incubação em estufa à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e 100% de umidade, foram adicionados 50 µL de vírus. A placa foi mantida em estufa à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e 100% de umidade. Após 72hs, foram avaliadas microscopicamente para a avaliação do CPE.

Os ensaios antivirais possuem um controle celular e um controle de extrato, para assegurar a toxicidade da amostra, garantindo assim que durante o experimento o efeito observado é exclusivamente do vírus, sem influência de toxicidade celular.

Para determinar a atividade antiviral foi realizada a titulação dos vírus na presença dos extratos, comparando com um controle. Para isso, foram inoculadas 100µL/orifício de células, em microplacas de 96 orifícios, preparadas 24h antes e incubadas em estufa à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e 100% de umidade. Com o tapete formado, foram

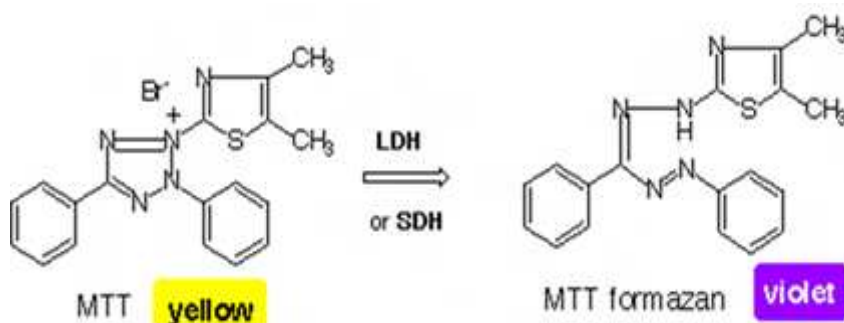
inoculados 100µL/orifício do extrato, em quadruplicata, e adicionado 50µL/orifício do vírus em diluições seqüenciais na base 10. As placas foram incubadas em estufa à 37 °C com 5% de CO2 e 100% de umidade e a leitura foi realizada em microscópio invertido em busca do CPE característico. Os títulos foram calculados com base no método de Spearman & Karber (Reed & Muench, 1938), sendo considerados ativos aqueles que apresentaram  $\text{Log} \geq 1,5$ .

|                  | 1                    | 2 | 3 | 4 | 5                    | 6 | 7 | 8 | 9                 | 10 | 11 | 12 |
|------------------|----------------------|---|---|---|----------------------|---|---|---|-------------------|----|----|----|
| 10 <sup>-1</sup> | Amostra 01           |   |   |   | Amostra 02           |   |   |   | Controle de Vírus |    |    |    |
| 10 <sup>-2</sup> |                      |   |   |   |                      |   |   |   |                   |    |    |    |
| 10 <sup>-3</sup> |                      |   |   |   |                      |   |   |   |                   |    |    |    |
| 10 <sup>-4</sup> |                      |   |   |   |                      |   |   |   |                   |    |    |    |
| 10 <sup>-5</sup> |                      |   |   |   |                      |   |   |   |                   |    |    |    |
| 10 <sup>-6</sup> |                      |   |   |   |                      |   |   |   |                   |    |    |    |
| G                | Controle: amostra 01 |   |   |   | Controle: amostra 02 |   |   |   | Controle celular  |    |    |    |
| H                | CONTROLE DE CÉLULAS  |   |   |   |                      |   |   |   |                   |    |    |    |

**Figura 11:** Desenho esquemático da disposição de extratos, vírus e controles na microplaca de 96 orifícios, utilizada para o ensaio antiviral.

### 3.5.2. Ensaio Colorimétrico MTT

O teste com MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) é baseado na viabilidade celular. Para o ensaio colorimétrico, adicionou-se 20µL de MTT, na concentração de 5mg/mL, em cada orifício da microplaca de 96 orifícios. Esta foi incubada no escuro em estufa à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e 100% de umidade durante 3h. Após este período, a microplaca foi centrifugada durante 10min, a 4°C e 2000rpm. Retira-se o sobrenadante e adiciona-se 100µL de dimetil sulfóxido (DMSO), agitando no escuro à 37°C durante 10 min, seguido de leitura em onda de absorvância de 540nm, em leitor de ELISA (Mosmann, 1983). O fundamento da técnica consiste na metabolização do o MTT, de coloração amarela pela enzima mitocondrial LDH de células viáveis, formando formazan, que é um cristal de cor violeta (Figura 12). Portanto, é um ensaio diretamente proporcional, sendo que quanto maior a intensidade da cor, maior a absorvância e, portanto, maior a viabilidade celular.



**Figura 12:** o MTT, que possui coloração amarela, liga-se à enzima LDH de mitocôndrias de células viáveis, formando cristais de formazan de coloração violeta.

Os testes com MTT em células infectadas, por sua vez, são realizados para quantificar a atividade viral. Desta forma, após a leitura em leitor de ELISA, quanto menor a intensidade da coloração e, portanto, menor absorbância, maior atividade viral é identificada, ou seja, menor viabilidade celular. Desta forma pode ser quantificada a atividade antiviral frente a diferentes extratos. A concentração viral foi pré-estabelecida para melhor linearidade dos resultados.

### **3.5.2.1. Curva de crescimento viral**

Para a realização de todos os ensaios colorimétricos, foi necessário determinar o tempo de incubação e a densidade de inoculação viral ideal garantindo a linearidade dos resultados.

Foi realizada uma curva de leitura: preparou-se 3 microplacas de 96 orifícios, com  $1 \times 10^5$   $\mu$ L/mL de células, 24h antes e incubadas em estufa à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e 100% de umidade. Adicionou-se 50  $\mu$ L/orifício do vírus, em 6 diferentes concentrações virais: 10DI, 100DI, 1000 DI, 200DI, MOI 1 e MOI 0,1, e 100  $\mu$ L/orifício de MEM sem soro fetal bovino (SFB). As leituras com ensaio colorimétrico MTT foram realizadas 24, 48 e 72h após inóculo, sendo que cada dia uma das placas foi analisada. Foi utilizada apenas uma parte da microplaca, de 1-8 e A-D, em quadruplicata, como mostra a figura abaixo:

|          | 1                   | 2 | 3 | 4 | 5       | 6 | 7 | 8 |
|----------|---------------------|---|---|---|---------|---|---|---|
| <b>A</b> | 10 DI               |   |   |   | 200 DI  |   |   |   |
| <b>B</b> | 100 DI              |   |   |   | MOI 1   |   |   |   |
| <b>C</b> | 1000 DI             |   |   |   | MOI 0,1 |   |   |   |
| <b>D</b> | CONTROLE DE CÉLULAS |   |   |   |         |   |   |   |

**Figura 13:** Esquema do espaço utilizado na microplaca e suas diversas concentrações virais.

### 3.5.2.2. Cálculo do Índice de Seletividade

- **CC<sub>50</sub> - Concentração de extrato capaz de inibir 50% do crescimento celular**

Para determinar a concentração de extrato capaz de inibir 50% do crescimento celular, coloca-se 100µL/orifício de células em microplacas de 96 orifícios, preparadas 24h antes e incubadas em estufa à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e 100% de umidade. Com as células confluentes, foram inoculados 100µL/orifício do extrato, em diluição sequencial na base 2, incubando a microplaca em estufa à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e 100% de umidade durante 48h. Após este período, realizou-se o ensaio colorimétrico MTT.

- **IC<sub>50</sub> - Concentração de extrato capaz de inibir 50% do crescimento viral**

Para determinar a concentração de extrato capaz de inibir 50% do crescimento viral, coloca-se 100µL/orifício de células em microplacas de 96 orifícios, preparadas 24h antes e incubadas em estufa à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e 100% de umidade. Com o tapete formado, foram inoculados 100µL/orifício do extrato, em diluição sequencial na base 2, 50µL/orifício do vírus na concentração pré-determinada, incubando a microplaca em estufa à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e 100% de umidade durante 48h. Após este período, realizou-se o ensaio colorimétrico MTT.

O cálculo de índice de Seletividade serve para determinar se os extratos que se apresentaram ativos são promissores para a síntese de futuros medicamentos. Para isso, calcula-se a concentração de extrato capaz de inibir 50% crescimento celular (CC<sub>50</sub>) e divide-se pela concentração de extrato capaz de inibir 50% crescimento viral (IC<sub>50</sub>).

$$IS = CC_{50} / IC_{50}$$

O IS foi calculado por análise de regressão linear, considerando-se a equação da reta adequada quando o valor de R<sup>2</sup> foi igual ou superior a 0,9. O IS é utilizado para estimar a segurança de medicamentos, tanto para a utilização em humanos, quanto para animais,

sendo que quanto maior o valor do IS maior será a segurança do fármaco (Dezengrini et al., 2010).

### **3.5.3. Estudo da Atividade Antiviral nas diferentes fases do ciclo replicativo**

Uma vez selecionada a substância ativa, existem três caminhos para avaliar o possível mecanismo de ação. O teste foi realizado em microplacas de 96 orifícios, com 100µL/orifício de células, preparadas 24h antes, incubadas em estufa à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e 100% de umidade, e, em cada tipo de teste trabalha-se com uma variável diferente:

- **Pré-tratamento:** Ocorre o tratamento das células com os extratos em determinada concentração, para a avaliação do bloqueio de receptores celulares. Coloca-se 100µL/orifício do extrato, na concentração padronizada de 50 µg/mL e, após 1h à 37C, 5% CO<sub>2</sub>, adicionou-se o 50µl/ml do vírus titulado na base 10.

- **Teste de inativação viral:** Adicionou-se 50 µL/orifício do vírus com 100µL/orifício de extrato, mantendo-se em contato por 1h à 37C, 5% CO<sub>2</sub> na ausência de células, para determinar o efeito da inativação viral direta, isto é, destruição do vírus ou pela interferência em sua habilidade em iniciar um ciclo de replicação. Após este período, adicionou-se 150µL/orifício dessa mistura na microplaca.

- **Pós-tratamento:** Pós-tratamento das células com os extratos, visando a capacidade de interferir na replicação viral. Inocula-se 50µl/ml do vírus titulado na base 10 e, após 1h à 37C, 5% CO<sub>2</sub>, adiciona-se 100µL/orifício do extrato, na concentração padronizada de 50µL/orifício.





## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Ensaio Antiviral (Triagem)**

Após a análise de várias amostras sempre resultarem em torno de 50µg/mL, foi padronizada esta concentração inicialmente para a realização do ensaio antiviral dos extratos, já que os mesmos estão em pequenas quantidades.

Os ensaios antivirais possuem um controle celular garantir a viabilidade do experimento e um controle de extrato, para avaliar a toxicidade da amostra, garantindo assim que durante o experimento o efeito observado seja exclusivamente do vírus, sem influência de toxicidade celular. Além do controle viral cujo título viral inicial é  $10^5$ .

Foi realizada uma triagem com 129 extratos, sendo identificados as amostras que apresentaram resultados positivos foram submetidos a identificação taxonomica. Os títulos foram calculados após a leitura realizada nos 2º e 3º dias pós o inóculo (d.p.i.), seguindo do cálculo da porcentagem de inibição viral. Estes resultados estão tabelados a seguir, onde podem ser observados os valores das potências nas quais a base 10 foi elevada (Tabela 01):

**Tabela 01:** Resultados obtidos na triagem da atividade antiherpética das amostras marinhas.

| Amostras           | Leituras das Amostras |    |        |           |        |           | Leituras do Controle |        |        |
|--------------------|-----------------------|----|--------|-----------|--------|-----------|----------------------|--------|--------|
|                    | 24h                   |    | 48h    |           | 72h    |           | 24h                  | 48h    | 72h    |
|                    | d.p.i.                |    | d.p.i. |           | d.p.i. |           | d.p.i.               | d.p.i. | d.p.i. |
| Fungos             | título                | %  | título | %         | título | %         | título               | título | título |
| <b>ACR 1</b>       | 5.25                  | 0  | 5.25   | 83        | -      | -         | 5.25                 | 6.0    | -      |
| <b>ACR 4</b>       | 2.5                   | 83 | 4.25   | 0         | -      | -         | 3.25                 | 3.75   | -      |
| <b>ACR 5</b>       | 4.5                   | 83 | 5.25   | 83        | -      | -         | 5.25                 | 6.0    | -      |
| <b>CER 2</b>       | 2.5                   | 83 | 3.75   | 0         | -      | -         | 3.25                 | 3.75   | -      |
| <b>CIR 1</b>       | 2.5                   | 83 | 3.75   | 0         | -      | -         | 3.25                 | 3.75   | -      |
| <b>CIR 2</b>       | 5.25                  | 0  | 5.75   | 44        | -      | -         | 5.25                 | 6.0    | -      |
| <b>CIR 3</b>       | 2.5                   | 83 | 4.0    | 0         | -      | -         | 3.25                 | 3.75   | -      |
| <b>DRAC 3-6</b>    | 5.5                   | 0  | 5.5    | 68        | -      | -         | 5.25                 | 6.0    | -      |
| <b>DRG 4.3.1-9</b> | 5.25                  | 0  | 5.5    | 68        | -      | -         | 5.25                 | 6.0    | -      |
| <b>DRG 4.3-9</b>   | 3.0                   | 44 | 3.5    | 44        | -      | -         | 3.25                 | 3.75   | -      |
| <b>DRM</b>         | 2.5                   | 90 | 2.5    | <b>99</b> | 2.5    | <b>99</b> | 3.5                  | 4.75   | 4.75   |
| <b>DRR 4.1-6</b>   | 5.5                   | 0  | 5.5    | 68        | -      | -         | 5.25                 | 6.0    | -      |
| <b>DRTM 5-9</b>    | 5.5                   | 0  | 5.5    | 68        | -      | -         | 5.25                 | 6.0    | -      |
| <b>EDC-01</b>      | 5.25                  | 0  | 6.0    | 0         | -      | -         | 5.0                  | 5.75   | -      |
| <b>F100-E2</b>     | 2.5                   | 90 | 4.0    | 83        | 4.25   | 68        | 3.5                  | 4.75   | 4.75   |
| <b>F101-E1</b>     | 4.75                  | 44 | 5.25   | 0         | 5.25   | 0         | 5.0                  | 5.25   | 5.25   |
| <b>F110-E1</b>     | 4.75                  | 68 | 5.5    | 68        | -      | -         | 5.25                 | 6.0    | -      |
| <b>F113-E1</b>     | 3.75                  | 0  | 3.75   | 0         | 3.75   | 0         | 3.75                 | 3.75   | 3.75   |
| <b>F127-E2</b>     | 4.5                   | 68 | 5.0    | 44        | 5.25   | 0         | 5.0                  | 5.25   | 5.25   |
| <b>F130-E2</b>     | 4.25                  | 83 | 5.75   | 0         | 5.75   | 0         | 5.0                  | 5.0    | 5.25   |
| <b>F144-E2</b>     | 5.25                  | 0  | 6.0    | 0         | -      | -         | 5.0                  | 5.75   | -      |

|                |      |            |      |           |      |           |      |      |      |
|----------------|------|------------|------|-----------|------|-----------|------|------|------|
| <b>F146-E2</b> | 0.0  | <b>100</b> | 2.25 | <b>99</b> | 2.5  | <b>99</b> | 3.5  | 4.75 | 4.75 |
| <b>F148-E2</b> | 5.0  | 0          | 5.25 | 0         | 5.25 | 0         | 5.0  | 5.0  | 5.25 |
| <b>F149-E2</b> | 3.75 | 0          | 4.0  | 83        | 4.0  | 83        | 3.5  | 4.75 | 4.75 |
| <b>F151-E1</b> | 4.5  | 68         | 5.0  | 0         | 4.75 | 68        | 5.0  | 5.0  | 5.25 |
| <b>F162-E1</b> | 4.5  | 68         | 5.5  | 0         | 5.5  | 0         | 5.0  | 5.25 | 5.25 |
| <b>F169-E1</b> | 4.75 | 44         | 5.5  | 0         | 5.5  | 0         | 5.0  | 5.0  | 5.25 |
| <b>F173-E1</b> | 5.25 | 0          | 5.25 | 68        | -    | -         | 5.0  | 5.75 | -    |
| <b>F177-E2</b> | 3.5  | 0          | 4.75 | 0         | 4.75 | 0         | 3.5  | 4.75 | 4.75 |
| <b>F182-E1</b> | 4.5  | 90         | 5.75 | 0         | 5.75 | 0         | 5.5  | 5.25 | 5.25 |
| <b>F201-E1</b> | 2.75 | 68         | 3.5  | 44        | -    | -         | 3.25 | 3.75 | -    |
| <b>F201-E2</b> | 4.5  | 90         | 6.0  | 0         | 6.0  | 0         | 5.5  | 5.25 | 5.25 |
| <b>F204-E2</b> | 4.75 | 44         | 4.75 | 68        | 5.75 | 0         | 5.0  | 5.25 | 5.25 |
| <b>F206-E2</b> | 3.5  | 0          | 4.0  | 83        | 4.0  | 83        | 3.5  | 4.75 | 4.75 |
| <b>F211-E2</b> | 4.0  | 0          | 3.75 | 90        | 3.75 | 90        | 3.5  | 4.75 | 4.75 |
| <b>F228-E1</b> | 4.75 | 44         | 5.5  | 44        | -    | -         | 5.0  | 5.75 | -    |
| <b>F244-E2</b> | 0.0  | <b>100</b> | 4.5  | 44        | 4.5  | 44        | 3.5  | 4.75 | 4.75 |
| <b>F248-E1</b> | 4.75 | 44         | 4.75 | 44        | 4.75 | 68        | 5.0  | 5.0  | 5.25 |
| <b>F254-E1</b> | 4.75 | 44         | 5.75 | 0         | 5.75 | 0         | 5.0  | 5.25 | 5.25 |
| <b>F254-E2</b> | 5.5  | 0          | 5.5  | 68        | -    | -         | 5.25 | 6.0  | -    |
| <b>F265-E2</b> | 4.75 | 44         | 4.75 | 44        | 4.75 | 68        | 5.0  | 5.0  | 5.25 |
| <b>F269-E2</b> | 3.5  | 90         | 4.75 | 0         | -    | -         | 4.5  | 4.75 | -    |
| <b>F270-E2</b> | 3.75 | 0          | 5.0  | 0         | 4.75 | 0         | 3.5  | 4.75 | 4.75 |
| <b>F274-E1</b> | 4.75 | 44         | 5.5  | 44        | -    | -         | 5.0  | 5.75 | -    |
| <b>F276-E1</b> | 4.0  | 0          | 4.5  | 44        | 4.5  | 44        | 3.5  | 4.75 | 4.75 |
| <b>F288-E2</b> | 4.75 | 44         | 5.0  | 0         | 5.25 | 0         | 5.0  | 5.0  | 5.25 |
| <b>F290-E1</b> | 5.0  | 0          | 5.0  | 0         | 5.0  | 44        | 5.0  | 5.0  | 5.25 |

|                |      |           |      |    |      |   |      |      |      |
|----------------|------|-----------|------|----|------|---|------|------|------|
| <b>F290-E2</b> | 4.75 | 44        | 5.5  | 0  | 5.5  | 0 | 5.0  | 5.0  | 5.25 |
| <b>F300-E1</b> | 5.0  | 68        | 5.75 | 0  | 5.5  | 0 | 5.5  | 5.25 | 5.25 |
| <b>F36-E2</b>  | 5.0  | 0         | 5.5  | 44 | -    | - | 5.0  | 5.75 | -    |
| <b>F46-E1</b>  | 5.0  | 0         | 5.5  | 0  | 5.5  | 0 | 5.0  | 5.0  | 5.25 |
| <b>F47-E1</b>  | 3.5  | 0         | 4.75 | 0  | 4.75 | 0 | 3.5  | 4.75 | 4.75 |
| <b>F49-E1</b>  | 3.5  | 44        | 4.0  | 0  | 4.0  | 0 | 3.75 | 3.75 | 3.75 |
| <b>F51-E1</b>  | 5.0  | 0         | 5.5  | 0  | 5.5  | 0 | 5.0  | 5.25 | 5.25 |
| <b>F53-E1</b>  | 5.0  | 0         | 5.5  | 44 | -    | - | 5.0  | 5.75 | -    |
| <b>F56-E2</b>  | 3.75 | <b>98</b> | 5.75 | 0  | 5.75 | 0 | 5.5  | 5.25 | 5.25 |
| <b>F63-E1</b>  | 4.75 | 83        | 5.25 | 44 | 5.5  | 0 | 5.5  | 5.25 | 5.25 |
| <b>F66-E1</b>  | 5.0  | 68        | 5.75 | 0  | 5.5  | 0 | 5.5  | 5.25 | 5.25 |
| <b>F85-E1</b>  | 4.0  | <b>97</b> | 5.75 | 0  | 5.75 | 0 | 5.5  | 5.25 | 5.25 |
| <b>F92-E2</b>  | 5.25 | 44        | 5.25 | 0  | 5.25 | 0 | 5.5  | 5.25 | 5.25 |
| <b>F95-E1</b>  | 2.5  | 94        | 4.0  | 0  | -    | - | 3.75 | 3.75 | 3.75 |
| <b>F96-E1</b>  | 4.75 | 44        | 5.75 | 0  | -    | - | 5.0  | 5.75 | -    |
| <b>F99-E1</b>  | 4.75 | 44        | 5.75 | 0  | -    | - | 5.0  | 5.75 | -    |
| <b>PCR 1</b>   | 4.75 | 68        | 5.25 | 83 | -    | - | 5.25 | 6.0  | -    |

| Esponjas          | 24h    |            | 48h    |    | 72h    |   | 24h    |        | 48h    |        | 72h    |  |
|-------------------|--------|------------|--------|----|--------|---|--------|--------|--------|--------|--------|--|
|                   | d.p.i. |            | d.p.i. |    | d.p.i. |   | d.p.i. |        | d.p.i. |        | d.p.i. |  |
|                   | título | %          | título | %  | título | % | título | título | título | título | título |  |
| <b>BA04ES-100</b> | 4.75   | 83         | 5.5    | 0  | -      | - | 5.5    | 5.5    | -      | -      | -      |  |
| <b>BA04ES-46</b>  | 3.75   | 83         | 4.75   | 0  | -      | - | 4.5    | 4.75   | -      | -      | -      |  |
| <b>BA04ES-50</b>  | 5.0    | 0          | 5.5    | 0  | -      | - | 4.5    | 4.75   | -      | -      | -      |  |
| <b>BA04ES-51</b>  | 4.5    | 0          | 5.5    | 0  | -      | - | 4.5    | 4.75   | -      | -      | -      |  |
| <b>BA04ES-68</b>  | 3.5    | 90         | 5.0    | 0  | -      | - | 4.5    | 4.75   | -      | -      | -      |  |
| <b>BA04ES-71</b>  | 4.75   | 0          | 5.25   | 0  | -      | - | 4.5    | 4.75   | -      | -      | -      |  |
| <b>BA04ES-72</b>  | 5.5    | 0          | 5.5    | 0  | -      | - | 5.5    | 5.5    | -      | -      | -      |  |
| <b>BA04ES-75</b>  | 4.75   | 83         | 5.25   | 44 | -      | - | 5.5    | 5.5    | -      | -      | -      |  |
| <b>BA04ES-82</b>  | 4.75   | 0          | 5.25   | 44 | -      | - | 4.5    | 5.5    | -      | -      | -      |  |
| <b>BA04ES-84</b>  | 0.0    | <b>100</b> | 5.5    | 0  | -      | - | 5.0    | 5.5    | -      | -      | -      |  |
| <b>BA04ES-85</b>  | 4.75   | 83         | 5.75   | 0  | -      | - | 5.5    | 5.5    | -      | -      | -      |  |
| <b>BA04ES-86</b>  | 4.5    | 0          | 4.5    | 90 | -      | - | 4.5    | 5.5    | -      | -      | -      |  |
| <b>BA04ES-87</b>  | 4.75   | 83         | 6.0    | 0  | -      | - | 5.5    | 5.5    | -      | -      | -      |  |
| <b>BA04ES-88</b>  | 4.75   | 0          | 5.75   | 0  | -      | - | 4.5    | 5.5    | -      | -      | -      |  |
| <b>BA04ES-89</b>  | 3.75   | 83         | 5.0    | 68 | -      | - | 4.5    | 5.5    | -      | -      | -      |  |
| <b>BA04ES-94</b>  | 4.25   | 44         | 5.5    | 0  | -      | - | 4.5    | 5.5    | -      | -      | -      |  |
| <b>BA04ES-95</b>  | 4.0    | 68         | 5.25   | 44 | -      | - | 4.5    | 5.5    | -      | -      | -      |  |
| <b>BA04ES-96</b>  | 4.75   | 83         | 5.5    | 0  | -      | - | 5.5    | 5.5    | -      | -      | -      |  |
| <b>BA04ES-98</b>  | 0.0    | <b>100</b> | 5.5    | 0  | -      | - | 5.0    | 5.5    | -      | -      | -      |  |
| <b>MNRJ 10488</b> | 1.5    | <b>99</b>  | 5.5    | 0  | -      | - | 5.0    | 5.5    | -      | -      | -      |  |
| <b>MNRJ 10510</b> | 3.75   | 94         | 5.25   | 44 | -      | - | 5.0    | 5.5    | -      | -      | -      |  |
| <b>MNRJ 10520</b> | 1.5    | <b>99</b>  | 5.25   | 44 | -      | - | 5.0    | 5.5    | -      | -      | -      |  |
| <b>PR08EV</b>     | 3.75   | 94         | 5.75   | 0  | -      | - | 5.0    | 5.5    | -      | -      | -      |  |

|                     |               |           |               |          |               |          |               |               |               |
|---------------------|---------------|-----------|---------------|----------|---------------|----------|---------------|---------------|---------------|
| <b>PR08PD</b>       | 1.5           | <b>99</b> | 5.25          | 44       | -             | -        | 5.0           | 5.5           | -             |
| <b>PR8DL</b>        | 2.0           | <b>99</b> | 4.5           | 90       | -             | -        | 5.0           | 5.5           | -             |
| <b>Bacterias</b>    | <b>24h</b>    |           | <b>48h</b>    |          | <b>72h</b>    |          | <b>24h</b>    | <b>48h</b>    | <b>72h</b>    |
|                     | <b>d.p.i.</b> |           | <b>d.p.i.</b> |          | <b>d.p.i.</b> |          | <b>d.p.i.</b> | <b>d.p.i.</b> | <b>d.p.i.</b> |
|                     | <b>título</b> | <b>%</b>  | <b>título</b> | <b>%</b> | <b>título</b> | <b>%</b> | <b>título</b> | <b>título</b> | <b>título</b> |
| <b>1-E1</b>         | 5.25          | 0         | 5.75          | 0        | -             | -        | 5.0           | 5.75          | -             |
| <b>B136</b>         | 3.5           | 44        | 4.0           | 0        | -             | -        | 3.75          | 3.75          | 3.75          |
| <b>B141</b>         | 2.75          | 90        | 3.75          | 0        | 3.75          | 0        | 3.75          | 3.75          | 3.75          |
| <b>B168-E2</b>      | 3.75          | 83        | 4.5           | 44       | -             | -        | 4.5           | 4.75          | -             |
| <b>B255</b>         | 2.5           | 94        | 4.0           | 0        | -             | -        | 3.75          | 3.75          | 3.75          |
| <b>B404-E2</b>      | 4.0           | 68        | 5.25          | 0        | -             | -        | 4.5           | 4.75          | -             |
| <b>B411-E1</b>      | 4.0           | 68        | 4.75          | 0        | -             | -        | 4.5           | 4.75          | -             |
| <b>B515</b>         | 2.75          | 90        | 4.25          | 0        | -             | -        | 3.75          | 3.75          | 3.75          |
| <b>Otros Grupos</b> | <b>24h</b>    |           | <b>48h</b>    |          | <b>72h</b>    |          | <b>24h</b>    | <b>48h</b>    | <b>72h</b>    |
|                     | <b>d.p.i.</b> |           | <b>d.p.i.</b> |          | <b>d.p.i.</b> |          | <b>d.p.i.</b> | <b>d.p.i.</b> | <b>d.p.i.</b> |
|                     | <b>título</b> | <b>%</b>  | <b>título</b> | <b>%</b> | <b>título</b> | <b>%</b> | <b>título</b> | <b>título</b> | <b>título</b> |
| <b>640 H</b>        | 2.75          | 68        | 3.5           | 44       | -             | -        | 3.25          | 3.75          | -             |
| <b>700</b>          | 3.5           | 0         | 3.5           | 44       | -             | -        | 3.25          | 3.75          | -             |
| <b>ACRT</b>         | 2.75          | 68        | 4.0           | 0        | -             | -        | 3.25          | 3.75          | -             |
| <b>AH 168</b>       | 5.5           | 0         | 4.75          | 44       | -             | -        | 4.75          | 5.0           | -             |
| <b>AH 266-1</b>     | 4.75          | 0         | 5.0           | 0        | -             | -        | 4.75          | 5.0           | -             |
| <b>AH 277-3</b>     | 4.5           | 44        | 5.25          | 0        | -             | -        | 4.75          | 5.0           | -             |
| <b>AH B141-1</b>    | 4.0           | 83        | 4.5           | 68       | -             | -        | 4.75          | 5.0           | -             |
| <b>AH B199a-2</b>   | 4.5           | 44        | 5.0           | 0        | -             | -        | 4.75          | 5.0           | -             |
| <b>AH B299-2</b>    | 4.5           | 44        | 5.25          | 0        | -             | -        | 4.75          | 5.0           | -             |
| <b>ASAc-2d3</b>     | 4.25          | 94        | 5.5           | 0        | -             | -        | 5.5           | 5.5           | -             |

|                   |      |    |      |   |   |   |      |      |   |
|-------------------|------|----|------|---|---|---|------|------|---|
| <b>CET</b>        | 4.25 | 0  | 4.25 | 0 | - | - | 3.25 | 3.75 | - |
| <b>DEMAC 210</b>  | 3.25 | 0  | 4.75 | 0 | - | - | 3.25 | 3.75 | - |
| <b>DEPRO 1</b>    | 2.5  | 83 | 4.25 | 0 | - | - | 3.25 | 3.75 | - |
| <b>HA B255-2</b>  | 4.75 | 0  | 5.25 | 0 | - | - | 4.75 | 5.0  | - |
| <b>HAP B565-2</b> | 5.0  | 0  | 5.25 | 0 | - | - | 4.75 | 5.0  | - |

Os resultados referem-se à potência logarítmica com base 10, para todas as amostras e controles. Em destaque encontram-se os extratos ativos, ou seja, aqueles que apresentaram 97% ou mais de inibição viral.

Foram analisados 64 extratos de fungos, 25 extratos de esponjas, 8 extratos de bactérias e 15 extratos de outros grupos. Além destas 112 amostras, foram testadas também outras 17 amostras, que foram identificadas como citotóxicas.

A triagem do ensaio antiviral identificou 13 extratos ativos, com 97% de atividade antiviral ou mais, como mostra a tabela abaixo:



**Tabela 02:** Identificação das Amostras ativas com a respectivas porcentagem de inibição de crescimento viral .

| <b>Amostra</b>   | <b>Organismo</b> | <b>Identificação (grupo/espécie)</b> | <b>PI(%)</b> |
|------------------|------------------|--------------------------------------|--------------|
| <b>F56-E2</b>    | Fungo            | Demateaceous (grupo)                 | 98           |
| <b>F85-E1</b>    | Fungo            | <i>Aspergillus</i> sp.               | 97           |
| <b>F146-E2</b>   | Fungo            | <i>Trichoderma</i> sp.               | 99           |
| <b>F244-E2</b>   | Fungo            | <i>Penicillium</i> sp.               | 100          |
| <b>DRM</b>       | Fungo            | <i>Dragnacidum reticulata</i>        | 99           |
| <b>PCR2</b>      | Fungo            | -                                    | 100          |
| <b>MNRJ10488</b> | Esponja          | <i>Hemimycale</i> sp.                | 99           |
| <b>MNRJ10520</b> | Esponja          | <i>Clathria</i> sp.                  | 99           |
| <b>MNRJ10521</b> | Esponja          | <i>Monanchora arbuscula</i>          | 99           |
| <b>BA04ES-84</b> | Esponja          | -                                    | 100          |
| <b>BA04ES-98</b> | Esponja          | -                                    | 100          |
| <b>PR08DL</b>    | Esponja          | <i>Didimnum ligulum</i>              | 99           |
| <b>PR08PD</b>    | Esponja          | <i>Gennaria disticha</i>             | 99           |

Dentre as 64 amostras de fungos, 5 mostraram-se ativas e, dentre 25 amostras de esponjas, 5 mostraram-se ativas. Após a identificação dos extratos, realizada por colaboradores, foram utilizados 10 extratos ativos, ou seja, 7,8% do total. Destas, 7 foram selecionadas para análises de ensaio de mecanismo de ação e 4 para a análise do IS, sendo que 3 amostras não foram utilizadas para outros testes, devido à pequena quantidade disponível (Tabela 03).

**Tabela 03:** Extratos ativos identificados, selecionados para próximas análises.

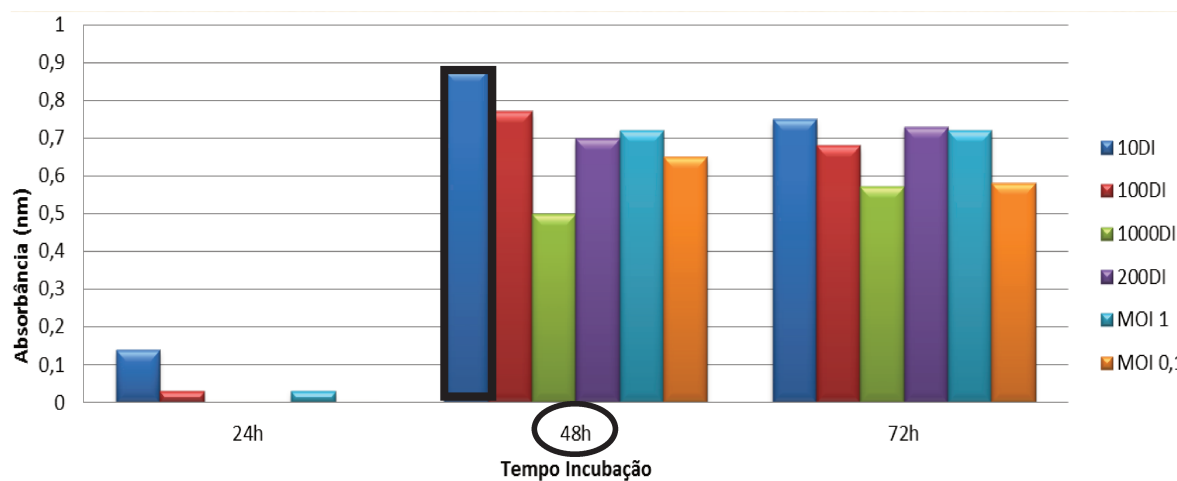
| <i>Organismo</i> | <i>Amostra</i> | <i>Identificação</i>        | <i>PI(%)</i> |
|------------------|----------------|-----------------------------|--------------|
| <i>Fungo</i>     | F56-E2         | Demateaceous (grupo)        | 98           |
|                  | F85-E1         | <i>Aspergillus</i> sp.      | 97           |
|                  | F146-E2        | <i>Trichoderma</i> sp.      | 99           |
|                  | F244-E2        | <i>Penicillium</i> sp.      | 100          |
| <i>Esponja</i>   | MNRJ10488      | <i>Hemimycale</i> sp.       | 99           |
|                  | MNRJ10521      | <i>Monanchora arbuscula</i> | 97           |
|                  | PR08DL         | <i>Didimnum ligulum</i>     | 99           |

Devido ao baixo rendimento disponível de cada amostra, as próximas análises foram realizadas com apenas algumas amostras. Foram utilizados os fungos Demateaceous (grupo) e *Trichoderma* sp, bem como os extratos das esponjas *Monanchora arbuscula* e *Hemimycale* sp. para a análise do IS e, para a análise do mecanismo de ação, foram utilizadas as amostras dos fungos Demateaceous (grupo), *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp., e das esponjas *Monanchora arbuscula*, *Hemimycale* sp. e *Didimnum ligulum*.

#### **4.2. Curva de Crescimento Viral**

Para a realização de todos os ensaios colorimétricos, foi necessário determinar o tempo de incubação e a densidade de inoculação viral ideal garantindo a linearidade dos

resultados. Para isso foi feita uma curva de crescimento viral, cujos resultados podem ser observados no gráfico abaixo:



**Gráfico 01:** Determinação do tempo de leitura e concentração viral para as análises de ensaio colorimétrico MTT.

A melhor linearidade foi identificada com 48h de incubação e 10DI, condições estas que foram adotadas para todas as análises que utilizaram o ensaio colorimétrico MTT.

#### 4.2.1. Cálculo do Índice de Seletividade

O Índice de Seletividade identifica se o extrato é promissor ou não para ser utilizado em um possível tratamento. Foram calculados os  $CC_{50}$  e os  $IC_{50}$  dos organismos, como mostra a tabela a seguir:

**Tabela 04:** Valores dos índices de Seletividade apontados para extratos de fungos e esponjas que mostraram-se ativos.

| <i>Organismo</i> | <i>Identificação</i>        | <i>CC<sub>50</sub></i> | <i>IC<sub>50</sub></i> | <i>IS</i> |
|------------------|-----------------------------|------------------------|------------------------|-----------|
| <i>Fungo</i>     | Demateaceous (grupo)        | 23,6                   | 845,2                  | 0,03      |
|                  | <i>Trichoderma</i> sp.      | 6,7                    | 23,3                   | 0,3       |
| <i>Esponja</i>   | <i>Monanchora arbuscula</i> | 50,5                   | 459,2                  | 0,1       |
|                  | <i>Hemimycale</i> sp.       | 41,1                   | 715,3                  | 0,1       |

O IS foi calculado para 4 diferentes amostras, devido ao baixo rendimento das mesmas, sendo que para o fungo pertencente ao grupo Demateaceous obteve o valor de 0,03, para o fungo *Trichoderma* sp., 0,3 e obteve o valor de 0,1 para os extratos de esponjas das espécies *Monanchora arbuscula* e *Hemimycale* sp.

#### **4.3. Estudo da Atividade Antiviral em diferentes fases do ciclo replicativo**

Foi realizado o estudo da atividade antiviral dos extratos frente ao HSV-1, em diferentes fases do ciclo replicativo. A tabela 05 mostra em qual fase do ciclo cada extrato atua, inibindo o efeito viral:

**Tabela 05:** Identificação da fase do ciclo replicativo nas quais os extratos ativos agem, inibindo o efeito viral.

| <i>Fase do Ciclo Replicativo</i> | <i>Identificação</i>        | <i>Organismo</i> |
|----------------------------------|-----------------------------|------------------|
| <i>Adsorção</i>                  | Demateaceous (grupo)        | Fungo            |
|                                  | <i>Monanchora arbuscula</i> | Esponja          |
| <i>Inativação Viral</i>          | <i>Trichoderma</i> sp.      | Fungo            |
|                                  | <i>Hemimycale</i> sp.       | Esponja          |
| <i>Replicação</i>                | <i>Penicillium</i> sp.      | Fungo            |
|                                  | <i>Aspergillus</i> sp.      | Fungo            |
|                                  | <i>Didimnum ligulum</i>     | Esponja          |

Os resultados mostram que extratos brutos dos fungos Demateaceous (grupo), *Trichoderma* sp. e *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. inibem o HSV-1 nas fases de Adsorção, Inativação Viral e Replicação, respectivamente, enquanto que os extratos das esponjas marinhas *Monanchora arbuscula*, *Hemimycale* sp. e *Didimnum ligulum* agem frente ao HSV-1 também nas fases de Adsorção, Inativação Viral e Replicação, respectivamente. Inibindo a ação do vírus HSV-1 de cepa KOS, estes extratos foram considerados possíveis anti-herpéticos, sugerindo um possível tratamento alternativo para cepas resistentes aos medicamentos disponíveis atualmente.

## 5. DISCUSSÃO

Doenças causadas por bactérias, fungos, parasitas e vírus são ainda um dos maiores problemas na saúde humana. Várias destas infecções não apresentam tratamento eficiente somente sintomático além do fato do desenvolvimento da resistência a quimioterapia atual (Cos et al., 2006). No decorrer dos últimos anos, novos vírus de interesse na saúde pública foram surgindo e muitos outros apresentam caráter reemergente (Chiang et al., 2002).

A principal diferença entre vírus e outros agentes infecciosos é seu mecanismo de reprodução, que utiliza a maquinaria celular do hospedeiro, sintetizando múltiplas cópias de seu genoma e, portanto, proteínas virais. As junções destas proteínas virais sintetizam as partículas virais (Fields, 2002).

O ideal para um antiviral é não interferir nos mecanismos normais de defesa celular. Este deve complementar a imunidade celular e a resposta humoral de anticorpos, inibindo assim a reprodução viral. Além disso, a substância antiviral deve ter algumas características como: apresentar um mínimo de toxicidade para a célula hospedeira; grande espectro de atividade antiviral; potência para a completa inibição da replicação viral; ação apenas no órgão alvo aonde a infecção viral pode estar localizada; não pode ser suscetível ao desenvolvimento de resistência de variantes virais (Simoni, 2003).

Muitos métodos foram desenvolvidos para o estudo de antivirais em cultura de células, porém os vírus necessitam de um sistema celular específico para se desenvolver, dificultando a padronização de um único teste que se aplicaria para todos os vírus. O

método mais utilizado é a avaliação *in vitro* da atividade antiviral baseando-se na habilidade do vírus se replicar nas células (Cos et al., 2006; Smee et al., 2002).

A triagem antiviral foi realizada com 129 extratos de isolados de organismos marinhos, com a CMNT inicialmente padronizada em 50µg/mL. Desta triagem, foram identificados 10 extratos ativos, que obtiveram classificação de organismo e espécie/grupo.

As substâncias antivirais identificadas neste estudo mostraram-se ativas nas três diferentes fases do ciclo replicativo. No caso da inibição do ciclo replicativo viral nas fases de vírus inativação e adsorção os extratos provavelmente agiram diretamente na partícula viral ou na membrana celular, ligando-se a seus receptores impedindo a ligação vírus-célula e, com isso, impedindo a penetração do material genético viral. Já na fase de replicação viral, os extratos agiram dentro da célula, no momento da replicação do material genético viral, em uma ou mais etapas desta fase.

As substâncias que agem como inativadoras virais inibirão o vírus antes mesmo desde entrar em contato com a membrana celular, podendo ser utilizadas inclusive para assepsias, não sendo necessariamente fármacos. Este estudo mostrou que extratos da esponja *Hemimycale sp.* e fungo *Trichoderma sp.* utilizam-se deste mecanismo.

Outras substâncias agem bloqueando a entrada viral à célula hospedeira, como os extratos da esponja *Monanchora arbuscula* e do fungo pertencente ao grupo Demateaceous, mantendo a mesma saudável. Estes compostos podem ligar-se tanto as receptores de membrana, impedindo que a partícula viral se ligue à eles, quanto aos sítios de ligação da partícula viral, impedindo desta forma que a partícula se ligue aos receptores

de membrana. Este tipo de inibição viral pode ser utilizado para síntese de fármacos para prevenção do HSV-1.

Por fim, outro mecanismo de inibição utilizado é a replicação, utilizados pelos extratos de esponja *Didimnum ligulum* e fungos *Penicillium sp.* e *Aspergillus sp.* Neste mecanismo, os extratos agem durante o ciclo replicativo, incapacitando o vírus de sintetizar cópias de seu material genético, e, desta forma, impedindo a síntese protéica viral e síntese de partículas virais. Fármacos produzidos com estes tipos de extratos podem ser utilizados ao primeiro sintoma do HSV-1, como tratamento às células afetadas, diminuindo assim a área lesionada.

Muitas atividades biológicas têm sido relatadas para metabólitos secundários de organismos marinhos, como a atividade antiviral (Selegim et al., 2007), sendo já identificada atividade, por exemplo, da esponja de espécie *Aspergillus terreus*, do mesmo gênero da amostra de esponja analisada no presente estudo. Pugliese et al. identificaram sua ação inibitória frente ao HSV-1 na fase de replicação viral, corroborando com os resultados vistos no presente estudo.

Para um fármaco atingir eficácia terapêutica, deve possuir uma potência elevada e seletividade para interagir com o alvo biológico, mas também deve ser capaz de atingir concentrações no tecido alvo acima de um valor limite predeterminado (Katzung, 2002). Neste estudo o cálculo do Índice de Seletividade foi uma avaliação primária, já que nos extratos há muitos compostos, sendo o composto ativo geralmente encontrado em menor quantidade. Portanto, com a purificação dos extratos considerados ativos, o valor do



IS será modificado e, por esta razão, mesmo os extratos que apresentaram valores mais baixos de IS não foram desprezados.

A triagem realizada neste estudo identificou possíveis extratos de fungos e esponjas ativos para a inibição do HSV-1, bem como sua segurança e mecanismo de ação.

## 6. CONCLUSÃO

### 6.1. Geral

A atividade antiviral de 129 extratos brutos, obtidos a partir de organismos marinhos, foi determinada frente ao HSV-1, sendo que 13 extratos apresentaram atividade anti-herpética, e 10 extratos foram considerados promissores para futuras análises, sendo que:

- 7,8 % dos extratos de fungos foram ativos
- 20% das esponjas foram ativas
- 70% extratos selecionados, foram utilizados para análise de mecanismo de ação.
- 40% extratos selecionados, foram utilizados para o cálculo do IS.

### 6.2. Específicos

- O Índice de Seletividade foi calculado para 4 extratos, sendo que o extrato de *Trichoderma* sp. (fungo) foi o que apresentou o maior valor, porém este deve ser purificado e testado novamente, para melhores resultados.
- No estudo da atividade antiviral foram identificados extratos agindo nas 3 diferentes fases do ciclo replicativo, sendo que foram ativos:

- na fase de **Adsorção**: esponja *Monanchora arbuscula* e o fungo pertencente ao grupo Demateaceous;
- na fase de **Inativação Viral**: esponja *Hemimycale sp.* e fungo *Trichoderma sp.*;
- na fase de **Replicação**: esponja *Didimnum ligulum* e os fungos *Penicillium sp.* e *Aspergillus sp.*

## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABRANTES, J. L. Estudo da Atividade Anti-HSV-1 de Terpenos Isolados de Algas Pardas Marinhas. 88p. [Dissertação de Mestrado em Neuroimunologia] Programa de Pós-Graduação em Neuroimunologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói/RJ, 2006.
- BARBOSA JEF. Estudo da atividade citotóxica e antiviral (anti-HSV-1 e anti-HIV-1) dos derivados N-amino-Triazóis. [Dissertação de Mestrado em Neuroimunologia] Programa de Pós-Graduação em Neuroimunologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói/RJ, 2009.
- BLUNT JW, COPP BR, MUNRO MHG, NORTHCOTEC PT, PRINSEP MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep.* 2010. 27: 165-237.
- BOEHMER PE & LEHMAN IR. Herpes simplex virus DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* 1997. 66: 347 - 384.
- BOEHMER P & NIMONKAR AV. Herpes virus replication. *IUBMB Life.* 2003. 55(1): 13-22
- BRADY RC & BERNSTEIN DJ. Treatment of herpes simplex virus infections. *Ant. Res.* 2004. 61: 73-81.
- CHIANG LC, CHIANG W, CHANG MY, NG LT, LIN CC. Antiviral Activity of Plantago Major Extracts And Related Compounds In Vitro. *Ant. Res.* 2002. 55(1): 53-62.

- COS P, VLIETINCK AJ, BERGHE DV, MAES L. Antiinfective Potential of Natural Products: How To Develop A Stronger *In Vitro* ‘Proof-Of-Concept’. *Journal of Ethno-Pharmacology*. 2006. 106: 290–302.
- COSTA MC, DEMARCH EB, AZULAY DR, PERISSE ARS, DIAS MFRG, NERY JAC. Doenças sexualmente transmissíveis na gestação: uma síntese de particularidades. *An. Bras. Dermatol*. 2010. 85(6): 767:785.
- CUNHA S, SÁ R, POMBO V, COELHO F, OLIVEIRA J, RAMOS I et al. Doenças Infecciosas – O desafio da Clínica. [Monografia] Coimbra: Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; 2008.
- DAIKOKU T, HORIBA K, MIYATA K, TAKEMOTO M, OKUDA T, YOSHIDA Y et al. Polyphenols including catechin from green tea with *in vitro* antiviral activity exhibited anti-herpes simplex virus activity but not anti-influenza virus activity in mice. *Journal of Traditional Medicines*. 2011. 28(2): 63-72.
- DE CLERCQ E. Antiviral Drugs in Current Clinical Use. *J. Clin. Virol*. 2004. (30): 115-133.
- DEZEGRINI R, SILVA SC, WEISS M, KREUTZ LC, WEIBLEN R, FLORES EF. Activity of three antiviral drugs against bovine herpesviruses 1, 2 and 5 in cell culture. *Pesq. Vet. Bras*. 2010. 30(10): 855-860.
- FIELDS BN. *Biologia dos vírus*. In: LIPPINCOTT, WILLIAMS & WILKINS. *Microbiologia - Mecanismos das Doenças Infecciosas*. 3<sup>a</sup>ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

- FLINT SJ, ENQUIST LW, KRUG RM, RACANIELLO VR, SKALKA AM. Principles of virology: molecular, biology, pathogenesis and control. Washington: ASM. 2000 p. 662-714.
- GILBERT C, BESTMAN-SMITH J & BOIVIN G. Resistance of Herpesviruses to Antiviral Drugs: Clinical Impacts and Molecular Mechanisms. Drug Resist. Update. 2002. (5): 88-114.
- HANCOCK MH, CORCORAN JA & SMILEY JR. Herpes Simplex Virus Regulatory Proteins VP16 and ICP0 Counteract an Innate Intranuclear Barrier to Viral Gene Expression. Virology. 2006. (352): 237-252.
- KATZUNG BG. Farmacologia Básica e Clínica. 6ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- LUGANINI A, NICOLETTO SF, PIZZUTO L, PIRRI G, GIULIANI A, LANDOLFO S, GRIBAUDO G. Inhibition of Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2 Infections by Peptide-Derivatized Dendrimers. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2011. 55(7): 3231–39.
- LUCKEMEYER DD. Avaliação da ação anti-herpética de *Ilex paraguariensis* a. st. hil., aquifoliaceae (erva-mate). [Dissertação de Mestrado em Farmácia] Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC, 2009.
- MARINLIT (Marine Literature Database). 2009. Banco de dados da literature mundial de produtos naturais marinhos. University of Canterbury, New Zealand; [10/06/2012] <http://www.chem.canterbury.ac.nz/marinlit/marinlit.shtml>.

MAYER AMS, RODRÍGUEZ AD, BERLINCK RGS, HAMANN MT. Marine Pharmacology In 2005–6: Marine Compounds With Anthelmintic, Antibacterial, Anticoagulant, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antimalarial, Antiprotozoal, Antituberculosis, And Antiviral Activities; Affecting The Cardiovascular, Immune And Nervous Systems, And Other Miscellaneous Mechanisms of Action. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 2009. 1790: 283–308.

MEHNERT DU & CANDEIAS JAN. Herpesvírus. In: TRABULSI LR, ALTERTHUM F (Org.). *Microbiologia*. 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: Ed Atheneu; 2004. v.1. p.3-718.

MELANCON JM, FOSTER TP, KOUSOULAS KG. Genetic Analysis of the Herpes Simplex Virus Type 1 UL 20 Protein Domains Involved in Cytoplasmic Virion Envelopment and Virus-Induced Cell Fusion. *J. Virol*. 2004. 14: 7329 -7343.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Organização Pan-Americana da Saúde. Ministério de Ciências e Tecnologia. Caracterização do Estado da Arte em Biotecnologia Marinha no Brasil/Ministério da Saúde, Organização Pan-Americana da Saúde, Ministério da Ciência e Tecnologia. Brasília: Ministério da Saúde. 2010. 134p.

MIRANDA MMFS. Viroses dermatópicas. In: SANTOS NSOS, ROMANOS MTV, WIGG MD. *Introdução à virologia humana*. 1<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p. 75-100.

PINTO AC, SILVA DHS, BOLZANI VS, LOPES NP, EPIFANIO RA. Produtos Naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*. 2002. 25(1): 45-61.

- PUGLIESE A, VIDOTTO V, COMITO G, CORGNATI F, TORRE D. Effects of *aspergillus terreus* extract on herpes simplex 1 virus replication. Journal of Chemotherapy; 1995. p. 33-37.
- REED LJ & MUENCH H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. American Journal of Hygiene; 1938. p. 493-497.
- ROIZMAN B. & SEARS AE. (1996) Herpes simplex viruses and their replication. In: KNIPE D. & HOWLEY P. Fields Virology. 4th ed. Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia; 1996. p. 2231 – 2295.
- SANTOS NOS, ROMANOS MTV, WIGG MD. Introdução à virologia humana. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p.75-90.
- SANTOS ARN. Estudos de funcionalização de compostos tetrapirrólicos e avaliação da actividade anti-herpética. [Dissertação de Mestrado em Química Orgânica e Produtos Naturais] Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica e Produtos Naturais, Universidade de Aveiro, Aveiro/Portugal, 2008.
- SELEGHIM MHR, LIRA SP, KOSSUGA MH, BATISTA T, BERLINCK RGS, HAJDU E et al. Antibiotic, cytotoxic and enzyme inhibitory activity of crude extracts from Brazilian marine invertebrates. Revista Brasileira de Farmacognosia; 2007. p. 287-318.
- SIMONI IC. Tratamentos Antivirais. O Biológico. 2003. 65:41-44.
- SMEE DF, MORRISON AC, BARNARD DL, SIDWELL RW. Comparison Of Colorimetric, Fluorometric, And Visual Methods For Determining Anti-Influenza



- (H1n1 And H3n2) Virus Activities And Toxicities of Compounds. J. Virol. Methods. 2002. 106(1):71-9.
- STEPHENS, Paulo Roberto Soares *et al.* Virologia. In: MOLINARO, Etelcia Moraes; CAPUTO, Luzia Fátima Gonçalves; AMENDOEIRA, Maria Regina. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios em saúde. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC. 2009. (4): 496.
- TAFURI NF. Atividade antiviral de extratos vegetais e flavonoides contra o *Bovine herpesvirus 1* (BoHV1). [Dissertação de Mestrado em Bioquímica Agrícola] Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG, 2011.
- TZIVELEKA LA, VAGIAS C, ROUSSIS V. Natural Products With Anti-Hiv Activity From Marine Organisms. Curr. Top. Med. Chem. 2003. 3(13): 1512-35.
- WHITLEY RJ. Herpes simplex viruses. In: KNIPE D. & HOWLEY P. Fields Virology, 3rd ed. Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia; 1996. p. 2297 – 2342.
- WHITLEY RJ & ROIZMAN B. Herpes Simplex Virus infections. The Lancet. 2001. v. 357. p.1513-1518.
- WHITLEY RJ. Herpes simplex viruses. In FIELDS BN, KNIPE DM, HOWLEY PM; associate editors CHANOCK RM, MELNICK JL, MONATH TP, ROIZMAN B. Fields Virology. 3<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lippincott – Raven Publishers; 2007. p. 2297-2342.

XIONG HR, LUO J, HOU W, XIAO H, YANG ZQ. The effect of emodin, an anthraquinone derivative extracted from the roots of *Rheum tanguticum*, against herpes simplex virus *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011. 133: 718-723.

YOUSEFI I. Selective activation of Unfolded Protein Response (UPR) by herpes simplex virus type 1 (HSV-1) in permissive and non permissive cells. [Dissertação de Mestrado]. Saskatchewan, Saskatoon: Universidade de Saskatchewan; 2011.

ZHANG C & KIM SK. Matrix metalloproteinase inhibitors (MMPi)s from marine natural products: the current situation and future prospects. *Mar Drugs*. 2009. 7(2): 71-84.

## 8. ANEXO

### ANTIVIRAL ACTIVITY OF EXTRACTS OF MARINE SPONGES AND ASCIDIANS EXTRACTS AND OF NOR-BATZELLADINE L AGAINST HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 1

Bianca Real Bianchi<sup>1,2</sup>, Luciana Konecny Kohn<sup>1</sup>, Mario Ferreira Conceição Santos<sup>3</sup>,  
Lizbeth Lorena López Parra<sup>3</sup>, Fabiana Tessari Rodrigues<sup>3</sup>, Karin Bandeira<sup>3</sup>, Roberto Gomes  
de Souza Berlinck<sup>3</sup>, Clarice Weis Arns<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Virologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de  
Campinas, CP 6109, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

<sup>2</sup>Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas  
SP, Brazil

<sup>3</sup> Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 780, CEP  
13560-970, São Carlos, SP, Brazil

*Corresponding author:* Clarice Weis Arns. Phone: +55-19-3521-6258. E-mail:  
arns@unicamp.br.

## 1. ABSTRACT

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) belongs to the *Herpesviridae* family and is the etiologic agent of labial herpes in humans. The options of treatment for HSV-1 are limited, since the majority of the available drugs are not effective. Therefore, there is a real need to discover new drug leads for HSV-1 treatment. The aim of this investigation was to evaluate the antiviral activity of extracts from marine sponges and ascidians against HSV-1 and determine in which stage of replicative cycle the extract were acting. The best antiviral activity against HSV-1 was observed for the extract of the ascidian *Didemnum ligulum*, with 99% of inhibition in the replication phase and of the sponge *Manachora arbuscula* with 90% in adsorption phase. Subsequently, nor-batzelladine L was isolated from *M. arbuscula* extract as the major compound, and showed potent antiviral activity against HSV-1, acting at the adsorption phase with 97%.

**Keywords:** antiviral activity, herpes simplex virus type 1, marine sponges, replicative cycle, *Herpesviridae*, virus inhibition, nor-batzelladine L

## 2. INTRODUCTION

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) belongs to the *Herpesviridae* family, *Alphaherpesvirus* subfamily and genus *Simplexvirus* [1]. It is the etiologic agent of cases of

herpes labialis. Infection by HSV-1 is easily transmitted and causes latent infections. Once infected, the individual becomes carrier of the virus for the whole life [2]. Transmission of HSV-1 occurs by direct contact of injured skin or mucosa, with secretions containing the virus. Soon its transmission the viral particles are transported retrogradely along sensory neurons to the trigeminal ganglion, where they can establish latent infections throughout the host life [3].

An optimal antiviral agent does not interfere with normal cellular defense mechanisms, and should complement cellular immunity and humoral antibody, thereby inhibiting viral reproduction. Antivirals must display minimal toxicity to the host cell, broad spectrum of antiviral activity, potency for complete inhibition of viral replication and action only in the target organ where the viral infection is located, as well as nonsusceptibility to resistance development by viral variants. Acyclovir (ACV) is the first choice for herpes treatment, because it acts without interfering with viral replication in host cells [3;4].

However, the resistance of HSV-1 to acyclovir is increasing. Therefore is a need of new, potent and selective antiviral agents in order to increase and improve the HSV-1 treatment choices.

Marine organisms, both macro -and micro-, represent a barely tapped source of bioactive natural products representing an enormous biodiversity [5]. Among these, a considerable number of marine organisms yielded potently active secondary metabolites [5; 6; 7]. An array of natural products from marine organisms display antiviral activity against HIV [8] and HSV-1 [9]. However, only a very small number of marine-derived metabolites

are effective antiviral agents, such as vidarabine or Ara-A, isolated from the sponge *Cryptotethya crypta*, and the didemnins isolated from the ascidian *Trididemnum solidum* [9]. Considering the yet very limited number of effective antiviral agents obtained from marine biological sources, and the limited number of antiviral agents commercially available for the treatment of HSV-1 infection, there is a need of new, potent and selective anti-viral compounds effective against HSV-1 infection.

In the present investigation we aimed at to screen twenty-five extracts from marine sponges and ascidians in order to discover extracts with significant antiviral activity against HSV-1, and to establish the mode-of-action of such extracts. Isolation and identification of the active agent was a subsequential step, leading to an antiviral compound which had its mode-of-action investigated.

### **3. MATERIALS AND METHODS**

#### *2.1. Marine sponge and ascidians extracts*

Aliquots (50 g) of twenty-five samples of marine sponges and ascidians were crushed in a mortar with MeOH, and left overnight for extraction. Each extract was filtered through a filter paper, evaporated *in vacuo*, dried under high vacuum and stored at -18 °C. Aliquots of 2 to 5 mg of each dried extract were separated for the antiviral assays.

## *2.2. Virus and cell lines*

The VERO (African Green Monkey - ATCC CCL 81) cell line was propagated in monolayer cultures using Eagle's Minimal Essential Medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Cells were transferred at 1:2 to 1:10 dilutions in agreement with conventional procedures, using 0.05% trypsin with 0.02% EDTA. In preparations in which the virus was used along with cells, it was necessary to use medium without FBS.

## *2.3. Cell cytotoxic effect*

Aliquots of 100  $\mu$ L of suspension cells per well were seeded in 96-well culture plates at a density of  $1 \times 10^5$  cells/mL. Microtiter plates containing cells were pre-incubated during 24 h at 37 °C to allow stabilization prior to addition of extracts and of nortzelladine L samples at four concentrations (0.5, 5.0, 50, and 500  $\mu$ g/mL) [10]. The maximum nontoxic concentration (MNTC) was determined microscopically by the observation of cell morphological changes at 24 and 48 hours of incubation.

## *2.4. MTT assay*

An aliquot of 20  $\mu$ L of MTT solution at 5 mg/mL was added to each well of a 96 wells microplate. Incubation was in the dark at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> and 100% moisture during 3 h. Then, the microplate was centrifuged for 10 min at 2000 rpm. The supernatant was removed and 100 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added, the plate was shaken

in the dark at 37 °C for 10 min followed by reading the absorbance at OD 540 nm with an ELISA reader [11].

### *2.5. Titration of viruses*

The cells were seeded in 96-well culture plates at a density of  $1 \times 10^5$  cells/mL and then incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing CO<sub>2</sub> for 24 h. Serial dilutions of virus stocks were prepared and cells were infected with the diluted virus suspension. After an additional incubation (1–2 days), the cytopathic effect was recorded. The 50% tissue-culture infective dose (TCID<sub>50</sub>/mL) was calculated as described previously by Reed and Munch [12].

### *2.6. Antiviral activity*

Determination of antiviral activity was based on the inhibition of a cytopathic effect. All experiments were performed in triplicate. Briefly, the cells were seeded in 96-well culture plates. After 24 h of incubation, the medium was replaced with 100 µL of DMEM containing the samples at MNTC. Then, 50 µL of viruses logarithmic dilutions were added in quadruplicate and incubated for 3 days. Controls consisted of untreated infected (virus titer), treated noninfected (extract control), and untreated noninfected cells (cell control). Viral titers were determined by 50% infective doses in tissue culture (TCID<sub>50µL</sub>) [12]. The antiviral activity of each extract was determined as the logarithm reduction factor (log<sub>10</sub>) of the viral titer compared with the untreated infected controls.



Values were expressed as titer (TCID<sub>50</sub>μL) and inhibition percentage (IP) as described by Koseki et al. [13]. The inhibition percentage was calculated using the formula  $(IP) = (1 - T/C) \times 100$ , where T is the antilog of the extract-treated viral titers and C is the antilog of the control (without extract) viral titers. IP was considered positive as greater than or equal to 98%.

The test of antiviral activity was evaluated initially with a single dose at MNTC against different viral concentrations. The extract was considered positive if there was a 1.5 log decrease in the viral titer. To confirm the activity of an extract or pure compound, a concentration response curve with different sample concentrations in the presence of 100 TCID<sub>50</sub>/mL was determined by the MTT assay, in order to measure the 50% antiviral concentration (EC<sub>50</sub>).

### *2.7. Data analysis*

The 50% cytotoxic (CC<sub>50</sub>) and 50% inhibition (IC<sub>50</sub>) concentrations were calculated from concentration-effect curves. The results were obtained from triplicate assays with at least 5 extract concentrations. The percentage of cytotoxicity was calculated as  $[(A - B)/A] \times 100$ , where A and B were the OD<sub>540</sub> of untreated and of treated cells, respectively. The percentages of protection were calculated as  $[(A - B) \times 100 / (C - B)]$ , where A, B and C indicate the absorbance of the extracts/fractions, virus and cell controls, respectively. Each obtained EC<sub>50</sub> value was defined as the effective concentration that reduced the absorbance of infected cells to 50% when compared with cell and virus controls. CC<sub>50</sub> and IC<sub>50</sub> for each

compound were obtained from dose-effect-curves (not shown). The  $CC_{50}$  and  $IC_{50}$  are the average of 3 assays with 5 concentrations within the inhibitory range of the compounds. The therapeutic index (i.e. selective index) was defined as  $CC_{50}/IC_{50}$ .

### *2.8. The potential stage in the viral infection cycle*

Cells and viruses were incubated with active samples at different stages during the viral infection cycle in order to determine the mode of antiviral action. Cells were pretreated with samples before viral infection; viruses were incubated with samples before infecting the cells; the cells were infected with the virus and incubated together before the addition of samples. Samples were used at the maximum non-cytotoxic concentration.

### *2.9. Virus Inactivation*

In order to evaluate possible extracellular viral inactivation by extracts, equal volumes (100  $\mu$ L) of the 10-fold serially diluted virus suspension and MNTC of the extracts were mixed and incubated for 1 h at 37 °C. Each mixture was then added to the cell monolayer, and infectious titers were compared with controls.

### *2.10. Statistical analysis*

The results were expressed as mean  $\pm$  s.e.m. The selectivity index (SI) was determined by the ratio of  $CC_{50}$  to  $EC_{50}$ . The statistically different effects of tested extracts

on the inhibition of virus replication were compared with the control group using the Student's t-test with  $p \leq 0.05$  for significant result.

### 3. RESULTS

#### 3.1. Antiviral activity of extracts

The antiviral activity of each extract listed in Graphic 1 was initially evaluated in a standard titer assay in which the extracts at nontoxic concentrations were added at the same time as the virus. This initial analysis identified those extracts which displayed antiviral activity against HSV-1. The antiviral activity of each extract was determined as the logarithm reduction factor ( $\log_{10}$ ) of the viral titer compared with untreated infected controls. Values were expressed as titer ( $\text{TCID}_{50\mu\text{l}}$ ) and inhibition percentage (IP) as described previously. These results were considered positive at IPs higher than 97%. Seven marine invertebrate species yielded extracts which showed potential antiviral activity with the minimum inhibition percentage of 99% for HSV-1. These included the sponges *Aplysina fulva*, *Hemimycale* sp., *Monanchora arbuscula*, *Clathria* sp., an unidentified sponge species (BA04ES-98) as well as two ascidian species, PR8PD and *Didemnum ligulum*.

### 3.2. *The potential stage in the viral infection cycle*

In order to identify the stage of viral replication at which the active extracts could be operating, three different assays were carried out: adsorption phase, replication phase, virus inactivation. Three extracts showed the most potent activity in this step of the evaluation of antiviral activity, and each of them active in a distinct stage of viral replication. The extract of the ascidian *Didemnum ligulum* showed the best result, with 99% of inhibition in the viral replication phase. Extract of the sponge *Monanchora arbuscula* and Norbatzeladine L showed 90% and 97% of inhibition in the adsorption phase respectively graphic 2, while the extract of the sponge *Hemimycale* sp. showed 90% of inhibition in the virus inactivation. These results are shown in Table 2.

## 4. DISCUSSION

*In vitro* antiviral aims to investigate a virus' ability to infect and replicate in specific cell lines in culture systems. Cell culture system provides a rapid and less cumbersome method to grow viruses at higher titers, for the production of vaccine strain cultures, to investigate viruses reverse genetics and to test antiviral compounds.

Indirect assays are usually the first step in a screening to evaluate a large number of compounds for their antiviral activity. Inhibition of cytopathic effects in the presence of a test sample may be due to inhibition of virus replication. Several indirect tests have been developed and modified, but not for specific viruses [14]. One of the inherent drawbacks of

*in vitro* antiviral testing is the environmental sensitivity of cell lines in culture. Preparations that exert antiviral effects *in vivo* may not be detected in *in vitro* assays because of the extremely low concentrations of an antiviral sample tolerated by cells in the artificial system [15]. Even with this limitation, seven out of twenty-five extracts screened in the present investigation exhibited antiviral activity.

The first step of such a screening is to establish the extract MNTC (maximum nontoxic concentration) related to the cells. This step is critical because the virus is an intracellular parasite and uses the cell machinery to replicate. Therefore, it is necessary to ensure that the virus grows in optimal conditions. The results showed (Graphic 01) that extracts obtained from marine invertebrate species displayed antiviral activity against HSV-1. Three of such extracts presented the strongest antiviral activity on at least one of the phases of the viral replication cycle. The extract of the *Didemnum ligulum* inhibited HSV-1 replication, with the 99% of percentage of inhibition viral; the extract of the *Hemimycale* sp. inhibited the virus before its contact with the host cell membrane, showing 90% of viral inactivation; and the extract of *Monanchora arbuscula* inhibited the virus in the stage of adsorption, showed 97% of percentage of inhibition viral.

Norbatzelladine L (figure 1) was subsequently isolated from the extract of the sponge *Monanchora arbuscula* as the major compound. Norbatzelladine L blocked viral entry into the host cell. This type of viral inhibition is commonly targeted by synthetic antiviral agents for the prevention of HSV-1. A second type of antiviral activity was observed for *Didemnum ligulum* extract acting during the replicative cycle, disabling the virus to synthesize copies of its genetic material, and thus preventing viral protein synthesis

and the synthesis of viral particles. Antiviral chemotherapy acting under this mode-of-action are employed when the first symptoms of HSV-1 appear, as a treatment to affected cells. Finally, a third mechanism-of-action observed was the viral inactivation before the virus gets in contact with the cell membrane. Compounds which show such a mode-of-action can be used for asepsis, not necessarily as a drug lead. The extract of the sponge *Hemimycale* sp. displayed this mechanism-of-action.

## 5. CONCLUSION

To achieve a therapeutic efficacy a new drug lead must present high potency and selectivity to interact with the biological target, but should be able of reach concentrations above the limit value in target tissue [16]. In the investigation of HSV-1 antiviral activity of marine invertebrate extracts, we discovered extracts from sponges and ascidians acting under distinct modes-of-action. The extract of the sponge *Monanchora arbuscula* proved to be active in the adsorption phase. One of the compounds isolated from *M. arbuscula* extract which is responsible for blocking the virus entry into the cell membrane of the host cell was norbatzelladine L. The extract of the ascidian *Didemnum ligulum* inhibited HSV-1 replication, while the extract of the sponge *Hemimycale* sp. inhibited the virus before its contact with the host cell membrane, showing viral inactivation. We are currently investigating additional antiviral compounds present in the extracts of *Monanchora*

*arbuscula* and of the ascidian *Didemnum ligulum*, and the results will be reported in due time.

## 6. SUMMARY POINTS

- The concentrations used in antiviral assays were 50 µg/ mL for all the extracts.
- For the screening 25 extracts of marine sponges were used.
- Seven species showed potential antiviral activity with the minimum inhibition percentage of 99% for HSV-1
- Among the seven active extracts, three had better results in the analysis of inhibition at different stages of viral replicative cycle.
- The Nor-batzelladine L isolated from *Monanchora arbuscula* showed 97% of inhibition in the phase of adsorption.
- The specie *Hemimycale* sp. showed 90% of inhibition in the virus inactivation.
- The specie *Didemnum ligulum* showed the best result, with 99% of inhibition in the viral replication phase.

- The study identified different extracts acting at different stages of replicative cycle, covering this way, different shapes for possible antiviral treatment.

## **7. FINANCIAL & COMPETING INTERESTS DISCLOSURE**

This study was funded by the CAPES, CNPq and FAPESP (2010/50190-2).. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed. No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

## **8. ETHICAL CONDUCT OF RESEARCH**

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involve



## 9. REFERENCES

- [1] Hafezi W, Lorentzen EU, Eing BR et al. Entry of Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) into the Distal Axons of Trigeminal Neurons Favors the Onset of Nonproductive, Silent Infection. *PLoS Pathog* 8(5), 1-20 (2012).
- [2] Berntsson M. Sexually Transmitted Infections - Serological, microbiological and microscopical aspects. Printed by Geson Hylte Tryck, Göteborg, Sweden (2011).
- [3] Brady RC & Bernstein DJ. Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Research*. 61, 73-81 (2004).
- [4] Rottinghaus ST, Whitley RJ. Current non-AIDS antiviral chemotherapy. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 5(2), 217-230 (2007).
- [5] Appeltans W, Ah Yong ST, Anderson G. et al. The Magnitude of Global Marine Species Diversity. *Current Biology*. (22), 1–14 (2012).
- [6] Zhang C & Kim SK. Matrix metalloproteinase inhibitors (MMPi)s from marine natural products: the current situation and future prospects. *Mar Drugs*. 7, 71-84 (2009).
- [7] John WB, Brent RC, Robert AK, Murray HGM, Michèle RP. Marine Natural Products. *Nat. Prod. Rep.* 29, 144-222 (2012).
- [8] Leto-A T, Constantinos V, Vassilios R. Natural Products with Anti-HIV Activity from Marine Organisms. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 3, 1512-35 (2003).

[9] Thanh-Sang V, Dai-Hung N, Quang VT, Se-Kwon K. Marine organisms as a therapeutic source against herpes simplex virus infection. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 44, 11-20 (2011).

[10] Kohn LK, Antonio MA, Pizao PE et al. Antiproliferative activity of crude extract and fractions obtained from *Aspidosperma tomentosum* Mart. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 8, 110-1150 (2006).

[11] Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65, 55-63 (1983).

[12] Reed LJ & Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene*. 27, 493-497 (1938).

[13] Koseki I, Simoni IC, Nakamura IT, Noronha AB, Costa SS. Antiviral activity of plant extracts against aphthovirus, pseudorabies virus and pestivirus in cell cultures. *Microbios Letters*. 44, 19-30 (1990).

[14] Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res*. 48, 4827-33 (1988).

[15] Mccutcheon AR, Roberts TE, Gibbons E et al. Antiviral screening of British Columbian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 49, 101-10 (1995).

[16] Katzung BG. *Farmacologia Básica e Clínica* (Volume 6). 6ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, (2002).

## 10. REFERENCE ANNOTATIONS

\* [3] BRADY RC & BERNSTEIN DJ. Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Research*. v. 61, (2004) 73-81.

The paper showed the varied clinical manifestations of the HSV, from asymptomatic disease until establish latent infections in humans.

\* [4] ROTTINGHAUS, S.T.; WHITLEY, R.J. Current non-AIDS antiviral chemotherapy.

*Expert Review of Anti-Infective Therapy*, v. 5, n. 2, p. 217-230, 2007.

A antiviral drug ideal not should interfere in the normal cellular defense mechanisms, thus complementing the immunity and humoral antibody, inhibiting viral reproduction.

\* [5] Appeltans, W., Ahyong, S.T., Anderson, G. et al. (2012) The Magnitude of Global Marine Species Diversity. *Current Biology* 22, 1–14.

Shows the importance of marine's compounds not yet analyzed of have a present antiviral activity against various virus

\* [6] ZHANG C & KIM SK. Matrix metalloproteinase inhibitors (MMPi)s from marine natural products: the current situation and future prospects. *Mar Drugs*. v. 7, (2009) 71-84.

The marine environment is characterized by high biodiversity offering vast variety of natural products which could be used as potential drugs.

\*\* [10] KOHN LK, ANTONIO MA, PIZAO PE *et al.* Antiproliferative activity of crude extract and fractions obtained from *Aspidosperma tomentosum* Mart.. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. v. 8, (2006) 110-115.

The methodology used was adopted for the analysis performed in this study for the screening of the extracts activities.

\* [11] MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. v. 65, (1983) 55-63.

The methodology used was adopted for the analysis performed in this study for the MTT assay.