LARISSA PICADA BRUM

ATIVIDADE ANTIVIRAL DOS COMPOSTOS FENÓLICOS (ÁCIDOS FERÚLICO E TRANSCINÂMICO) E DOS FLAVONÓIDES (QUERCETINA E KAEMPHEROL) SOBRE OS HERPESVIRUS BOVINO 1, HERPESVIRUS BOVINO 5 E VÍRUS DA CINOMOSE CANINA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do Título de *Doctor Scientiae.*

VIÇOSA
MINAS GERAIS –BRASIL
2006

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

LARISSA PICADA BRUM

ATIVIDADE ANTIVIRAL DOS COMPOSTOS FENÓLICOS (ÁCIDOS FERÚLICO E TRANSCINÂMICO) E DOS FLAVONÓIDES (QUERCETINA E KAEMPHEROL) SOBRE O, HERPESVIRUS BOVINO 1, HERPESVIRUS BOVINO 5 E VÍRUS DA CINOMOSE CANINA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do Título de *Doctor Scientiae.*

APROVADA: 23 de novembro de 2006

Prof. Joaquin Hernân Patarroyo Salcedo.
(Co-orientador)

Prof. Maurílio Alves Moreira

Profª Tânia Toledo de Oliveira
(Co-orientadora)

Profª. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli

Profª Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo
(Orientadora)

Dedico ao meu filho Fábio, futuro colega de profissão, por todo amor, compreensão e amizade.

AGRADECIMENTOS

Á minha mãe pelo amor, dedicação e colaboração prestada durante o desenvolvimento desse trabalho.

Á Universidade Federal de Viçosa (UFV) pelo apoio acadêmico, institucional e financeiro.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro.

À Professora Márcia Rogéria pela oportunidade, apoio aos experimentos e orientação.

Ao Professor Mauro Pires Moraes pela oportunidade e orientação.

Ao Professor Joaquim Hernân Salcedo Patarroyo, pelo incentivo, confiança, apoio e colaboração.

À Professora Tânia Toledo de Oliveira pele auxílio técnico e disponibilidade de seu laboratório durante a realização dos experimentos *in vivo*.

Aos professores da pós-graduação em Bioquímica Agrícola pela oportunidade, compreensão e incentivo durante toda a realização do curso.

A todos que, diretamente ou indiretamente, colaboraram para a realização desse trabalho.

Ao secretário Eduardo Monteiro pelo empenho em seu trabalho e auxílio aos alunos da pós-graduação.

Aos meus amigos pelo amor, apoio, incentivo, compreensão e dedicação que tornaram possível a realização desse trabalho.

BIOGRAFIA

LARISSA PICADA BRUM, Médica Veterinária, graduada pela UNIVERSIDADE FEDERAL de SANTA MARIA (UFSM), Especializada em DIAGNÓSTICO VIROLÓGIACO ANIMAL (UFSM), MESTRE em MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA, sub- área VIROLOGIA ANIMAL (UFSM), DOUTORA em BIOQUÍMICA AGRÍCOLA, sub-área VIROLOGIA MOLECULAR pela UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA (UFV).

SUMÁRIO

1 RESUMO ix

2 ABSTRACT xi

3 INTRODUÇÃOGERAL 1

4 REVISÃO DE LITERATURA 5

2.1 COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES: POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO COMO FITOFÁRMACOS 5

2.1.1 Estrutura e função *5*

2.1.2 Compostos polifenólicos e flavonóides utilizados como fármacos antivirais *11*

2.1.3 Famílias Herpesviridae e Paramyxoviridae utilizadas como modelos para os testes dos ácidos fenólicos e dos flavonóides *15*

2.1.3.1 Família *Herpesviridae* 15

2.1.3.2 Família Paramyxoviridae 18

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 20

ATIVIDADE ANTIVIRAL *IN VITRO* DOS ÁCIDOS FERÚLICO E TRANSCINÂMICO E DOS FLAVONÓIDES QUERCETINA E KAEMPHEROL SOBRE A REPLICAÇÃO DO VÍRUS DA CINOMOSE CANINA 28

2 MATERIAS E MÉTODOS 32

2.1 CÉLULAS E VÍRUS 32

2.2 ÁCIDOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES 32

2.3 ESTOQUE VIRAL E TITULAÇÃO 33

2.4 TESTE COLORIMÉTRICO (MTT) 33

2.5 ATIVIDADES ANTIVIRAL E VIRUCIDA 34

2.6 CURVA DE CRESCIMENTO 35

3 RESULTADOS 36

3.1 CITOTOXICIDADE 36

3.2 ATIVIDADES ANTIVIRAL E VIRUCIDA 36

3.3 CURVA DE CRESCIMENTO 36

4 DISCUSSÃO 38

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 43

ATIVIDADE ANTIVIRAL DOS COMPOSTOS FENÓLICOS (ÁCIDOS FERÚLICO E TRANSCINÂMICO) E DOS FLAVONÓIDES (QUERCETINA E KAEMPHEROL) SOBRE OS HERPESVIRUS BOVINO 1 E HERPESVIRUS BOVINO 5 47

1 INTRODUÇÃO 48

2 MATERIAIS E MÉTODOS 52

2.1 CÉLULAS, VÍRUS E SUBSTÂNCIAS TESTES 52

2.2 CITOTOXIDADE 52

2.3 TESTE COLORIMÉTRICO (MTT) 53
2.4 ATIVIDADE ANTIVIRAL E VIRUCIDA 53
2.5 CURVA DE CRESCIMENTO 54
2.6 ENSAIOS *IN VIVO* 54
2.7 MONITORAMENTO CLÍNICO, ADMINISTRAÇÃO DE QUERCETINA E COLETA DE SUABES 55
2.8 ISOLAMENTO VIRAL 56
2.9 EXAMES HISTOPATOLÓGICOS 56

3 RESULTADOS 57

3.1 CITOTOXICIDADE 57
3.2 ATIVIDADE ANTIVIRAL E VIRUCIDA DAS SUBSTÂNCIAS TESTES 57
3.3 CURVA DE CRESCIMENTO 58
3.4 ENSAIOS *IN VIVO* 58
3.5 ISOLAMENTO VIRAL 58
3.6 EXAMES HISTOPATOLÓGICOS 59

4 DISCUSSÃO 60

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 68

6 CONCLUSÕES 72

7 PERSPECTIVAS 73

LISTAS DE QUADROS

TABELA 1: CLASSIFICAÇÃO QUÍMICA DE ALGUNS COMPOSTOS FENÓLICOS. 5

QUADRO 1: ISOLAMENTO VIRAL A PARTIR DE SUABES NASAIS COLETADOS DO GRUPO DE ANIMAIS INOCULADOS COM O BOHV 5 NÃO TRATADOS E TRATADOS COM QUERCETINA. 63
QUADRO 2: ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO RIM COLETADO DOS ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE POSITIVO E DO GRUPO DE ANIMAIS TRATADOS COM QUERCETINA. 64
QUADRO 3: RESPOSTA INFLAMATÓRIA NO PARÊNQUIMA CEREBRAL DOS ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE POSITIVO G3 E DO GRUPO DE ANIMAIS TRATADOS COM QUERCETINA G4, ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS..... 64

LISTAS DE FIGURAS

FIG 4-1. ATIVIDADE VIRUCIDA DAS QUATRO SUBSTÂNCIAS TESTADAS, SEPARADAMENTE, CONTRA O VÍRUS DA CINOMOSE CANINA EM RELAÇÃO ÀS CONCENTRAÇÕES: 0 CONTROLE VIRAL; 50, 100, 150MG/ML DE CADA SUBSTÂNCIA TESTE. 41

FIG 4-2. CURVA DE CRESCIMENTO VIRAL COM O FLAVONÓIDE QUERCETINA (100µG/ML) NOS TEMPOS 4, 8, 12, 24, 48, 72 HORAS, UTILIZANDO OS DOIS TIPOS DE TRATAMENTOS, ATIVIDADE ANTIVIRAL E ATIVIDADE VIRUCIDA EM RELAÇÃO AO CONTROLE VIRAL. 41

FIG 4-3. CURVA DE CRESCIMENTO VIRAL COM O ÁCIDO FERÚLICO (100µG/ML) NOS TEMPOS 4, 8, 12, 24, 48, 72 HORAS, UTILIZANDO OS DOIS TIPOS DE TRATAMENTOS, ATIVIDADE ANTIVIRAL E ATIVIDADE VIRUCIDA EM RELAÇÃO AO CONTROLE VIRAL. 42

FIG 4-4 PORCENTAGEM DE REDUÇÃO DO TÍTULO VIRAL DO ÁCIDO TRANSCINÂMICO E KAEMPHEROL NOS TEMPOS 4, 8, 12, 24, 48, 72 HORAS.....42

CAPÍTULO 2:

FIG 4-1. **A**: SNC COM LEVE INFILTRADO INFLAMATÓRIO PERIVASCULAR (1-2 CAMADAS LINFOCITÁRIAS) E MENINGITE, ANIMAL INOCULADOS COM BOHV 5 E TRATADO COM QUERCETINA (G4). **B_1**: SNC COM INTENSA MENINGITE, INFILTRADOS INFLAMATÓRIOS PERIVASCULAR (VÁRIAS CAMADAS LINFOCITÁRIAS), VASOS CONGESTOS, ÁREAS DE GLIOSE, MALACIA, ANIMAL INOCULADO COM BOHV 5 E NÃO TRATADO COM QUERCETINA (G3) **B_2**: SNC DE OUTRO ANIMAL DO G3 COM INFILTRADOS INFLAMATÓRIOS PERIVASCULAR, SUBEPENDIMÁRIO E MANGUITOS PERIVASCULARES, MUITAS CÉLULAS LINFOCITÁRIAS E MENINGITE. H&E, 10X. . 65

FIG 4-2. TÍTULO VIRAL DO HERPESVIRUS BOVINO 1 (BOHV1) TRATADO COM QUERCETINA, ATIVIDADE VIRUCIDA. 66

FIG 4-3. TÍTULO VIRAL DO HERPESVIRUS BOVINO 5 (BOHV5) TRATADO COM QUERCETINA, ATIVIDADE VIRUCIDA. 66

FIG 4-4. CURVA DE CRESCIMENTO DOS VÍRUS BOHV1 E BOHV5 UTILIZANDO A CONCENTRAÇÃO DE 250MG/ML DE QUERCETINA EM AMBOS OS TIPO DE TRATAMENTO. EAV TRATAMENTO PRÉ-INFECÇÃO OU EFEITO ANTIVIRAL; EV TRATAMENTO INATIVAÇÃO OU EFEITO VIRUCIDA. 67

RESUMO

BRUM, Larissa Picada, D.S.c., Universidade Federal de Viçosa, Novembro de 2006. **Atividade antiviral dos compostos fenólicos (ácidos ferúlico e transcinâmico) e dos flavonóides (quercetina e Kaempherol) sobre os Herpesvirus bovino 1, Herpesvirus bovino 5 e vírus da Cinomose Canina.** Orientador: Márcia Rogéria de Almeida Lâmego. Co-orientadores: Joaquin Hernann Patarroyo Salcedo,Tânia Toledo de Oliveira.

A pesquisa apresentada nessa dissertação visa à descoberta e utilização de novos fármacos para prevenção ou terapêutica de infecções víricas. As propriedades farmacológicas dos fitoterápicos e derivados visam à utilização desses na terapêutica antiviral. Compostos polifenólicos e flavonóides possuem propriedades antioxidantes, bactericidas, antifúngicas, antivirais. Para investigar a ação do ácido ferúlico, do ácido transcinâmico e dos flavonóides (a quercetina e o kaempherol), estes foram testados quanto à capacidade de inibir a replicação *in vitro* dos Herpesvírus bovino 1 (BoHV 1), Herpesvirus bovino 5 (BoHV 5) e vírus da Cinomose Canina, também foram avaliados o potencial antiviral e terapêutico da quercetina *in vivo* por meio da inoculação de coelhos via intranasal com a amostra neuropatogênica de BoHV 5 (SV-507). Na avaliação *in vitro,* foi analisado o efeito antiviral utilizando dois tipos de tratamentos. Nos ensaios para detecção da atividade antiviral (tratamento pré-infecção) foram encontrados resultados de redução no título dos BoHV 1 e BoHV 5. Nos ensaios para análise da atividade virucida (tratamento pós-infecção) houve redução da atividade viral para o BoHV 1 e 5 de até 99,99% com a quercetina. Realizou-se também a curva de crescimento viral utilizando-se a quercetina nos tempos 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas. No ensaio de atividade virucida foi encontrado redução no título viral de 99,999% para ambos os vírus a partir de 4 horas. O teste do potencial antiviral e terapêutico da quercetina *in vivo* demosntrou redução do número de animais que excretaram o vírus, redução do número de dias de excreção viral, além de redução dos sinais clínicos da infecção e mortalidade. Nos resultados *in vitro* com o vírus da Cinomose Canina, foram encontrados resultados de redução no título viral de 90%, 46,2%, 32,48% e 78% pelo ácido transcinâmico, ácido ferúlico, kaempherol e quercetina, respectivamente no tratamento antiviral. A análise da atividade virucida, demonstrou redução no título viral de 99,99%, 97%, 79% e 96% pelo ácido ferúlico, ácido transcinâmico, kaempherol e pela quercetina, respectivamente. A curva de crescimento viral utilizando-se as quatro

substâncias nos tempos 4, 8, 12, 24, 48, e 72 horas apresentou resultados que variaram de 32% a 99,99% para o ácido ferúlico e 58% a 99,9% para a quercetina, para os outros compostos os resultados não foram significativos. A partir destes resultados, acredita-se na utilização dessas substâncias, principalmente a quercetina, para formulação de medicamentos para terapia antiviral em infecções causadas por esses vírus.

ABSTRACT

BRUM, Larissa Picada, D.S.c., Universidade Federal de Viçosa, November de 2006. **Antiviral activity polyphenolic composites (acids ferulic and transcinnamic) and flavonoids (Quercetin e Kaenpherol) about Herpesvirus bovine 1, Herpesvirus bovine 5 and virus of Canine Distemper.** Adviser: Márcia Rogéria de Almeida Lâmego. Co-Advisers: Joaquin Hernann Patarroyo Salcedo and Tânia Toledo de Oliveira.

This research it aims at for discovery and utilization of new pharmacology drugs for prevents or attenuates viral disease diverse substances, as the fitotherapic, from search for effect antiviral. Polyphenolic composites and flavonoids possess antiviral, bactericid, antifungical properties. To investigate the poliphenolic compound, (ferulic acid and transcinnamic acid) and flavonoid (quercetin and kaenpherol) against the viral infection *in vitro* of the bovine herpesvirus 1 and 5 (BoHV 1 and 5) and the Canine distemper (CDV) was analyzed antiviral effect using two types of treatments. The antiviral effect of cells treated before-infection. In the assay for analysis of the virucidal activity (incubation of virus and substance for one hour post inoculation of cell culture) reduction of the viral activity for BoHV 1 and 5 of up to 99,99% to quercetin. The curve of viral growth using quercetin in different times (4, 8, 12, 24, 48, 72 hours) demonstrate effective inhibition of replication of virus and potentially virucidal effects, reduction in the viral heading to 99,999% for both was found the viruses from 4 hours. They had been evaluated the antiviral and therapeutical potential the quercetin in rabbits inoculated with isolate BoHV 5 (SV/507), and submitted to quercetina oral administration. These results demonstrate reduction to number of animals shedding virus, reduction to number of days of viral shedding and of clinical signals infection and reduction to mortality. The resulted for Canine Distemper virus to reduction of viral heading 90%, 46.2%, 32.48% and 78% for the transcinnamic acid, ferulic acid, kaempherol and quercetin respectively. In the treatment of virucidal effect results to reduction of viral heading 99.99%, 97%, 79% and 95% for the acid ferulic, acid transcinnamic, kaempherol and for the quercetin, respectively. For the curve of viral growth using four substances in times 4, 8, 12, 24, 48, 72, hours the results had varied of 32% to 99% for the acid ferulic. The transcinnamic acid and kaempherol the results had been less signication, to quercetin the results had varied of 58% 99.9% in the

virucidal. The results show flavonoids more effectively the quercetin further development as medically antiviral therapy in infections caused for these virus.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Há atualmente um interesse crescente na pesquisa de compostos naturais e fitoterápicos para serem produzidos novos fármacos. A necessidade da indústria farmacêutica em atender a demanda de produção de fármacos comerciais para diversas enfermidades humanas e animais, com modernos sistemas de produção eliminando reações colaterais e atuando especificamente no agente patológico ou no organismo de forma direta, eficaz e sem toxicidade é o objetivo principal. Infecções com problemas de resistência às drogas já existentes ou medicamentos que possuem reações indesejáveis para o organismo impulsionam pesquisas no mundo para novas substâncias terapêuticas tanto para humanos quanto para animais. Os fitoterápicos estão entre as novas substâncias crescentemente pesquisadas para uso terapêutico em diversas enfermidades como doenças metabólicas, cardiovasculares e infecciosas. A pesquisa de suas propriedades farmacológicas, bioquímicas e terapêuticas vem crescendo muito nas últimas décadas devido à resistência de muitos microrganismos a diversas drogas e à descoberta da eficácia desses compostos para as diversas enfermidades. Diversas doenças incentivam a busca de novos medicamentos ou associações com medicamentos comerciais visando à produção de fármacos mais eficientes, os quais, os microrganismos não apresentem resistência. No caso de infecções virais, a descoberta ou diagnóstico de novos agentes também é um problema crescente, assim como a patogenicidade dos agentes e a resistência a drogas por diversos vírus que afetam humanos e animais. A prevenção e terapêutica das infecções víricas ainda é um grande desafio para a indústria farmacológica, pois muitas infecções víricas não possuem tratamento apropriado e eficiente. Devido à existência de poucos medicamentos disponíveis no mercado contra agentes virais, existe atualmente a resistência de vírus a medicamentos comerciais mais comumente utilizados, principalmente em pacientes imunodeprimidos (por exemplo: aciclovir, penciclovir, foscarnet) que possuem interferência na DNA polimerase viral, diminuindo a capacidade do vírus de replicação (GONG et al. 2004).

Os herpesvirus humanos possuem distribuição mundial; nos Estados Unidos da América (EUA), há 60 milhões de pessoas infectadas com HSV 2 (herpes simplex 1 e 2), já com HSV 1 estima-se que o número seja maior. Segundo pesquisas da Organização Mundial da Saúde (OMS), a prevalência mundial da infecção por

HSV 2 varia entre 2 a 74%, essa variação deve-se a vários fatores sócio-econômicos e culturais.

A infecção por HSV 2 é bidirecional à infecção pelo vírus da Imunodeficiência Adquiria (HIV), pois existe interação entre essas infecções. Nos Estados Unidos da América, 25% dos pacientes portadores do HIV são positivos para HSV 2, enquanto na Europa este número chega a 15%. No mundo em geral, incluindo países em desenvolvimento nos continentes Africano, Asiático e América Latina, a prevalência de HSV 2 é de 35% e, em portadores de HIV, é de 50%.

No Brasil, os dados atuais principalmente de estudos da Universidade de São Paulo (USP-HCFMRP) revelam altos índices de prevalência de humanos soropositivos para HSV 1 e 2, como os descritos por PINTO et al. (2001) que testaram 1500 parturientes sadias encontrando 94,5% de soropositivos para herpes simplex e 31,9% especificamente para HSV 2 sintomáticas ou não, em outro estudo de CARVALHO et al. (1999) numa população de estudantes de 96 pacientes sadios e 102 com doenças sexualmente transmissíveis foram encontrados 66,3 % e 99% de soropositivos para cada categoria, respectivamente. Segundo dados da OMS em 2002, estimava-se uma prevalência de 32% para HSV 2 e de 86% a 92% em pacientes suspeitos na população brasileira.

Grupos de pesquisas de diversos estados empenham-se para determinar as taxas de prevalência e incidência da infecção por herpesvirus bovino no Brasil, no entanto, muitas das pesquisas e amostras que chegam aos laboratórios são de amostras de animais e rebanhos sem histórico, mascarando os resultados das pesquisas. Segundo KUNG et al. (1996), a variação de animais soropositivos para o BoHV 1 era de 20 a 80% no Brasil, mas segundo estudos mais recentes testando rebanhos não vacinados, no estado de Goiás a prevalência de soropositivos para BoHV 1 é de 51,9% (BARBOSA et al. 2005). No sul do Brasil, estudos de SANCHES et al. (2000) descreveram que o BoHV 5 é a segunda enfermidade vírica do sistema nervoso central de bovinos mais diagnosticada. Em 1998, apenas nos estados de Mato Grosso do Sul e São Paulo, 14 surtos de encefalite por BoHV-5 foram relatados por SALVADOR et al. (1998).

Uma das infecções mais importantes para a clínica de pequenos animais é a causada pelo vírus da Cinomose Canina (CDV, canine distemper vírus), uma doença pantotrópica e com alta prevalência. Dentre as doenças de pequenos animais, é considerada a maior causa de mortalidade e a segunda doença mais importante do

sistema nervoso central de cães, após a raiva canina, apresentando alta taxa de morbidade e inexistência de um tratamento específico para a infecção. São utilizados apenas medicamentos antibacterianos para combater as infecções secundárias que costumam agravar o quadro da doença, mas sem efeito para sintomatologia nervosa, que é a fase mais grave, levando normalmente o animal a óbito.

A descoberta de terapias alternativas para infecções herpéticas que apresentam grande mobilidade na população humana e animal, para as infecções recrudescentes nos pacientes imunodeprimidos, para a encefalite humana adulta bem como para as doenças encefálicas e epiteliais em neonatos será de grande valor terapêutico e uma alternativa à resistência dos micoorganismos a diversos medicamentos já existentes. A importância dessas infecções nos impulsionou a realizar estudos sobre a atividade antiviral de compostos fenólicos (ácido transcinâmico e ácido ferúlico) e flavonóides (kaempherol e a quercetina) contra o herpesvirus bovino 1 e 5 (BoHV 1 e BoHV 5) e contra o vírus da Cinomose Canina, em busca de medicamentos efetivos contra esses vírus. A partir dos resultados encontrados *in vitro* com a quercetina, passou-se a testar o potencial terapêutico e neuroprotetor deste flavonóide em coelhos infectados com a amostra neuropatogênica SV/507 do BoHV 5.

Desses compostos, a quercetina já foi testada contra outros vírus em nosso laboratório, bem como outros flavonóides. Os dois compostos fenólicos, o ácido ferúlico e o ácido transcinâmico, ainda não haviam sido testados, mas são precursores de outros compostos também já testados em nosso laboratório. Esses, entre outros compostos, são amplamente utilizados em pesquisas com diversas doenças metabólicas no Laboratório de Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

A partir dos resultados encontrados *in vitro* contra o vírus da Cinomose Canina, pretende-se testar o potencial terapêutico da quercetina *in vivo*, principalmente devido aos relatos de neuroproteção dessa substância. Sabe-se que a maioria dos cães que chegam às clínicas de pequenos animais, já apresenta sinais de comprometimento neurológico e neste caso um medicamento antiviral eficiente e neuroprotetor seria desejável.

Muitas famílias virais são de grande importância para a saúde pública e para os animais de grande ou pequeno porte. Dentre alguns vírus pertencentes à família *Herpesviridae* e *Paramyxoviridae,* selecionamos os herpesvirus bovino 1 e 5 e o

vírus da Cinomose Canina para pesquisas do efeito antiviral dos quatro compostos (ácidos fenólicos e flavonóides).

Espera-se que os resultados encontrados com esses compostos possam contribuir para a produção de novas drogas ou para associações medicamentosas para terapêutica dessas infecções.

2 REVISÃO DE LITERATURA

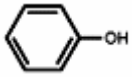
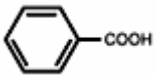
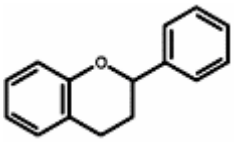
2.1 Compostos fenólicos e flavonóides: potencial de utilização como fitofármacos

2.1.1 Estrutura e função

Os compostos polifenólicos, como os ácidos fenólicos e os flavonóides são grupos de substâncias presentes na natureza em diversos vegetais, frutas e bebidas. Esses compostos são, na maioria, potentes agentes antioxidantes necessários para o funcionamento das células vegetais (KINSELLA 1993).

A estrutura química característica dos flavonóides contendo as posições onde se pode encontrar o grupo hidroxila estão listados na Tabela 1.

Tabela 1: Classificação química de alguns compostos fenólicos.

Classe	Esqueleto Básico	Estrutura Básica
Fenol Simples	C_6	
Ácidos fenólicos	$C_6 – C_1$	
Flavonóides	$C_6 – C_3 - C_6$	

Adaptado de Bravo L. 1998.

Os flavonóides fazem parte de uma classe de compostos fenólicos resultantes do metabolismo secundário de plantas. Quimicamente, os flavonóides apresentam um esqueleto de quinze carbonos unidos em dois anéis fenólicos e um terceiro não fenólico (C_6 C_3 C_6). Os flavonóides são encontrados amplamente distribuídos nas plantas superiores, em caules, folhas e frutos. Muitos estudos já relataram os efeitos de alguns flavonóides sobre a replicação de vírus em animais, onde podem atuar na inativação direta, afetando a entrada do vírus na célula, por meio de efeito antireplicativo e possuindo efeito terapêutico diminuindo sinais clínicos e a infectividade viral (SELWAY 1986, HUDSON 1990, VISON 1998).

Segundo HERMANN (2002), os hábitos alimentares da população brasileira são bastante diversificados. No entanto, de um modo geral, estimou-se que a ingestão diária de flavonóides (cerca de 23 mg/dia), excede àquela de outros agentes antioxidantes como é o caso do β-caroteno (2-3 mg/dia) e da vitamina E (7-10 mg/dia).

Os radicais livres (RL) e espécies reativas de oxigênio (ERO) desempenham papel fundamental no metabolismo celular. No entanto, quando em excesso, podem gerar estresse oxidativo, levando a alterações teciduais responsáveis por diversas patologias, incluindo o câncer (DRÖGE 2002). Antioxidantes são substâncias que reagem com radicais livres impedindo ou diminuindo o estresse oxidativo e a conseqüente destruição tissular (HALLIWELL & GUTTERIDGE 2000). Entre os antioxidantes mais conhecidos estão as vitaminas, principalmente C e E, e os flavonóides, entre os quais são encontrados a quercetina, rutina, hesperidina, naringina, naringenina e sakuranetina (CAMPOS et al. 1996).

Em estudos realizados *in vitro*, muitos compostos polifenólicos naturais parecem ser melhores antioxidantes que as vitaminas C e E, além de terem a capacidade de quelar metais, especialmente cobre e ferro, atuando indiretamente como antioxidantes já que inibem a ação desses metais como catalisadores na formação de radicais livres (CAMPOS & LISSI 1996, CAMPOS et al. 1996).

Embora o mecanismo de ação antioxidante dos flavonóides não esteja totalmente esclarecido e possa variar de acordo com a estrutura química do composto, de modo geral, os flavonóides são capazes de doar hidrogênio para os radicais livres, estabilizando-os e impedindo o estresse oxidativo capaz de gerar danos tissulares ou morte celular (SAIJA 1995, GUO et al. 1999).

Segundo WILLIAMS et al. (2004), a quercetina atua no metabolismo intracelular de fibroblastos humanos levando à formação de produtos de oxidação intracelular, geração de 2`-glutationil quercetina e a desmetilação de substâncias como a forma de quercetina O-metilada.

SOARES et al. (2005) demonstraram que a capacidade antioxidante dos flavonóides foi superior à apresentada pelo ácido L-ascórbico e pela vitamina E em células eucarióticas da levedura *S. cerevisiae* tratadas com apomorfina. Esses resultados foram semelhantes aos resultados obtidos *in vitro* com culturas de células de mamíferos por RICE-EVANS et al. (1996), nos quais os flavonóides apresentaram capacidade antioxidante superior ao do ácido L ascórbico e do α-tocoferol.

Os flavonóides podem estar presentes nas plantas na forma glicosilada, sendo a glicose o carboidrato mais freqüente, embora a forma aglicona (sem açúcar) também ocorra. Os carboidratos podem estar na forma de 8 diferentes monossacarídeos simples e na forma de dissacarídeos ou trissacarídeos que podem estar ligados a diferentes grupos hidroxila dos flavonóides aglicona nas posições C-3 ou C-7 (WILLIAMS & HARBORNE 1994). Mais de 6000 flavonóides já foram identificados nas plantas (Fonte: USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods).

Na maioria dos alimentos, a quercetina é um dos flavonóides encontrados em maior concentração (HARBORNE & WILLIAMS 2000). Foi descrito por ERLUND et al. (2000, 2002) que a quercetina é absorvida rapidamente pelo intestino (médio e cólon) e atinge a corrente sanguínea em 1-2 horas, permanecendo no plasma de 15-18 horas e, que, em dietas ricas em flavonóides, a ingestão habitual corresponde a uma variação plasmática entre 13-16μg/L. A digestão dos flavonóides parece iniciar na saliva e ser finalizado no intestino delgado por meio de hidrolases.

Nos últimos anos, tem-se observado um interesse crescente no estudo da atividade biológica dos flavonóides. Neste sentido, tem-se desenvolvido trabalhos sobre a ação dos flavonóides na biologia das plantas, bioquímica ecológica, quimiotaxia, tecnologia de alimentos e farmacologia.

Muitas pesquisas estão buscando determinar o mecanismo de ação dos flavonóides para definir os efeitos *in vivo* e em diversos tipos celulares da interferência no ciclo celular bem como a influência desses no metabolismo, fisiologia e efeitos dos seus metabólitos resultantes. Pouca atenção vem sendo dada ao potencial intracelular dos flavonóides. A bioatividade da quercetina é a mais pesquisada, seus metabolitos em fibroblastos *in vivo*, os 3'-O-metil quercetina, 4'-O-metil quercetina e 7-O-β-D glicuronil são os principais responsáveis por efeitos de citoxicidade e, ou, citoprotetividade em presença ou ausência de estresse oxidativo (SPENCER et al. 2003).

SPENCER et al. (2003) descreveram outras atividades biológicas da quercetina que incluem efeitos de indução de apoptose e interrupção no ciclo celular sendo, portanto, alvo de estudos sobre seu efeito em terapias anti-cancerígenas.

Os flavonóides também são conhecidos por sua ação estrogênica e antiestrogênica e por esta razão são denominadas de fitoestrogênios. Os três maiores

grupos de fitoestrogênios encontrados são: flavonas, isoflavonas e cumestranos. O poder estrogênico destas substâncias é variável. A soja é uma das plantas considerada fitoestrogênica que contém essas substâncias. No Ocidente ainda não se ingere proteína de soja como no Oriente e a incidência das doenças cardiovasculares devido à alta ingestão de gordura animal é preocupante, pois atualmente as doenças cardiovasculares representam a primeira causa de mortalidade nos EUA. As pesquisas com flavonóides utilizados na prevenção de doenças cardiovasculares têm crescido bastante, pois acredita-se que estes compostos são capazes de carrear as lipoproteínas de baixa densidade (LDH) envolvidas na formação das placas ateromatosas (ERLUND et al. 2000).

O grupo de isoflavona (malonilgenistina, malonildaidzina, genistina, daidzina, genisteína, daidzeína, acetildaidzina, gliciteína, acetilgenistina e equol) tem maior atividade estrogênica e maior afinidade pelos receptores estrogênicos. Um dos metoxi-derivados da isoflavona, chamado de biochaninas, não se liga aos receptores de estrogênios, mas tem efeito estrogênico *in vivo*, embora não se saiba por qual mecanismo celular. A daidzeína e a formononetina têm maior afinidade pelos receptores extrínsicos do que os metoxi-derivados, no entanto, possuem efeito estrogênico fraco *in vivo* diferentemente das biochaninas. A metilação da daidzeína e formonetina poderia ser a explicação pelo qual o efeito estrogênico da isoflavona é reduzido. A diferença existente entre a genisteína e a daidzeína em maior ou menor atividade estrogênica se deve à presença do grupo 5-hidroxila na estrutura da genisteína. As propriedades estrogênicas e antiestrogênicas dos fitoestrogênios decorrem da sua interação com os receptores de estrogênios. As isoflavonas em geral têm atividade estrogênica fraca. Os fitoestrogênios reduzem também os níveis de LDL e a taxa total de colesterol sangüíneo tanto em animais quanto em humanos. Em relação a esses achados, destaca-se que a incidência de coronariopatias na população asiática, comparada com a população dos EUA, é dez vezes menor (HAN et al. 2002, ERLUND 2000).

Os flavonóides têm apresentado atividade antiviral, anticarcinogênica, bactericida, antifúngica, antioxidante, antimutagênica, anti-hipertensiva, antinflamatória e antiproliferativa. Estudos têm mostrado efeitos benéficos dos fitoestrogênios na prevenção de várias doenças crônicas como os cânceres de cólon, mama, próstata e as doenças cardiovasculares. Em pacientes durante o período de pós-menopausa, observou-se que os flavonóides são capazes de reduzir os sintomas e

que poderiam prevenir algumas doenças crônicas que ocorrem no climatério, como a osteoporose (HAN et al. 2002).

Estudos de farmacoquímicos mostraram que flavonóides presentes na espécie do gênero *Byrsonima*, apresentaram atividades antibacteriana, anti-úlcera, antioxidante, antiinflamatória e analgésica. Algumas espécies de *Byrsonima* são de uso etnofarmacológico, como é o caso de *B. crassifólia*, uma planta medicinal utilizada popularmente contra diarréias. Os extratos de caules e raízes dessa planta mostraram atividade bactericida frente à *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epididermis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Micrococcus luteus*, o que torna essa planta recomendável para uso medicinal para infecções contra esses agentes. Além disso, é sabido também que essa planta possui outras funções biológicas como anti-úlcera. Assim, a presença dos flavonóides e outros compostos na espécie em questão, justifica a continuidade de estudos para o uso terapêutico da mesma (SANNOMIYA et al. 2003).

A carqueja (*Baccharis trimera*), planta que ocorre no Sul do Brasil, Paraguai, Bolívia, Uruguai e Argentina, parece apresentar um potencial antimutagênico, antiinflamatório, antifúngico e analgésico. A carqueja tem como propriedades químicas, óleos essenciais, contendo monotérpicos (alfa-pineno, beta-pineno, nopineno), álcoois sesquiterpênicos (carquejol, ésteres terpênicos, acetato de carquegila), flavonas, flavononas e flavonóides, princípios amargos (lactonas) e saponinas. Ela pode ser utilizada no combate à anemia, cálculos biliares, diarréias, enfermidades da bexiga, rins, pâncreas, antibiótica, anti-helmíntica e diurética. Devido a seus princípios ativos amargos, influencia o pâncreas a produzir mais insulina, ajudando a normalizar a glicemia nos portadores de diabetes tipo II, embora não se tenha evidenciado qualquer tendência de redução da glicemia no uso do extrato de *Baccharis trimera*. Alguns estudos investigando a atividade bacteriostática e bactericida da carqueja evidenciaram o possível uso dessa planta em determinadas situações, porém estas não são especificadas. Estudos prévios evidenciaram o efeito antiinflamatório e analgésico do extrato de carqueja utilizando camundongos em sua investigação, onde os autores concluíram que essas propriedades podem estar relacionadas, em parte, pela inibição da biossíntese de prostaglandinas (STANGARLIN 2003). Em estudos com fungos, verificou-se que o extrato bruto de

Baccharis trimera inibiu parcialmente o crescimento micelial de fungos patogênicos testados (STANGARLIN 2003, PINHO et al. 2003).

Há relatos sobre o efeito antireplicativo de flavonóides sobre vírus animais desde 1975. Os flavonóides que possuem atividade antiviral, atuando principalmente sobre a DNA polimerase viral. Estes podem ser divididos em três grandes grupos, de acordo com suas estruturas químicas: chalcona, flavona e flavana (SELWAY 1986, SÁ FILHO 1995). No entanto, atualmente são subdivididos em 5 grupos: flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas e0 antocianinas (Fonte: *USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods*).

A quercetina também tem atividade antiviral relacionada à capacidade desse composto ligar-se a glicoproteínas do envelope ou capsídeo viral interferindo na ligação e penetração do vírus na célula, além da síntese de DNA, também é identificada a interferência dos flavonóides na inibição de proteases celulares dificultando a formação de vírus maduros (FORMICA & REGELSON 1995).

As propriedades antivirais das flavonas foram primeiramente descobertas na década de 40, quando a quercetina apresentou um efeito profilático após ter sido administrada na dieta de ratos infectados intracerebralmente com o vírus da raiva.

Posteriormente, uma grande quantidade de flavonóides tais como a quercetina, rutina e morina, dentre muitos outros, tem apresentado atividade contra vários vírus, incluindo parainfluenza, adenovirus, poliovirus, rhinovirus, Sindbis vírus, herpes simplex, entre outros (WANG et al. 1998).

Todas essas informações nos permitem verificar as diversas e possíveis utilizações dos fitofármacos como terapia em medicina humana e animal. No entanto, mais estudos serão necessários para a determinação da concentração, da estrutura e função, bem como a toxicidade desses compostos antes da utilização como medicamentos terapêuticos. Considerando-se a qualidade dos fitoterápicos, é importante salientar que a preocupação com esta questão inclui rigoroso acompanhamento das diferentes etapas do desenvolvimento e produção destes produtos, desde a coleta do vegetal até a disponibilidade do produto final.

2.1.2 Compostos polifenólicos e flavonóides utilizados como fármacos antivirais

Os vírus da família *Herpesviridae* estão entre os mais empregados nos estudos de fármacos antivirais devido às suas características de infecção e grande importância para saúde pública, além do impacto econômico de suas infecções nos animais e nos humanos. As infecções por herpesvírus, principalmente nos pacientes portadores de HIV, são um dos maiores problemas de saúde pública no mundo e alvo para diversas pesquisas sobre drogas antivirais, incluindo as substâncias fitoterápicas na busca da prevenção das infecções virais e no tratamento dos sinais clínicos relacionados (GONG et al. 2004).

Os estudos sobre drogas antivirais são amplos: há muitas famílias virais sendo utilizadas em pesquisas com fármacos sintéticos produzidos a partir de substâncias naturais e fitoterápicos. Diversos estudos sobre a interação celular e a replicação do HIV utilizando vários flavonóides como quimioterápicos têm sido conduzidos. Já é conhecida a capacidade de alguns flavonóides de se ligarem a proteínas do envelope viral como a gp120 do HIV, dificultando a entrada na célula (adsorção), principalmente a ligação do vírus a receptores CD4+, além de promoverem a regulação negativa dessa célula (LI et al. 2000, DE CLERCQ 2000).

A interação de compostos polifenólicos (flavonóides) com a glicoproteína do envelope viral gp41 do HIV também já foi relatada. Flavinas e cathechinas se ligam à porção N-terminal, hidrofóbica e altamente conservada da gp41. Flavonóides encontrados em várias espécies de plantas incluindo o chá preto e em outras plantas utilizadas como chás terapêuticos em algumas comunidades ou regiões, possuem poder anti-HIV inibindo a entrada e replicação do vírus HIV por vários mecanismos de ação (LIU et al. 2005).

Outros grupos de flavonóides como a Baicalina já foram descritos também como inibidores anti-HIV, atenuando a capacidade do vírus de se ligar e ativar receptores celulares. Essa inibição envolve dois tipos de mecanismos, a de ligação do flavonóide a glicoproteínas do envelope e a receptores celulares, principalmente receptores CD4+, onde a glicoproteína do envelope do HIV denominada gp120 codificada pelo gene “Env” é a principal proteína de ligação que media a fusão com as células que expressam receptores CD4+, e a parada de síntese de DNA celular que contribui para uma menor replicação viral (LI et al. 2000). Um

dos mecanismos antivirais dos flavonóides é também a inibição da transcriptase reversa, dificultando a síntese de DNA viral impedindo a posterior integração ao genoma do hospedeiro (SPEDDING et al.1989).

A hepatite B de humanos causada pelo vírus da HBV (Hepatite B virus) é também um grande problema de saúde pública, afetando cronicamente em torno de 300 milhões de pessoas no mundo (FUNG & LUCK 2003). O HBV, além de causar doença aguda e crônica, é um fator participante no desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. A doença crônica ocorre devido a imunotolerância do organismo e à constante expressão de antígenos causada por esse vírus (BLUMBERG et al. 1989). SHIN et al. (2005) utilizaram três espécies da planta medicinal oriental *Phyllanthus* (*P. urinaria*, *P. amarus* e *P. niruri*) candidatos à terapia antiviral anti-HBV. Além de vários flavonóides identificados nessa planta foi também identificado um composto classificado como ácido elágico, que também apresentou atividade antiviral pelo bloqueio da DNA polimerase viral e inibição da secreção de antígenos (proteína HbeAg, participante da montagem do capsídeo viral) responsáveis pela secreção e pelos danos inflamatórios que levam às lesões crônicas do fígado (cirrose). A HbeAg está envolvida na imunotolerância do organismo ao HBV e a ação do ácido elágico parece estar envolvida na desestabilização e na proteólise da HbeAg, demonstrando que esse flavonóide pode ser um candidato à terapia anti-HBV para tratamento de pessoas com hepatite.

LAHOUEL et al. (2004) relataram a citoprotetividade dos flavonóides (quercetina e diosmina) por meio da inibição da peroxidação lipídica em homogenatos de fígado de camundongos tratados com paracetamol, ciclofosfamida e vinblastina (hepatotóxicos), todos metabolizados no fígado pela enzima citocromo P450. Os flavonóides foram administrados durante 14 dias em camundongos e uma única dose dos três medicamentos testados acima foi administrada intravenosamente. A combinação da administração das drogas com os flavonóides reduziu nitidamente a toxicidade e ativou o "*turn over*" celular, principalmente de enzimas como a glutamina-S-transferase, capazes de estimular a glutaminação e a captação de metabólitos reativos produzidos por essas drogas no fígado.

SCHMITT et al. (2001) descreveram a ação de substâncias com atividades antivirais derivadas de algumas espécies da planta *Hypericum,* comum do sul do Brasil, utilizando como modelo animal o vírus da imunodeficiência felina (FIV), que causa doença semelhante à AIDS em gatos e com patogênese muito

semelhante ao HIV. Entre essas substâncias, alguns flavonóides e ácidos fenólicos extraídos em diferentes concentrações de diversas espécies dessa planta foram testadas. Os níveis de toxicidade e a atividade virucida *in vitro* apresentaram diferentes resultados de acordo com a espécie de planta testada, no entanto, a atividade virucida apresentou os melhores resultados nas plantas que apresentaram maior concentração de flavonóides, sem exceder o nível tóxico para as células.

O herpes simplex 1 (HSV 1), denominado recentemente por alguns autores como HSV encefalite (HSVE), é uma das maiores causas de encefalite esporádica em humanos (KENEDY 2004). A mortalidade e morbidade dos HSVE são significantemente reduzidas quando o diagnóstico é precoce e quando se faz uso de terapia antiviral, no entanto, se a terapia antiviral não é indicada precocemente, as chances de sobrevivência diminuem e muitas vezes podem ocorrer sinais nervosos persistentes (RASCHILAS et al. 2002). A resposta inflamatória do cérebro é um dos fatores responsáveis pelos danos aos neurônios ocasionando os sinais nervosos persistentes, embora esta resposta faça parte dos mecanismos para resolução e remoção do vírus do organismo. Drogas que reduzem a replicação viral e a resposta inflamatória são alvos para o tratamento de encefalites por HSVE auxiliados pelo diagnóstico precoce. A produção de medicamentos específicos para esse fim é objeto para o controle e redução da doença clínica causada pelo HSVE (SELLNER et al. 2005).

A atividade antiviral de extratos de *Geranium sanguineum L.*, planta tradicionalmente usada para o tratamento de lesões de pele, que contém flavonóides, ácidos fenólicos e tanino na sua composição, foi testada contra HSV 1 e 2. Foi demonstrado efeito virucida dependente diretamente da presença e da concentração das diferentes substâncias (flavonóides, ácidos fenólicos e taninos entre outras) encontradas nos diferentes extratos da planta. No entanto, a concentração dessas substâncias está relacionada tanto nos efeitos de redução da atividade viral, bem como aos efeitos citotóxicos encontrados *in vitro*, demonstrando que os diferentes graus de inibição viral são dependentes das concentrações dos flavonóides, ácidos fenólicos e tanino e essas serão decisivas para a determinação de doses e concentrações utilizadas para experimentos *in vitro* e *in vivo* e também para utilização da planta como fármaco antiviral (SERKEDJIEVA & IVANCHEVA 1999).

A atividade bactericida, fungicida e antiviral da própolis proveniente de diferentes locais do mundo foram testadas por KUJUMGIEF et al. (1999). Os autores demonstraram diferentes níveis de atividades antivirais de acordo com a composição e concentração de flavonóides, ésteres e ácidos fenólicos de acordo com os diferentes tipos de composições das própolis testadas, que também variam de acordo com a região, solo, entre outras características. A combinação e a concentração das substâncias que compõem a própolis interferem diretamente na atividade antiviral. Os resultados encontrados em cultivo celular contra o vírus da influenza aviária foram variados e dependentes da composição da própolis testada, teor de álcoois, ácidos e ésteres, no entanto, é necessário verificar a informação e a atividade biológica de cada componente para determinar a verdadeira atividade bactericida, fungicida e antiviral da própolis (KUJUMGIEF et al. 1999).

A maior parte da população é infectada com o citomegalovírus humano (CMV, Human herpesvirus 5), mas somente uma parte da população manifesta sinais clínicos. Entretanto, em pessoas imunocomprometidas, pacientes transplantados e portadores de HIV, a morbidade e a mortalidade podem ser altas (DAVIS et al. 1987, LANDOLFO et al. 2003). Muitas drogas são utilizadas para o controle da infecção e atualmente os flavonóides vêm demonstrando efeito antiviral e antiinflamatório para a infecção.

Há muitos estudos envolvendo flavonóides, entre eles, estudos testando o potencial antiviral da quercetina contra vários vírus de diferentes famílias virais como encefalite eqüina Venezuelana/EEV (ALBA et al. 2002); coronavirus/SARS (YI et al. 2004) e vírus da Influenza (WEI et al. 2004).

Embora cada família viral possua características moleculares, infecciosas, patogênicas e epidemiológicas diferentes, os trabalhos descritos na literatura utilizando compostos fenólicos, entre eles os flavonóides, apontam que pesquisadores diversos acreditam que eles possam ser potenciais drogas antivirais, promissores como terapia antiviral à aquelas já existentes, principalmente para infecções víricas as quais podem ser fatal, como é o caso da cinomose canina. No entanto, a utilização terapêutica dos flavonóides se encontra ainda em expansão necessitando de maiores pesquisas.

2.1.3 Famílias *Herpesviridae* e *Paramyxoviridae* utilizadas como modelos para os testes dos ácidos fenólicos e dos flavonóides

2.1.3.1 Família *Herpesviridae*

Os herpesvirus são vírus que contém uma molécula de DNA, fita dupla, circundados por uma substância amorfa o tegumento, e possuem um envelope glicoproteico. As doenças causadas pelos herpesvirus pertencentes ao gênero *Varicellovirus,* família *Herpesviridae,* subfamília *Alfaherpesvirinae* (ROIZMAN 1992), são as mais comumente observadas em humanos e animais. Elas causam sinais clínicos com muitas características em comum entre os principais representantes de doenças em humanos, como é o caso do herpes simplex 1 e 2 (HSV 1 e 2) que causam doenças epiteliais, labiais e genitais, sendo que o primeiro está associado a infecções labiais e o segundo associado a infecções genitais, ambos produzem infecções recrudescentes e casos esporádicos de encefalites. Outro importante representante dessa família é o vírus da varicella-zoster de humanos (VZV), entre outros (MURPH et al. 1999, MEYER et al. 2001, PEREZ et al. 2002). Em animais, os principais representantes do gênero *Varicellovirus* são os herpesvirus bovino 1 (BoHV 1) que causam infecções respiratórias e genitais em bovinos e os herpesvirus bovino 5 (BoHV 5) que causam meningoencefalites não purulentas em bovinos, ambos relacionados antigenicamente e geneticamente (METZLER et al. 1986, MEYER et al. 2001, PEREZ et al. 2002). Também pertence a essa família o vírus da pseudoraiva ou doença de Aujeszky (PRV) que causa aborto e doença neurológica em suínos. Na subfamília *Betaherpesvirinae* há um importante agente infeccioso representado pelo citomegalovirus humano, que causa mononucleose e infecta, com grande freqüência, portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (MURPH et al. 1999, MEYER et al. 2001, PEREZ et al. 2002,).

A habilidade para invadir, replicar e causar doença no SNC varia entre os herpesvírus neurotrópicos, como o HSV, o PRV, o BoHV 1 e o BoHV 5 (MEYER et al. 2001, PEREZ et al. 2002). Ambos os vírus BoHV 1 e BoHV 5 e o HSV 1 e 2 são neurotrópicos, estabelecendo infecções latentes em seus hospedeiros naturais, preferencialmente no tecido nervoso (em gânglios de neurônios sensoriais e autonômicos e sistema nervoso central) (ROIZMAN 1992, CARON et al. 2002).

Os herpesvirus BoHV 1 e BoHV 5 são importantes patógenos de bovinos, associados a várias manifestações clínicas. A infecção pelo BoHV 1 pode causar rinotraqueíte infecciosa (IBR), balanopostite, conjuntivite e doenças sistêmicas do recém nascido, podem ocorrer casos de encefalite causada por esse vírus, embora não seja comum. O BoHV 5 causa meningocefalite não purulenta em bovinos de todas as idades (ROIZMAN 1992, FLORES 1996, MEYER et al. 2001).

As principais portas de entradas do vírus são as superfícies mucosas do trato respiratório e genital. A transmissão é geralmente associada ao contato íntimo com estas superfícies, mas BoHV 1 e BoHV 5 são, também, propagados por aerossóis e secreções corpóreas. O vírus penetra no hospedeiro e liga-se às células epiteliais onde ocorre o primeiro ciclo de replicação. Do sítio de infecção, o vírus é transportado pelos monócitos para outros órgãos. Em fêmeas gestantes, a viremia pode levar a uma transferência de vírus pela placenta, resultando em abortos. Em bezerros neonatos pode ocorrer a forma septicêmica da infecção, provocada pela viremia (ROIZMAN 1992, MEYER et al. 2001).

A infecção propaga-se, também, por via neural. O vírus multiplica-se intensamente no sítio de infecção e invade as terminações nervosas locais, sendo transportado aos gânglios sensoriais da região. A latência caracteriza-se pela capacidade do genoma viral permanecer na forma epissomal (fora do DNA celular, sem ocorrer replicação do genoma viral). Condições de estresse, como parto, transporte, vacinação, ou ainda tratamento sistemático com corticosteróides, atuam como fatores desencadeadores da reativação viral. Nos casos espontâneos de recrudescência viral, geralmente o animal não apresenta sinais clínicos, tornando-se portador inaparente, capaz de excretar o vírus e assumir papel importante na cadeia epidemiológica da doença. Na reativação induzida por tratamento sistemático com corticosteróides pode ou não ocorrer replicação (FLORES 1996, METZLER et al., 1986, MEYER et al. 2001, CARON et al.2002).

A replicação viral é um dos eventos cruciais para o desenvolvimento da infecção viral, após a adsorção e entrada do vírus na célula é necessário que ele replique, faça a montagem da partícula viral para produzir partículas infectivas, assim infectando outras células e produzindo a infecção lítica na maioria das vezes produzindo os sinais clínicos da infecção em questão (MURPH et al. 1999).

Portanto, os flavonóides como citado acima, podem atuar interferindo desde a adsorção viral aos receptores celulares por meio de inativação da partícula viral, ligação a glicoproteínas do envelope ou nucleocapsideo viral, bem como ligação aos receptores celulares, causando modificações moleculares ou estruturais nessas moléculas interferindo na entrada do vírus na célula.(SPEDDING et al.1989, GONG et al. 2004, LIU et al. 2005). Bem como diretamente em outros eventos da replicação viral, montagem e saída do vírus na célula (FORMICA & REGELSON 1995, SÁ FILHO 1995, SPEDDING et al.1989, WEI et al. 2004, SHIN et al. 2005), e também por meio de atuação na citoprotetividade celular, interferência no ciclo celular e em moléculas e sistemas celulares necessários para funcionamento do aparato celular que podem auxiliar a resistência celular a infecção protegendo a célula contra os agentes virais e seus danos, e até mesmo acionando o mecanismo de apoptose celular o que levaria a célula a morte impedindo a propagação viral (ALBA et al. 2002, HAN et al. 2002, SPENCER et al. 2003, LAHOUEL et al. 2004, SELLNER et al. 2005).

Mesmo tendo em vista as diferenças de replicação viral das famílias, subfamílias, gêneros e subtipos virais, a replicação viral segue eventos necessários para o sucesso da infecção viral no hospedeiro e as possíveis interferências nesta infecção e na proteção celular efetuada pelos compostos fenólicos são citadas acima. Sendo assim faremos uma breve citação sobre a replicação celular de ambas as famílias virais utilizadas nos experimentos para o melhor entendimento da possível atuação dos compostos utilizados nos resultados *in vitro* e *in vivo*.

As maiores características da replicação é que ela é rápida, de 12-20h e lítica em cultivo celular, possuindo a capacidade de estabelecer infecção latente em neurônios. A infecção inicia com a adsorção do vírus a receptores celulares e a posterior penetração na membrana plasmática. O capsídeo envelopado é transportado ao núcleo, onde o DNA é liberado. Transcrição, replicação do DNA e formação do capsídeo ocorre no núcleo (ROIZMAN 1992).

O DNA viral é transcrito pela RNA polimerase celular, e depois replicado pela DNA polimerase viral. A expressão dos genes é perfeitamente regulada e ordenada em relação ao tempo e ocorre em forma de cascata (fase imediatamente rápida, rápida e tardia com a expressão de seus respectivos genes) nessa fase vários produtos virais são enzimas e proteínas que se ligam no DNA para promover a

expressão de genes e a replicação. O mecanismo de replicação é o de "rolling circle", gerando multímeros que são clivados e encapsidados. A formação da partícula ocorre no núcleo, a aquisição do envelope ocorre na membrana nuclear (ou outras membranas como a plasmática, por exemplo). Em células permissivas, o ciclo completa-se em até 20h. A replicação dos *alphaherpesvirus* leva inevitavelmente à destruição celular (ROIZMAN 1992).

2.1.3.2 Família Paramyxoviridae

O vírus da Cinomose Canina ou *Canine distemper virus* (CDV) pertence à família *Paramyxoviridae*, gênero *Morbillivirus*, é um vírus RNA fita simples, polaridade negativa que possui envelope glicoproteico com proteínas que possuem atividade hemaglutinante e neuraminidase. É um vírus pantotrópico, antigenicamente e geneticamente relacionado ao vírus do sarampo de humanos, é de RNA fita simples negativa e é envelopado (MURPH 1999). A Cinomose é uma virose altamente contagiosa, sendo considerada a doença de cães com a mais alta taxa de letalidade após a raiva (APPEL & SUMMERS 1995). É uma doença caracterizada por imunossupressão seguida de infecções secundárias (KRAKOWKA et al. 1985). O vírus replica inicialmente em células epiteliais e tecidos linfóides causando severa imunossupressão. Os órgãos linfóides de cães com Cinomose sofrem hipotrofia que já é observada aos 10 dias após a infecção, sendo acompanhada de elevação no índice apoptótico em órgãos como timo e linfonodos. O curso da doença normalmente é respiratório, digestivo, evoluindo para neurológico, podendo também apresentar a forma cutânea; há a forma descrita como encefalite dos cães idosos, que ocorre em animais acima de seis anos. O vírus induz lesões específicas no SNC e as lesões no cérebro são caracterizadas por encefalopatia aguda, subaguda, crônica e encefalite desmielinizante. A gravidade da doença e das alterações nervosas está relacionada à idade e imunidade do animal quando infectado (KRAKOWKA et al. 1980, KRAKOWKA et al. 1985, MORO 2001).

As enfermidades inflamatórias e infecciosas do sistema nervoso central (SNC) representam um importante grupo de doenças em cães, sendo os sinais clínicos graves muitas vezes incompatíveis com a vida do animal. O vírus da

Cinomose em regiões onde a raiva canina já foi erradicada é a etiologia mais freqüente e importante (APPEL & SUMMERS 1995).

O vírus da Cinomose pode infectar uma grande variedade de carnívoros, incluindo os membros da família *Canidae*. Apesar de a infecção ocorrer em animais de todas as faixas etárias, os filhotes, com idade inferior a três meses, parecem ser os mais susceptíveis devido à imunocompetência do cão, principalmente na fase onde os anticorpos maternais começam a declinar e ainda não há uma resposta imunológica satisfatória estimulada pela primo vacinação (SHELL 1990).

O grau de comprometimento do SNC pode variar, no entanto, dificilmente os cães que atingem essa forma se recuperam dos sinais clínicos. Animais jovens e cães com imunodeficiência, com freqüência, desenvolvem necrose neuronal. Cães adultos e imunocompetentes geralmente apresentam desmielinização. Dependendo da região do SNC comprometida pelo CDV, os sinais neurológicos variam consideravelmente. No entanto, as convulsões e paralisias dos membros pélvicos, juntamente com sinais vestibulares, como ataxia e nistagmo, e cerebelares, como tremores e hipermetria, são os mais frequentemente encontrados em cães com a forma neurológica da cinomose (SHELL 1990).

O diagnóstico da infecção pelo CDV é de difícil realização e geralmente é a partir dos sinais clínicos. O vírus induz a formação de sincícios *in vitro* e *in vivo* (KRAKOWKA et al. 1985). O vírus produz corpúsculos de inclusão em células, principalmente as epiteliais. Áreas de necrose bem delimitadas, desmielinização e inclusões intranucleares, principalmente em astrócitos confirma o diagnóstico, porém este é um método de diagnóstico *post mortem* (JONES et al. 2000).

A replicação dos vírus pertencentes á família *Paramyxoviridae* é complexa, no entanto, todo o aparato e ciclo de replicação dos *morbillivirus,* incluindo o próprio vírus da Cinomose Canina, pode ser considerado mais simples que a replicação dos *alphaherpesvirus*.

A replicação dos vírus RNA de polaridade negativa requer a transcrição de uma cópia de RNA positivo para servir de molde para o RNA (-) genômico. O vírus entra na célula por fusão a membrana plasmática e após a fusão o nucleocapsideo é liberado no citoplasma. A replicação ocorre a partir da síntese do RNA (+) ou antigenômico, durante a replicação que ocorre no citoplasma a capsídeo viral não é desmontado e o vírus carrega seu próprio aparato de proteínas e enzimas para replicação o vírus é transcrito continuamente, o ciclo completo dura de 14 a

20h. O egresso do vírus maduro da célula ocorre por brotamento na membrana plasmática onde adquire seu envelope (KRAKOWKA et al. 1980, KRAKOWKA et al. 1985).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBA J., EDGAR J., JEANNTTE M., OMAR E., RAMOS B., CASTILLO A. Actividad antiviral de flavonoides de *hirtella castilanum* ante los vírus herpes simplex vírus tipo2 encefalitis eqüina Venezolana. Vet. Inst. Nac. Hig. v.33, p. 6-9, 2002.

APPEL M.J.G. & SUMMERS A. Patogenicity of morbilliviroses for terrestrial carnivores. Vet. Microbiol. v.44, p.187-191, 1995.

BARBOSA A.C.V., BRITO W.M.D., ALFAIA B.T. Seroprevalencia and risk factors to the infectious by bovine herpesvirus 1 in Goiás state Brasil. Ciência Rural. v.35, nº 6, Nov/Dec. 2005

BLUMBERG B.S., MILMAN I., VENKATESWARAM P.S., THYAGARAJAN S.P. Hepatitis B virus and hepatocelular carcinoma: treatmant of HBV carriers with *Phyllanthus amarus*. Cancer Detect. Prev. v.14, p.195-201, 1989.

CAMPOS A. M. & LISSI E. A. Total antioxidant potential of Chilean wines. Nutrition Res. v.16, p.385-389, 1996.

CAMPOS A.M., ESCOBAR J., LISSI E.A. The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of Ilex paraguayensis extracts and red wine. J. Braz. Chem. Soc. v.7, p.43-49, 1996.

CARVALHO M., CARVALHO S., PANUTIC S., SUMATI L.M., SOUZA V.A. Prevalence HSV 2 antibody and clinical history of herpes simplex 2 in population Campinas city. v.3, nº 2, p.94-98, 1999

CARON, L., WILKELMANN E. FLORES E.F, WEIBLEN R. Latent infection by bovine herpesvirus type 5 in experimentaly infected rabbits: virus reaction, shedding and recrudescence of neurological disease. Vet. Microbiol. v.84, p.285-295, 2002.

DAVIS M.G., KENNEY S.C., KANINE J., PAGANO J.S., HUANG E. S. Immediate early region of human cytomegalovirus trans-actives the promoter of human immunodeficiency virus. Pro. Natl. Acad. Sci. USA. v.84, p.8642-8946, 1987.

DRÖGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. Phys. Rev. v. 82, p.47-95, 2002.

DE CLERQ E. Current lead natural products for the chemotherapy of humam immunodeficiency virus (HIV) infection. Med. Res. Rev. v. 20 (5), p.329-349, 2000.

ERLUND L., KOSONEM T., ALFTHAN G. Pharmackinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. Eur. J. Clin. Pharmacol. v. 56, p.545-553, 2000.

ERLUND I., SILASTE M.L., ALFTHAN G., RANTALA M., KESÄNIEMI Y. ARO A. Plasma concentrations of the flavonoids naringenin, hesperetin and quercetin in human subjects following their habitual diets, or diets high or low in fruits and vegetables. Eur. J. Clin. Nutr. v. 56, p.891-898, 2002.

FLORES E F. Herpesvirus bovino tipo 1 (BHV-1). Anais. Encontro Internacional de Virologia Molecular Veterinária, Santa Maria, RS, p.149-156, 1996.

FORMICA J.V. & REGELSON W. Review of biology of quercetin and related bioflavanoids. Food Chemical Toxicology, v. 33, p. 1061-1080, 1995.

FUNG S.K. & LUCK A.S. Viral hepatitis. Curr. OPIN. Gastroenterol. v.20, p.241-247, 2003.

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

GUO Q., ZHAO B., PACKER L. Electron spin resonance study of free radicals formed from a procyanidin-rich pine (*Pinus maritima*) bark extract, pycnogenol. Free Rad. Biol. Med. v. 27, p. 1308 – 1312, 1999.

HALDER B., PRAMANIK S., MUKOPHAIDYAY S., GIRI A.K. Anticlastinogenic effects black tea polyphenois theafalavin and thearubugins in human lynphocytes *in vitro*. Toxicology, v.20, p.609-613, 2006.

HAN K.K., SOARES J.S., JÚNIOR M., FERREIRA A., Efeitos dos fitoestrogênios sobre alguns parâmetros clínicos e laboratoriais no climatério. RBGO, v. 24, nº 8, 2002.

HALLIWELL B. & GUTTERIDGE J.M.C. Free radical in biology and medicine. Ed: 3, printed: Clarendon, Oxford, p.936, 2000.

HARBORNE J.B. & WILLIAMS C.A. Advances in flavonoid research . Phytochemistry, v. 55, p. 481-504, 2000.

HERRMANN M.S. Aspectos nutricionais dos flavonóides. In: Estresse oxidativo e antioxidantes. Ed: Ulbra, Porto Alegre, p.105-119, 2002.

HUDSON J.B. Antiviral compounds from plants. CRC Press Florida, USA, p.119-131, 1990.

JONES C.T., HUNT, D. H., KING N.W. Patologia veterinária. São Paulo: Manole, p.1415, 2000.

KENNEDY P.G. Viral encephalitis: causes, differential diagnosis, and management. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, v. 75, nº1, p. 10-15, 2004.

KINSELLA J.E., FRANKEL E., GERMAN B., KANNER J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. Food Technology p. 85-89,1993.

KRAKOWKA S., HIGGINS R.J., KOESTNER A. Canine distemper virus: review of structural and functional modulations in lymphoid tissues. Am. J. Vet. Res. v.41, p.284-292, 1980.

KRAKOWKA S., AXTHELM M.K., JOHNSEM G.C. Canine distemper virus. In: Olsem R.G., KRAKOWKA, S., BLAKESLEE, J.R. Comparative Pathology of Viral Diseases. CRC Press, v. 2, p.137-164, 1985.

KUJUMGIEF A., TSVETKO I., SERKEDJIVA J., IVANOVA I. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. J. of Ethnopharmacology, n° 64, p.235-240, 1999.

KUNG D.C., LANGONI H., SAVOLDI F. Serological survei of infectons bovine rhinotracheits – IBR antibodies detection. In: Panven T, v.15, nº1260, p.287, 1996.

LANDOLFO S., GARIGLIO M., LEMBO D. The human cytomegalovirus. Pharmacol. Ther. v. 98, p.269-297, 2003.

LAHOUEL M., BOULKOUR S., SEGUENI N., FILLASTRE J.P. Effect protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathione hepatique. Phatologie Biologie, v.52, p. 314-322, 2004.

LI B. Q., TAO FU, DONGYAN Y., KANG E.A Flavonoid Baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. Bioch. and Bioph. Res. Comm. v. 276, p. 534-538, 2000.

LIU S., LU H., ZHAO Q., HE Y., NIU J., DEBNATH A.K., WU S., JIANG S. Theaflavin derivatives in black tea and cathechin derivatives in green tea inhibit HIV-1 entry by targeting gp41. Biochim. Biophys Acta, v.25, p.270-281, 2005.

METZLER A.E., SCHUDEL A.A., ENGELS M. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. Arch. Virol. v. 87, p.205-217,1986.

MEYER G., LEMARIE M., ROS C., BELAK K., GABRIEL A., CASSART D., COIGNOUL F., BELAK S., THIRY E. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus type 5. Arch. Virol. v.146, p.633-652, 2001.

MURPHY F.A., GIBBS E.P.J., HORZINEK M.C. & STUDDERT M.J. Veterinary Virolology. 3rd ed. Academic Press, New York. Boston, USA, 629p.,1999.

MORO L. Apoptose na patogenia da cinomose canina, Tese: Escola de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, p.213, 2001.

OLIVEIRA M. C. C., CARVALHO M. G., FERREIRA, D. T., BRAZ-FILHO R. Flavonóides das flores de *Stiffitia chrysantha Mikan*. Química Nova, v.22 nº2, Mar./Apr., 1999.

PEREZ S.E., BRETSCHNEIDER C., LEUNDA M.R., OSÓRIO F.A., FLORES E.F., ODEÓN A.C. Primary infection, latency and reactivation of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in the bovine nervous system. Vet. Pathol. v.39, p. 437-444, 2002.

PINHO D., STURBELLE R.T., COSTA M.A. et al. Avaliação da mutagenicidade de carqueja (*Baccharis trimera*) em teste de linfócitos de sangue periférico

humano. Tese: Escola de Ciências Ambientais da UCPEL, Pelotas, RS, p.103, 2003.

PINTO M.C., DUARTE G., CUNHA S.P, BENEDITO A.L.F. Soroprevalência da infecção por herpes simplex em parturientes avaliados em Ribeirão Preto. Rev. Bras. Ginecol. Obstrt. v.23, nº1, Jan./Fev., 2001.

RASCHILAS F., WOLF M., DELATOUR C., CHAFFAUT C., DE BROUCKER T., CHEFRET S., LEBON P., CANTON P., ROZEMBERG F. Outcome of and prognostic factors for herpes simplex encephalitis in adult patients: results of a multicenter study, Clin. Infect. Dis. v. 35, p.254-260, 2002.

RICE-EVANS C. A., MILLER, N. J., PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Rad. Biol. Med. v.20, p. 933-956, 1996.

ROIZMAN B. The family herpesviridae: an update. Arch. Virol. v.123, p.425-449, 1992.

SAIJA A., SCALESE M., LANZA M., MARZULLO D., BONINA F., CASTELLI F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. Free Rad. Biol. Med. v. 19, nº 4, p.481-486, 1995.

SÁ FILHO D. J. Efeito do extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* e de diferentes flavonóides na multiplicação do vírus Mayaro. Monografia:Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. Monografia, p.40,1995.

SALVADOR S.C., LEMOS R.A.A., RIET-CORREAF. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvirus no Mato Grosso do Sul e São Paulo. Pesq. Vet. Bras. v.18, nº2, p.76-83, 1998.

SANCHES A.W.D., LAHGOHR I.M., STIGGER A.L. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no sul do Brasil. Pés. Vet. Bras. v.20, nº3, p.113-118, 2000.

SANNOMIYA M., BRITO A.R.M., VILEGAS W. XII Congresso Ìtalo-Latino-Americano de Etnomedicina. Estudo químico preliminar do extrato polar de *Byrsonima crassa* (Malpighiaceae), MG. Anais:Set.2003.

SELWAY A. Plant flavonoids in biology and medicine. Biochemical, Pharmacological and Structure - Activity Relationships. v.213, p.521-536, 1986.

SERKEDJIVA J. & IVANCHEVA S. Antiherpes virus activity of extracts from medicinal plant *Geranium sanguineum* L. J. of Ethnopharmacol. v.64, p.59-68, 1999.

SELLNER J., DVORAK F., ZHOU Y., HASS J., KEHM R., WILDEMANN B., MEYDING-LAMADE U. et al. Acute and long-term alteration of chemokine mRNA expression after anti-viral and anti-inflammatory treatment in herpes simplex virus encephalitis. Neuroscience Letters. v.374, p.197-202, 2005.

SHELL L.G. Canine distemper. Comp. Small Anim. v.12, pag.173-179, 1990.

SHIN M.S., KANG E.H., LEE Y.I. A flavonoid from medicinal plants blocks hepattis B virus e antigen secretion in HBV-infected hepatocytes. Antiviral Res. v.67, p.163-168, 2005.

SPEDDING G., RATTY A., MIDDLETON F. Jr. Inhibition of reverse transcriptase by flavonoids. Antiviral. Res. v. 12, p.99-110, 1989.

SPENCER J.P.E., KUHNLE G.G., WILLIANSA R.J. Intracelular metabolism and bioactivity of quercetin and its *in vivo* metabolites. Biochem. J. v.372, p.173-181, 2003.

SCHMIT A.C., RAVAZZOLO A. P., POSER G.L. Investigation of some *Hypericum* species native to Southern of Brazil for antiviral activity. J. of Ethnopharmacology, v. 77, p.239-245, 2001.

SOARES D.G., ANDREAZZA A.C., SALVADOR M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Brazilian J. of Pharmaceutical Sciences. v. 41 (1), Jan./Mar. 2005.

STUDDERT M. J. Bovine encephalitis herpesvirus. Vet. Rec. v.125, p. 584, 1989.

VISON J. A. Flavonoids in foods as *in vitro* and *in vivo* antioxidants. Flavonoids in the living system. Manthey and Buslig Plenum Press, New York, 1998.

WANG H. K., XIA Y., YANG Z. Y., JIANG S. Recent advances in the discovery and development of flavonoids and their analogues as antitumor and anti-HIV agents. Flavonoids in the Living System. Manthey and Buslig Plenum Press, New York, 1998.

WEI F., MA S.C., MA L.Y., BUT P. P., LIN R. C., KHAN I.A. Antiviral flavonoids from the seeds of *Aesculus chinesis*. J. Nat. Prod. v.67, p.650-653, 2004.

WILLIAMS J.R., JEREMY P.E.S., RICE-EVANS C. Flavonoids and isoflavones (Phytoestrogens): absorption, metabolim, and bioactivity. Free Radical Biology & and Medicine, v. 36, nº7, p.838-849, 2004.

WILLIAMS C.A., HARBORNE J.B. In: HARBORNE JB. The flavonoids. Advances in research since 1986. London: Chapman & Hall, p.337-385, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (OMS). Global survallaince and control of Hepatitis C. J. Virol. Hepatitis, n° 6, p.35-47, 2002.

YI L., YUAN K., QU X. et al. Smal moleculas blocking the entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus into host cells. J. Virol. v.78, p. 11334-11339, 2004.

CAPÍTULO 1

Atividade antiviral *in vitro* dos ácidos ferúlico e transcinâmico e dos flavonóides quercetina e Kaempherol sobre a replicação do vírus da Cinomose Canina

VIÇOSA,

MINAS GARAIS - BRASIL

2006

1 INTRODUÇÃO

O vírus da Cinomose Canina pertence à família *Paramyxoviridae*, gênero *Morbillivirus*, é um vírus pantotrópico e antigenicamente e geneticamente relacionado ao vírus do sarampo de humanos. A cinomose é uma virose altamente contagiosa, considerada a doença de cães com a mais alta taxa de letalidade após a raiva (APPEL & SUMMERS 1995). O vírus replica inicialmente em células epiteliais e tecidos linfóides, causando severa imunossupressão e induz lesões específicas no sistema nervoso central (SNC). O curso da doença normalmente é respiratório, digestivo, evoluindo para neurológico, podendo também apresentar a forma cutânea. Há ainda a forma descrita como encefalite dos cães idosos, que ocorre em animais acima de seis anos. As lesões no cérebro são caracterizadas por encefalopatia aguda, subaguda, crônica e encefalite desmielinizante. A gravidade da doença e das alterações nervosas está relacionada à idade e imunidade do animal quando infectado (KRAKOWKA et al. 1985, KRAKOWKA 2000, SHELL 1990).

Os compostos polifenólicos, como os ácidos fenólicos e os flavonóides, entre outros, são grupos de substâncias presentes na natureza que possuem anéis aromáticos com suas respectivas hidroxilas. Esses compostos são, na maioria, potentes agentes antioxidantes necessários para o funcionamento das células vegetais e são encontrados em plantas, frutos e verduras (KINSELLA 1993). Nos últimos anos tem-se observado um interesse crescente em pesquisas da atividade biológica dos flavonóides (OLIVEIRA et al. 1999).

Estudos têm buscado determinar o mecanismo de ação dos flavonóides para definir os efeitos *in vivo* em diversos tipos celulares e a influência desses no metabolismo, fisiologia e efeitos dos seus metabólitos resultantes. Pouca atenção vem sendo dada ao potencial intracelular dos flavonóides. A bioatividade da quercetina é a mais pesquisada, seus metabólitos *in vivo*, os 3'-O-metil quercetina, 4'-O-metil quercetina e 7-O-β-D glicuronídeo em fibroblastos são os principais responsáveis por efeitos de citoxicidade e, ou, citoproteção em presença ou ausência de estresse oxidativo (SPENCER et al. 2003).

A quercetina é um dos flavonóides mais pesquisados com atividade antiviral (FORMICA & REGELSON 1995). As propriedades antivirais das flavonas foram primeiramente descobertas na década de 40 após a quercetina ter sido

administrada na dieta de ratos infectados intracerebralmente com o vírus da raiva e outras viroses, sugerindo que a mesma tenha um efeito profilático. A quercetina, entre muitos outros flavonóides, é caracterizada pelo seu poder antiviral relacionado à sua propriedade se ligar às proteínas do envelope viral, interferindo na ligação e penetração do vírus na célula, bem como na síntese de DNA, devido à interferência na DNA polimerase viral (FORMICA & REGELSON 1995).

Outros flavonóides além da quercetina, como é o caso da rutina e morina, dentre muitos outros, têm apresentado atividade contra vários vírus, incluindo Parainfluenza, Adenovírus, Poliovirus, Rhinovírus, Sindbis vírus, Herpes Simplex, Citomegalovirus, HIV, vírus da encefalite Venezuelana/EEV, vírus da Influenza, entre outros (DAVIS et al. 1987, NAGAI et al. 1995, WANG et al. 1998, ALBA et al. 2002, LANDOLFO et al. 2003).

Os flavonóides também estão sendo descritos como antimutagênicos e anticlastogênicos, isto é, protetores dos cromossomos. Eles impedem que os cromossomos sofram alterações, com isso evitam mutações nas células da medula óssea, protegendo principalmente a reposição de células primárias, ajudando na recuperação de doenças debilitantes da medula óssea e indiretamente nas doenças supressivas que necessitam de reposição celular, como é o caso da leucemia, por exemplo. Esse potencial dos flavonóides também é importante como quimioprotetor em casos de utilização de medicamentos ou quimioterápicos que causam danos à medula e são considerados agentes mutagênicos e clastrogênicos. Várias ações dos flavonóides são pesquisadas pela inibição na molécula p53, na peroxidação lipídica, ação (inibição) sobre o citocromo P450, entre outros mecanismos, ainda não bem conhecidos (HALDER et al. 2006).

A quercetina também foi relatada como neuroprotetora por DAJAS et al. (2003), pois segundo esses autores, além da de proteger do estresse oxidativo, a quercetina está envolvida também na proteção a danos vasculares e danos ao DNA.

A partir das considerações acima sobre o estudo e a busca de novas substâncias com atividade antiviral e citoprotetora, entre outras atividades, o objetivo desse trabalho foi realizar ensaios *in vitro* na busca de possíveis fármacos terapêuticos que possam ser usados nas infecções pelo vírus da Cinomose Canina. Pesquisar sobre a neuroproteção dos flavonóides, principalmente a quercetina,é de grande importância para a fase neurológica da Cinomose Canina, pois muitos dos

casos da doença que chegam às clínicas ou hospitais veterinários, os animais já apresentam comprometimento neurológico da infecção, dificultando o tratamento e a sobrevivência do animal.

2 MATERIAS e MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Virologia Animal do Departamento de Veterinária (DVT), Laboratório de Virologia Molecular Animal (LVMA)-BIOAGRO, Laboratório de Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB), Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários (LBCH)- BIOAGRO, na Universidade Federal de Viçosa-MG.

2.1 Células e vírus

Todos os procedimentos de multiplicação e quantificação viral, bem como os ensaios de concentração máxima não tóxica às células, atividade antiviral e atividade virucida foram realizados com células de linhagem de rim canino (MDCK). As células foram mantidas em meio essencial mínimo (MEM) contendo penicilina (1,6 mg/L), estreptomicina (0,4 mg/L) e suplementadas com soro fetal bovino (10%). A amostra de vírus utilizada foi uma amostra vacinal do vírus da Cinomose Canina do Laboratório Fort Dodge (p: 64261710, v: 02/2007).

2.2 Ácidos fenólicos e flavonóides

Os ácidos fenólicos (o ácido transcinâmico e o ácido ferúlico) e o flavonóide Kaempherol foram cedidos pela Dra. Tânia Toledo de Oliveira do Laboratório de Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV. O flavonóide quercetina foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich. Todas as substâncias foram dissolvidas em dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma), numa concentração final de 20mg/mL para estoque a 4ºC.

2.3 Estoque viral e titulação

Monocamadas de células MDCK foram infectadas e após o monitoramento do efeito citopático, foram congeladas e seu meio aliquotado como estoque. Os estoques virais foram titulados pelo método de $TCID_{50}$.

2.4 Teste colorimétrico (MTT)

As células MDCK foram transferidas para placas de poliestireno de 96 orifícios, sendo que cada orifício recebeu 50 μL de suspensão celular e, em seguida, as placas foram incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 a 37ºC. Após atingirem a confluência, as células foram tratadas com diferentes concentrações de ácidos fenólicos e flavonóides (50μL/orifício), incubadas por quatro dias e monitoradas em microscópio óptico. Para o teste colorimétrico de citotoxicidade, foram usadas concentrações que variaram de 1μg/mL até 200μg/mL em escalas de 10 de ambos os ácidos fenólicos para definição da concentração máxima a ser usada nos experimentos sem citoxicidade, e da mesma forma porém com escalas de 5 variando de 1μg/mL até 50μg/mL de kaempherol e entre 1 e 35 μg/mL de quercetina. Os testes de citotoxicidade para escolha das concentrações dos compostos fenólicos utilizados foram baseados em resultados anteriores de projetos do LVMA/BIOAGRO.

Após quatro dias de incubação, foram adicionados 10μL da solução estoque de MTT em cada orifício e a microplaca incubada por quatro horas em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C. Posteriormente, o sobrenadante foi retirado e 100 μL de isopropanol/HCL a 0,04N foram adicionados a cada orifício. Homogeneizou-se até a completa dissolução dos cristais azuis formados a partir dos sais de tetrazolium. A microplaca foi deixada em descanso por 1 hora para uma melhor dissolução dos cristais e estabilização da cor. A densidade óptica (OD_{540}) foi determinada por espectrofotometria, por meio de um leitor de ELISA, utilizando um comprimento de onda de 570 nm. A porcentagem de células tratadas viáveis foi calculada em relação ao controle não tratado (% de células controle = OD_{exp}/

$OD_{célula\ controle}$ x 100). A CT_{50} é a concentração necessária para reduzir a densidade óptica em 50%.

2.5 Atividades antiviral e virucida

Monocamadas de células MDCK foram cultivadas, infectadas e tratadas separadamente com os ácidos fenólicos e flavonóides, em diferentes tempos e concentrações, sem exceder a concentração máxima não tóxica para as células. Foram mantidas como controle, células MDCK sem tratamento, células tratadas com as respectivas substâncias testes e células apenas infectadas.

As análises da atividade antiviral (tratamento das células pré-infecção) e da atividade virucida (incubação direta do vírus e das substâncias testes) dos ácidos fenólicos e flavonóides foram determinadas pela redução no título ($TCID_{50}$) viral em relação ao controle infectado, visualizado pela redução do efeito citopático (ECP) nas células infectadas e tratadas em relação ao controle viral positivo.

Para avaliação da atividade antiviral, ácidos fenólicos e flavonóides, foram adicionados em monocamadas celulares e incubados em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C por 1h. As substâncias foram diluídas diferentemente, buscando-se usar a máxima concentração dos compostos sem que após as diluições se ultrapassasse a concentração de citotoxicidade e, em seguida, as células foram infectadas com diluições seriadas dos vírus.

Para avaliação da atividade virucida, foi feita uma incubação do vírus com as substâncias testes por 1h e posterior diluição em MEM com igual volume dos respectivos vírus. Para isso, diferentes concentrações dos dois ácidos fenólicos e flavonóides (entre 50-150µg/mL) foram incubadas, separadamente, com o vírus a 37ºC por 1 hora na proporção de 1:1 (100µL/vírus+100µL/substância) de cada concentração teste, e após esse período, o vírus diluído seriadamente na base 10 sendo transferidas para placas de poliestireno de 96 orifícios previamente cobertos com uma suspensão de células MDCK. As microplacas foram incubadas e após 96h foram observadas em microscópio óptico. As atividades antiviral e virucida dos flavonóides foram determinadas pela redução do título viral ($TCID_{50}$) em relação ao controle viral e ao controle celular por meio do monitoramento do ECP.

2.6 Curva de crescimento

As atividades antiviral e virucida dos ácidos fenólicos e flavonóides foram testadas por meio de curva de crescimento viral nos tempos 4, 8, 12, 24, 48 e 72h. Este experimento foi monitorado por 96h em microscópio óptico e as atividades antiviral e virucida foram determinadas pela redução no título viral em relação ao controle viral nos tempos pré-determinados.

A atividade virucida dos ácidos fenólicos e dos flavonóides foram testadas por contato direto, incubando diferentes concentrações das substâncias testes, separadamente, com o vírus (sem diluição) a 37ºC por 1 hora. Já a atividade antiviral foi realizada incubando concentrações máximas não tóxicas das substâncias testes com as células MDCK por 1 hora a 37ºC. Em seguida, procedeu-se à coleta do sobrenadante nos tempos 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas para posterior titulação viral. Após cada período determinado, os sobrenadantes do controle viral e dos tratamentos com as substâncias testes foram coletados e foi realizada a titulação viral ($TCID_{50}$) em microplacas de 96 orifícios monitorados por 96h em microscópio óptico.

3 RESULTADOS

3.1 Citotoxicidade

As concentrações máximas não tóxicas encontradas comparando o controle celular (sem adição dos compostos) com as diferentes diluições dos compostos testados foram observadas em microscópio óptico, visualizando-se morte celular, desprendimento do tapete celular e vacuolização do citoplasma que foram confirmadas pelo teste colorimétrico. A concentração máxima não tóxica às células para ambos os ácidos fenólicos foi de 120µg/mL; já para o flavonóide kaempherol foi de 35µg/mL e para a quercetina, os resultados foram de e 10µg/mL. Nessas concentrações observou-se completa integridade do tapete celular confirmada pela coloração e resultados de densidade óptica do leitor de ELISA do teste colorimétrico. Em concentrações superiores às determinadas acima, foi visualizado citotoxicidade devido à toxicidade das substâncias testes.

3.2 Atividades antiviral e virucida

Nos ensaios de atividade antiviral contra o vírus da Cinomose Canina foram encontrados redução no título viral de 90% (120µg/mL), 46,2% (120µg/mL), 32,48% (35µg/mL) e 78% (10µg/mL) pelo ácido transcinâmico, ácido ferúlico, kaempherol e quercetina, respectivamente.

Nos ensaios de atividade virucida houve redução do efeito em 99,99% (100-150µg/mL), 98% (100µg/mL), 79% (50µg/mL), e 96% (100µg/mL), pelo ácido ferúlico, ácido transcinâmico, kaempherol e quercetina, respectivamente (Figuras 1A e 1B).

3.3 Curva de crescimento

Na curva de crescimento, foram testados os dois tipos de tratamento pré-infecção, ou seja, atividade antiviral e tratamento pós-infecção ou virucida. Os resultados de ambos os tratamentos foram variáveis, nesse ensaio foram

estabelecidos tempos de 4, 8, 12, 24, 48, 72h para coleta e titulação do sobrenadante. As concentrações das substâncias utilizadas seguiram os melhores resultados obtidos nos ensaios anteriores de redução do título viral.

Para o flavonóide quercetina (100µg/mL), os resultados de redução no título viral nos ensaios de atividade antiviral foram de 72% a 99%. Nos ensaios de atividade virucida, os resultados de redução no título viral variaram de 72% a 99,9% (Figura 2).

A curva de crescimento utilizando o vírus da Cinomose Canina com o ácido ferúlico (100µg/mL), mostrou resultados de redução no título viral variando de 32% a 99% nos ensaios de atividade antiviral e resultados de 0 a 99,99% nos ensaios de atividade virucida (Figura 3).

Nos ensaios de atividade antiviral com o flavonóide Kaempherol (50µg/mL), os resultados de redução no título viral variaram entre 32% a 99% e nos ensaios de atividade virucida de 63% a 99% (Figura 4).

Nos ensaios de atividade antiviral com o ácido transcinâmico (100µg/mL), os resultados de redução no título viral variaram entre 53% a 94% e nos ensaios da atividade virucida os resultados variaram de 68% a 99% (Figura.4).

4 DISCUSSÃO

Nos ensaios realizados nesse experimento utilizando o tratamento pré-infecção (atividade antiviral) e o tratamento pós-infecção (atividade virucida), buscou-se verificar a ação das substâncias testes contra o vírus da Cinomose Canina.

Os compostos fenólicos, entre eles os flavonóides, possuem a capacidade de ligar-se a glicoproteínas, dificultando a ligação e a entrada na célula, com isso a interação do vírus aos receptores celulares; já é relatado também a capacidade de alguns desses compostos de se ligarem aos receptores celulares modificando sua estrutura química ou bloqueando o sítio de ligação dos vírus, dessa forma, impedindo a ligação e entrada do vírus na célula. Mecanismos, estes, descritos por LI et al. (2000), WEI et al. (2004), LIU et al (2005).

Portanto, a interferência na ligação e entrada do vírus na célula pode ser uma das atividades apresentadas pelos ácidos fenólicos (ferúlico e transcinâmico) e pelos flavonóides (quercetina e kaempherol) contra a infecção *in vitro* pelo vírus da Cinomose Canina que resultou na redução do título viral encontrado nos experimentos.

SERKEDJIEVA & IVANCHEVA (1999) descreveram em seus experimentos que à medida em que aumentava-se a concentração de vários compostos fenólicos, aumentava-se o potencial virucida dessas substâncias. Os resultados encontrados com o ácido ferúlico no ensaio de atividade virucida concordam com os resultados observados pelos autores, que à medida que aumentou-se a concentração da substância houve aumento da atividade virucida proporcional ao aumento da concentração até a concentração de 100 µg/mL e, em seguida, uma estabilização do potencial virucida. Já para o ácido transcinâmico, quercetina e o kaempherol, os resultados encontrados foram discordantes desses autores, pois à medida que houve um aumento da concentração das substâncias, não houve um aumento da atividade virucida.

Os resultados dos ensaios para diferenciar a atividade antiviral da atividade virucida demonstraram que, para todas as substâncias, os resultados dos ensaios de atividade virucida foram superiores aos resultados testando a atividade antiviral. Embora nos ensaios da atividade antiviral houvesse concentrações residuais dos compostos nos orifícios das placas após o tratamento antiviral, seguido da posterior infecção viral das células, os resultados demonstram que a incubação direta dos

compostos com o vírus foi mais eficiente na redução do título viral. Os mecanismos de possível ligação às glicoproteinas do envelope ou relativa inativação viral não podem ser determinados especificamente com os ensaios realizados.

A interferência na replicação viral, em vários mecanismos bioquímicos envolvidos na atividade e funcionamento celular, no próprio ciclo celular e na apoptose celular são várias atividades demonstradas por compostos fenólicos e flavonóides. Estes mecanismos interferem no efeito antireplicativo viral, bem como na proteção celular, contribuindo para redução da infectividade viral e replicação viral, tornando muitos destes compostos alvos de pesquisa para produção de medicamentos preventivos e terapêuticos para infecções virais em humanos e animais. Provavelmente esses mecanismos contribuíram para os resultados de redução no título viral nos ensaios de atividade virucida, mas não podem ser determinados apenas pelos ensaios realizados.

A curva de crescimento viral para o tratamento virucida mostrou que o ácido ferúlico reduziu o título viral de 99,99% a partir de 12h p.i mantendo essa redução até 72h p.i. Este resultado demonstra excelente ação desse composto na redução do título viral, podendo ser por influência na entrada do vírus na célula, bem como inteferência na replicação viral e,ou proteção celular demonstrando uma potente inibição da replicação viral.

Os resultados da curva de crescimento viral utilizando o flavonóide quercetina, demonstraram também excelente redução do título (99,9%) a partir de 12h p.i. até 48h p.i. No entanto, após 48h p.i., houve replicação viral, evidenciando que partículas virais foram capaz de entrar e replicar na célula mesmo tardiamente e em baixos títulos. Mas esse resultado encontrado não implica na eficácia da quercetina como possível medicamento antiviral e sua utilização em infecções víricas, apenas demonstra que nesse ensaio e na concentração usada a quercetina não foi capaz de inativar ou impedir a completa replicação do vírus.

A quercetina, um dos flavonóides mais estudados devido sua ação antiviral e antioxidante, é caracterizada pelo seu poder antiviral relacionado à capacidade desse composto de se ligar a proteínas do envelope viral, interferindo na ligação e penetração do vírus na célula, bem como na síntese de DNA (FORMICA & REGELSON 1995). A eficácia desse composto contra diversas infecções víricas, antioxidantes, anticancerígenos, envolvimento no ciclo celular como a de citoproteção, também já foi relatada por DAJAS et al. (2003), SPENCER et al.

(2003), SPENCER et al. (2003). No entanto, pesquisas ainda são necessárias para o esclarecimento desses mecanismos.

Contudo, o ácido ferúlico e a quercetina, dos compostos testados, foram os que apresentaram potencial antiviral e virucida com melhores resultados contra o vírus da Cinomose Canina, sendo, portanto candidatos à terapia anticinomose. Embora o kaempherol tenha demonstrado pouca atividade antiviral e virucida, não se deve descartá-lo como candidato à terapia antiviral, pois existe a possibilidade de sua associação com outras substâncias, como drogas comerciais ou naturais, para potencializar as propriedades antivirais.

Estudos subseqüentes sobre ligação do vírus às células e os mecanismos intracelulares envolvidos na replicação viral e saída do vírus da célula poderão esclarecer as possíveis hipóteses da ação antiviral desses compostos para uso terapêutico contra a infecção. Estudos *in vivo* também serão necessários para verificar o potencial terapêutico da quercetina e do ácido ferúlico, que apresentaram os melhores resultados nos ensaios de atividade virucida.

A neuroprotetividade da quercetina descrita por DAJAS et al. (2003) refere-se principalmente à inibição da peroxidação lipídica (função encontrada em outros flavonóides) que envolve também proteção a danos vasculares que induzem decréscimo de energia em forma de ATP, afetando a membrana celular e as trocas iônicas. Devido às características citoprotetora e neuroprotetora da quercetina e às características e formas da doença clínica da Cinomose Canina, a utilização da quercetina buscando um possível efeito antiviral, virucida e neuroprotetor a torna um candidato para desenvolver mais pesquisas *in vitro* e *in vivo* visando à produção de medicamento fitoterápico que possa contribuir para a terapêutica dessa infecção, reduzindo os danos celulares e a doença clínica da Cinomose principalmente, quando já houver comprometimento neurológico da doença.

Fig 4-1. Atividade virucida das quatro substâncias testadas, separadamente, contra o vírus da Cinomose Canina em relação às concentrações: 0 controle viral; 50, 100, 150mg/mL de cada substância teste.

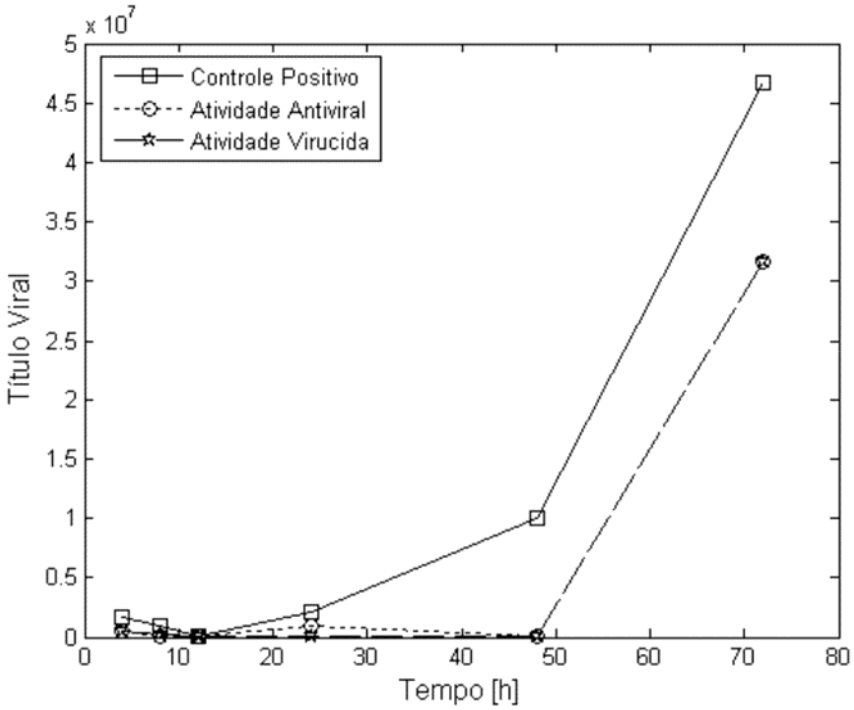


Fig 4-2. Curva de crescimento viral com o flavonóide quercetina (100µg/mL) nos tempos 4, 8, 12, 24, 48, 72 horas, utilizando os dois tipos de tratamentos, atividade antiviral e atividade virucida em relação ao controle viral.

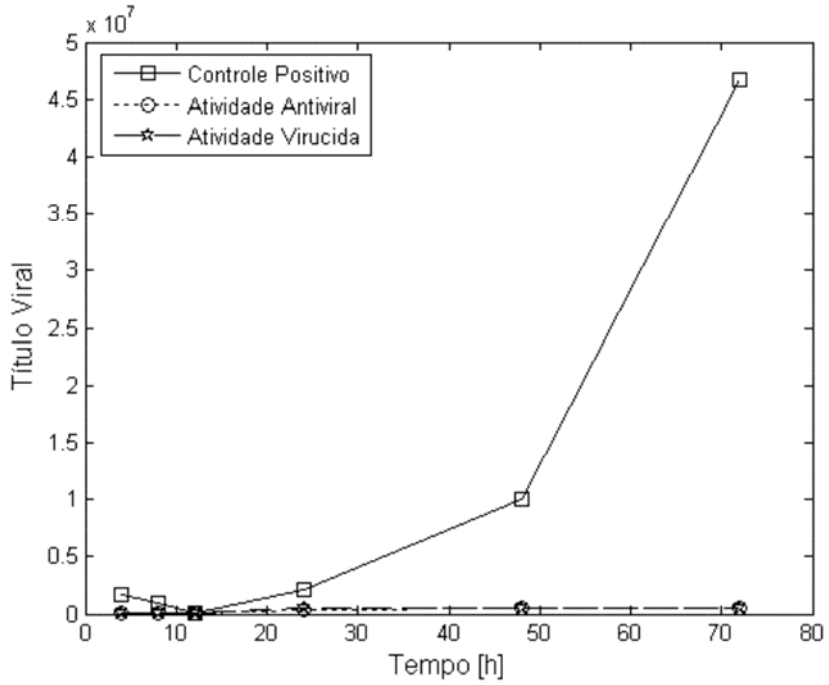


Fig 4-3. Curva de crescimento viral com o ácido ferúlico (100µg/mL) nos tempos 4, 8, 12, 24, 48, 72 horas, utilizando os dois tipos de tratamentos, atividade antiviral e atividade virucida em relação ao controle viral.

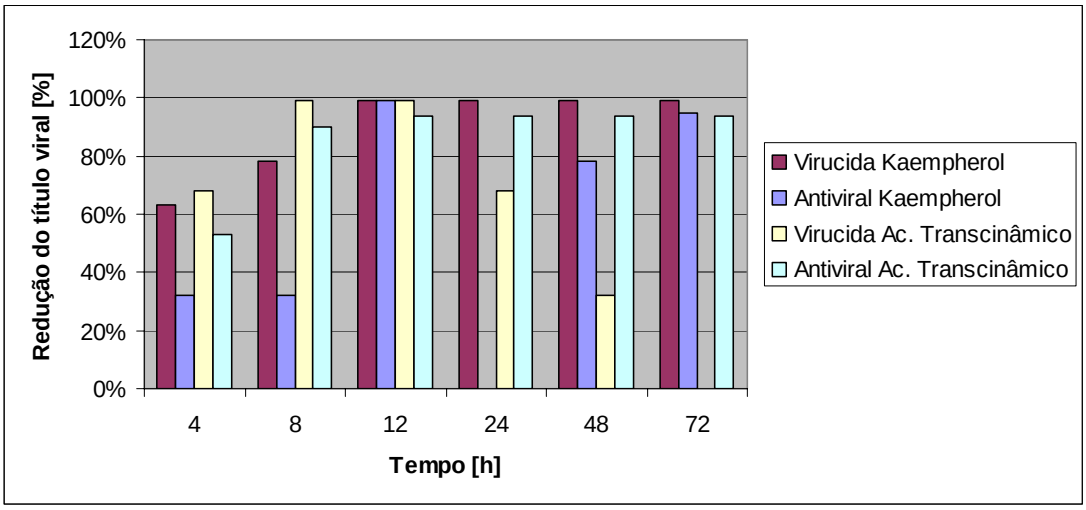


Fig 4-4. Porcentagem de redução do título viral durante a curva de crescimento viral com o ácido transcinâmico (100µg/mL) e kaempherol (50µg/mL) nos tempos 4, 8, 12, 24, 48, 72 horas, utilizando os dois tipos de tratamentos, atividade antiviral e atividade virucida.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBA J., EDGAR J., JEANNTTE M., OMAR E., RAMOS B., CASTILLO A. Actividad antiviral de flavonoides de *hirtella castilanum* ante los vírus herpes simplex vírus tipo2 encefalitis eqüina Venezolana. Rev. Inst. Nac. Hig. v.33, p.6-9, 2002.

APPEL M.J.G. & SUMMERS A. Patogenicity of morbilliviroses for terrestrial carnívores. Vet. Microbiol. v.44, p.187-191, 1995.

DAVIS M.G., KENNEY S.C., KANINE J., PAGANO J.S., HUANG E. S. Immediate early region of human cytomegalovirus trans-actives the promoter of human immunodeficiency virus. Prod. Natl. Acad. Sci. USA, v.84, p.8642-8946, 1987.

DAJAS F., BLASINA F., ARREDONDO F., ABIN-CARRIQUIRY J.A., COSTA G., ECHEVERRY C., LAFON L, HEIZEN H., FERREIRA M. Neuro protection by flavonoids. Braz. J. Med. and Biol. Reser. v.36, p.1613-1620, 2003.

DE CLERQ E. Current lead natural products for the chemotherapy of humam immunodeficiency virus (HIV) infection. Med. Res. Rev. v.20, nº5, p.329-349, 2000.

FORMICA J.V. & REGELSON W. Review of biology of quercetin and related bioflavanoids. Food Chemical Toxicology, v. 33, p.1061-1080, 1995.

HARBORNE J.B. & WILLIAMS C.A. Advances in flavonoid research. Phytochemistry, v.55, p. 481-504, 2000.

KINSELLA J.E., FRANKEL E., GERMAN B., KANNER J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. Food Technology, p.85-89,1993.

KRAKOWKA S., HIGGINS R.J., KOESTNER A. Canine distemper virus: review of structural and functional modulations in lymphoid tissues. Am. J. Vet. Res. v. 41, p.284-292, 1980.

KRAKOWKA S., AXTHELM, M.K., JOHNSEM, G.C. Canine distemper virus. In: Olsem R.G., Krakowka, S., Blakeslee, J.R. Comparative Pathology of Viral Diseases. CRC Press v. 2, p.137-164, 1985.

LANDOLFO S., GARIGLIO M., LEMBO D. The human cytomegalovirus. Pharmacol. Ther. v. 98, p.269-297, 2003.

LAHOUEL M., BOULKOUR S., SEGUENI N., FILLASTRE J.P. Effect protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathione hepatique. Phatologie Biologie. v.52, p.314-322, 2004.

LI B. Q., TAO FU, DONGYAN Y., KANG E.A. Flavonoid Baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. Bioch. and Bioph. Res. Comm. v.276, p.534-538, 2000.

LIU S., LU H., ZHAO Q., HE Y., NIU J., DEBNATH A.K., WU S., JIANG S. Theaflavin derivatives in black tea and cathechin derivatives in green tea inhibit HIV-1 entry by targeting gp41. Biochim. Biophys Acta, v.25, p.270-281, 2005.

MURPHY F.A., GIBBS E.P.J., HORZINEK M.C. & STUDDERT M.J. Veterinary Virolology. 3rd ed. Academic Press, New York. Boston, USA, 629p.,1999.

NAGAI T., MORIGUCHI R., SUZUKY Y., TOMIMORI T., YAMADA H. Mode of action of the anti-influenza virus activity of plant flavonoid, 5,7,4'- trihydroxy-8-methoxyflavone, from the roots of *Scutellaria baicalensis*. Antiviral Res. v.26, p. 11-25, 1995.

OLIVEIRA M. C. C., CARVALHO M. G., FERREIRA D. T., BRAZ-FILHO R. Flavonóides das flores de *Stiffitia chrysantha* Mikan. Química Nova, v.22 Mar./Apr. 1999.

SÁ FILHO D. J. Efeito do extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* e de diferentes flavonóides na multiplicação do vírus Mayaro. Monografia: Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, p.40, 1995.

SELWAY A. Plant flavonoids in biology and medicine. Biochemical, Pharmacological and Structure - Activity Relationships. v.213, p.521-536, 1986.

SERKEDJIVA J. & IVANCHEVA S. Antiherpes virus activity of extracts from medicinal plant *Geranium sanguineum* L. J. of Ethnopharmacol. v. 64, p.59-68, 1999.

SHELL L.G. Canine distemper. Comp. Small Anim. v.12, p.173-179, 1990.

SHIN M.S., KANG E.H., LEE Y.I. A flavonoid from medicinal plants blocks hepatis B virus e antigen secretion in HBV-infected hepatocytes. Antiviral Res. v.67, p.163-168, 2005.

SPENCER J.P.E., KUHNLE G.G., WILLIANSA R.J. Intracelular metabolism and bioactivity of quercetin and its *in vivo* metabolites. Biochem. J. v.372, p.173-181, 2003.

SPEDDING G., RATTY A., MIDDLETON F. JR. Inhibition of reverse transcriptase by flavonoids. Antivir. Res. v. 12, p.99-110, 1989.

VISON J. A. Flavonoids in foods as *in vitro* and *in vivo* antioxidants. Flavonoids in the Living System. Manthey and Buslig Plenum Press, New York, 1998.

WANG H. K., XIA Y., YANG Z. Y., JIANG S. Recent advances in the discovery

CAPÍTULO 2

Atividade antiviral dos compostos fenólicos (Ácidos ferúlico e transcinâmico) e dos flavonóides (Quercetina e Kaempherol) sobre os Herpesvirus bovino 1 e Herpesvirus bovino 5

VIÇOSA,

MINAS GERAIS – BRASIL

2006

1 INTRODUÇÃO

As infecções herpéticas, principalmente nos pacientes portadores de HIV, são um grande problema de saúde pública no mundo e alvo para as mais diversas pesquisas sobre drogas antivirais, incluindo substâncias naturais e associações dessas com fármacos comerciais na busca de prevenção das infecções virais e no tratamento dos sinais clínicos relacionados (GONG et al. 2004). Os herpesvírus pertencem à família *Herpesviridae*, subfamílias *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*. Na subfamília *Alfaherpesvirinae*, encontram-se os principais representantes de doenças em humanos e animais, o herpes simplex 1 e 2 (HSV 1 e 2) que causam doenças epiteliais, labiais e genitais, e o vírus da varicella-zoster de humanos (VZV), entre outros. Nos animais, os principais representantes da subfamília *Alfaherpesvirinae* são os herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV 1) que causam infecções respiratórias e genitais em bovinos e raramente quadros de encefalite e os herpesvirus bovino 5 (BoHV 5) que causam meningoencefalites não purulentas em bovinos, ambos relacionados antigenicamente e geneticamente (METZLER et al. 1986, MEYER et al. 2001, PEREZ et al. 2002). A habilidade para invadir, replicar e causar doença no SNC varia entre os herpesvírus neurotrópicos, como o herpes simplex (HSV), o vírus da pseudoraiva de suínos (PRV), o herpesvirus bovino 1 (BoHV 1) e o herpesvirus bovino 5 (BoHV 5) (ROIZMAN 1992, MURPH et al. 1999, MEYER et al. 2001, BELTRÃO 2000).

O herpes simplex 1 (HSV 1) encefalite (HSVE) é uma das maiores causas de encefalite esporádica em humanos (KENEDY 2004). A mortalidade e morbidade do HSVE são significantemente reduzidas quando o diagnóstico é precoce e se faz uso de terapia antiviral. No entanto, se a terapia antiviral não é indicada precocemente, diminuem as chances de sobrevivência e muitas vezes podem ocorrer sinais nervosos persistentes (RASCHILAS et al. 2002). A resposta inflamatória do cérebro é um dos fatores responsável pelos danos aos neurônios ocasionando os sinais nervosos persistentes, embora faça parte dos mecanismos para resolução e remoção do vírus do organismo. Drogas que reduzem a replicação viral e a resposta inflamatória são alvos para o tratamento de encefalites por HSVE auxiliados pelo diagnóstico precoce. Medicamentos específicos para esse fim são objetos da terapêutica para HSVE (SELLNER et al. 2005).

Os compostos polifenólicos, como os ácidos fenólicos e os flavonóides são grupos de substâncias presentes na natureza em frutas, vegetais e derivados. Esses compostos são, na maioria, potentes agentes antioxidantes necessários para o funcionamento das células vegetais (KINSELLA 1993, CAMPOS & LISSI 1996).

Muitos estudos já relataram os efeitos de alguns flavonóides sobre a replicação de vírus em animais, onde podem atuar na inativação direta do vírus, afetando assim a infectividade ou podem ter efeito antireplicativo (SELWAY 1986, HUDSON 1990, VISON 1998). Flavonóides tais como a quercetina, rutina e morina, dentre muitos outros, são estudados e apresentam atividade contra vários vírus, incluindo parainfluenza, adenovírus, poliovirus, rhinovírus, Sindbis vírus, herpes simplex, entre outros (WANG et al. 1998). Os herpesvírus estão entre uma das famílias virais mais empregadas nos estudos das drogas antivirais devido as suas características de infecção e grande importância para saúde pública, além do impacto econômico de suas infecções nos animais e nos humanos. As infecções por herpesvírus, principalmente nos pacientes portadores de HIV, são um dos maiores problemas de saúde pública no mundo e alvo para diversas pesquisas sobre drogas

desses no metabolismo e fisiologia, bem como os efeitos dos seus metabólitos resultantes. Pouca atenção vem sendo dada ao potencial intracelular dos flavonóides. A bioatividade da quercetina é a mais pesquisada, seu metabólitos *in vivo*, o 3'-O-metil quercetina, 4'-O-metil quercetina e 7-O-β-D glicuronil em fibroblastos são os principais responsáveis por efeitos de citoxicidade e, ou, citoprotetividade em presença ou ausência de estresse oxidativo e também como indutores de apoptose e da interferência no ciclo celular, tornando-os alvos de terapias anticancerígenas (SPENCER et al. 2003). A quercetina tem atividade antiviral relacionada à capacidade desse composto de se ligar a proteínas do envelope viral interferindo na ligação e penetração do vírus na célula, bem como na síntese de DNA (FORMICA & REGELSON 1995, LI et al. 2000).

A atividade antiviral de extratos de *Geranium sanguineum* L., planta tradicionalmente usada para o tratamento de lesões de pele, que contém flavonóides, ácidos fenólicos e tanino na sua composição, foram testados contra HSV 1 e 2. Foi demonstrado relativo efeito virucida dependente diretamente da presença e concentração das diferentes substâncias (flavonóides, ácidos, tanino entre outras) encontradas nos diferentes extratos da planta (SERKEDJIEVA & IVANCHEVA 1999).

Outros grupos de flavonóides como a Baicalina já foram descritos como inibidores anti-HIV, atenuando a capacidade do vírus de se ligar e ativar receptores celulares. Essa inibição envolve dois tipos de mecanismos, o de ligação do flavonóide a glicoproteínas do envelope e a receptores celulares, principalmente receptores CD4+, onde a glicoproteína do envelope do HIV denominada gp120 codificada pelo gene "Env" é a principal proteína de ligação que media a fusão com as células que expressam receptores CD4+, e a parada de síntese de DNA celular que contribui para uma menor replicação viral (LI et al. 2000). Um dos mecanismos antivirais dos flavonóides é também a inibição da transcriptase reversa, dificultando a síntese de DNA viral impedindo a posterior integração ao genoma do hospedeiro (SPEDDING et al.1989). Trabalhos realizados por IMANISHI et al. (2002) envolvendo extratos de chá verde, que possui em sua composição compostos fenólicos como catecinas e picatechinas, entre outros, demonstraram interferência na replicação e maturação (montagem) viral do vírus da Influenza devido à acidificação de compartimentos intracelulares como endossomos e lisossomos m cultivo celular.

O presente estudo teve como objetivo investigar a atividade antiviral de dois ácidos fenólicos e dois flavonóides sobre a replicação viral do BoHV 1 e BoHV 5 e a atividade antiviral ou terapêutica da quercetina *in vivo* sobre a manifestação de doença neurológica em coelhos causada pelo BoHV 5. Os resultados encontrados sugerem a utilização da quercetina como candidata para as infecções causadas por herpesvírus humanos e animais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Virologia Animal do Departamento de Veterinária (DVT), Laboratório de Virologia Molecular Animal (LVMA)-BIOAGRO, Laboratório de Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB) e Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários (LBCH)-BIOAGRO, na Universidade Federal de Viçosa-MG.

2.1 Células, vírus e substâncias testes

Os ensaios *in vitro* foram realizados com células de linhagem de rim bovino (MDBK) livres de pestivirus e células de linhagem de rim bovino resistentes a pestivírus (CRIB) (FLORES & DONIS 1995). As células foram mantidas em meio essencial mínimo (MEM) contendo penicilina (1,6mg/L), estreptomicina (0,4mg/L) e suplementadas com soro fetal bovino ou soro eqüino (10%). Foram utilizadas amostras padrões de laboratório de BoHV 1 (LA) e BoHV 5 (SV/507). Os estoques virais foram titulados pelo método de $TCID_{50}$. Os ácidos fenólicos e o flavonóide kaempherol foram cedidos pela Dra. Tânia Toledo de Oliveira do Laboratório de Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV. O flavonóide quercetina utilizado foi adquirido da Sigma-Aldrich. Todas as substâncias foram dissolvidas em dimetil sulfóxido (DMSO), numa concentração final de 20mg/mL para estoque a 4ºC.

2.2 Citotoxicidade

Para os ensaios de citotoxicidade, monocamadas de células MDBK e CRIB com tapetes celulares semi-confluentes foram tratadas com diferentes concentrações de ácidos fenólicos (transcinâmico e ferúlico) e flavonóides (quercetina e kaempherol) que variaram entre 1 a 200µg/mL, pois o objetivo era utilizar a máxima concentração das substâncias testes que poderia ser usada nos ensaios, sem toxidez para células. A proporção usada é de 1:1 (50µL/MEM, 50µL/células+MEM para 100µL/substâncias) em concentrações de 1 a 200µg/mL.

As células foram incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 a 37ºC e as microplacas foram monitoradas em microscópio óptico por quatro dias. A citotoxicidade foi determinada pelo efeito na morfologia e viabilidade celular de acordo com o aspecto das células não tratadas (controle negativo) com o teste colorimétrico (MTT- Sigma-Aldrich).

2.3 Teste colorimétrico (MTT)

Após 96h de incubação das células com as substâncias testes em diversas concentrações, foram adicionados 10µL de MTT (5mg/mL) em cada orifício e, em seguida, incubou-se a microplaca por quatro horas em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C. Posteriormente, o sobrenadante foi retirado e 100µL de isopropanol/HCL 0,04N foram adicionados a cada orifício. Homogeneizou-se até a completa dissolução dos cristais azuis formados a partir dos sais de tetrazolium. A microplaca foi deixada em descanso por 1 hora para uma melhor dissolução dos cristais e estabilização da cor. A densidade óptica (OD_{570}) foi determinada por espectrofotometria, por meio de leitor de ELISA, utilizando um comprimento de onda de 570nm. A porcentagem de células tratadas viáveis foi calculada em relação ao controle negativo (% de células controle = OD_{exp}/ $OD_{célula\ controle}$ x 100). A CT_{50} é a concentração necessária para reduzir a densidade óptica em 50%.

2.4 Atividade antiviral e virucida

Monocamadas celulares foram cultivadas, infectadas e tratadas separadamente com as substâncias sem exceder a concentração máxima não tóxica. Foram mantidas para efeito do controle do experimento, células infectadas, células não infectadas, células tratadas com as substâncias testes e células não tratadas. A redução do título viral ($TCID_{50\ tratx3.7D}$

citotoxicidade encontrados para cada substância. Em seguida, as microplacas contendo uma proporção de 1:1, isto é, 50 µL de células e 50 µL das substâncias de testes foram incubadas por 1 hora em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C. Após a incubação, foram adicionados 100µL dos vírus BHV1 ou BHV5 em diluições seriadas com base 10, sendo as placas monitoradas por 96 horas e em microscópio óptico para visualização do ECP.

Nos ensaios de atividade virucida (tratamento pós-infecção), diferentes concentrações dos dois ácidos fenólicos e dos flavonóides entre 50-150µg/mL foram incubadas separadamente em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C por 1 hora com o vírus, com o objetivo de determinar qual a melhor concentração das substâncias com atividade virucida. Nesse ensaio buscou-se a utilização da máxima concentração de flavonóides que poderiam ter a melhor concentração dos compostos que poderiam ter atividade virucida, respeitando o limite de citotoxicidade. Após a incubação, os vírus foram adicionados em diluições seriadas para titulação viral, e o aparecimento do efeito citopático monitorado por 96 horas. A atividade virucida dos compostos foi determinada pela redução do título viral ($TCID_{50}$) em relação às células infectadas.

2.5 Curva de crescimento

Ensaios de curva de crescimento viral utilizando células tratadas com a quercetina e vírus tratados com a mesma substância foram realizados. O título viral foi determinado nos tempos 0, 4, 8, 12, 24 e 48 horas por meio de titulação ($TCID_{50}$).

2.6 Ensaios *in vivo*

Trinta e dois coelhos da raça New Zealand, com 90 dias de idade, fêmeas pesando em torno de 1,5kg, soronegativos contra os vírus BoHV 1 e BoHV 5, foram utilizados e alojados em gaiolas individuais, alimentados com 100 a 120g de ração conforme o crescimento e ganho de peso e água fornecida à vontade. Para a inoculação viral e tratamento com quercetina, os animais foram divididos em quatro grupos.

Grupo 1: seis animais inoculados com MEM estéril, não tratados com quercetina (controle negativo);

Grupo 2: seis animais inoculados com MEM estéril e tratados com quercetina (controle da quercetina);

Grupo 3: dez animais inoculados com a amostra neuropatogênica (SV/507) do vírus BoHV 5 e não tratados com quercetina (controle positivo);

Grupo 4: dez animais inoculados com a amostra neuropatogênica (SV/507) do vírus BoHV 5 e tratados com quercetina.

Os animais foram deixados em jejum alimentar por 12h e, em seguida, anestesiados com 0,2mL/kg de uma combinação de zolazepam e tiletamina (Zoletil) administrados por via intramuscular. Após a anestesia, foi feita uma inoculação intranasal com 400µL de suspensão viral (SV/507 $1x10^6$ $TCID_{50}$) via cavidades tréfinas (MEYER et al. 1996). Os grupos 1 e 2 foram inoculados com o mesmo volume de MEM estéril. Após a inoculação, os animais foram monitorados clinicamente até a completa recuperação dos sinais vitais e atividade física.

O tratamento com quercetina foi realizado por meio de cápsulas contendo 20mg/kg de quercetina por via oral. A quercetina foi ministrada a partir do tempo zero (antes da inoculação) até o 12° dia em intervalos de 12/12h.

2.7 Monitoramento clínico, administração de quercetina e coleta de suabes

O acompanhamento clínico foi efetuado diariamente por um período de 18 dias pós-inoculação (p.i.) ou até a morte dos animais. O monitoramento foi feito por meio de exames em busca de sinais clínicos indicativos da replicação viral e da doença neurológica induzida pelo BoHV 5, coleta de suabes nasais e inoculação dos mesmos em cultivo celular para detecção de replicação viral, e monitoramento de sinais clínicos indicativos de replicação viral como: secreção nasal e ocular, anorexia, depressão, salivação, bruxismo, opistótomo, perda do equilíbrio, decúbito, convulsões, coma e morte. Animais que vieram a óbito foram necropsiados e seus órgãos coletados para exames posteriores de histopatologia.

Para medir a intensidade dos sinais clínicos, utilizaram-se scores como:

- score 1: secreções nasal e ocular, depressão, falta de apetite;

- score 2: secreções nasal e ocular, depressão, anorexia, salivação, opistótomo, perda do equilíbrio, bruxismo;
- score 3: anorexia e sinais de comprometimento neurológico grave.

A partir do segundo dia p.i., foram coletados suabes nasais dos dois grupos inoculados com BoHV 5 para isolamento viral a cada 24horas. Os suabes, depois de coletados, foram colocados em tubos de microcentrífuga contendo MEM estéril para posterior inoculação em cultivo celular.

2.8 Isolamento viral

O material coletado dos suabes nasais na presença de MEM estéril foi centrifugado a 1.000x g por 5 min a 4^0C, sendo 250µL do sobrenadante inoculados em placas de poliestireno de 24 poços com tapete celular semi-confluente de células CRIB, seguido de incubação em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 a 37^0C. A observação de ECP foi realizada após 96h de incubação em microscópio óptico. Duas passagens em cultivo celular foram realizadas para a confirmação do diagnóstico de replicação viral.

2.9 Exames histopatológicos

Amostras de rim, fígado e cérebro foram coletadas dos animais necropsiados, fixadas em formalina tamponada a 10%, processadas e coradas seguindo os procedimentos rotineiros para histopatologia.

3 RESULTADOS

3.1 Citotoxicidade

As concentrações máximas não tóxicas encontradas na visualização direta do efeito tóxico pelo microscópio óptico foram confirmadas pelo teste colorimétrico (MTT/CT-50%), sendo que para as células MDBK e CRIB a concentração máxima não tóxica foi de 100µg/mL para ambos o ácidos, ferúlico e trascinâmico, e de 50µg/mL e 20µg/mL para o kaempherol e quercetina, respectivamente. Em concentrações superiores às determinadas acima, foi visualizado vacuolização do citoplasma, morte celular e desprendimento do tapete celular devido a toxicidade das substâncias.

3.2 Atividade antiviral e virucida das substâncias testes

Os resultados da atividade antiviral (tratamento pré-infecção) por meio de redução no título viral contra o BoHV 1 foram de 53% para o ácido ferúlico (100µg/mL), 32% para o ácido transcinâmico(100µg/mL), 85% para o kaempherol (50µg/mL) e de 90% para os e quercetina (20µg/mL).

Para o BoHV 5, os resultados encontrados foram de 78% para o ácido ferúlico (100µg/mL), 71% para o ácido transcinâmico (100µg/mL), 78% para o kaempherol (50µg/mL) e 85% para a quercetina (20µg/mL).

Nos ensaios para observação da atividade virucida, na melhor concentração definida com maior potencial virucida, houve redução do título viral para o BoHV 1 de 68% para o ácidos transcinâmico (100µg/mL), 67% para o ácido ferúlico (100µg/mL), 98% para o Kaempherol (300µg/mL para) 99,99% (300µg/mL) para a quercetina (Figura 2).

Nos ensaios com o vírus BoHV 5, a redução foi de 53% o ácido transcinâmico (50µg/mL), 78% ácido ferúlico (100µg/mL), 53% para o kaempherol (50µg/mL) e de 98% a 99% para a quercetina (a 300µg/mL e 50µg/mL, respectivamente) (Figura 3).

3.3 Curva de crescimento

Para ambos os herpesvirus bovinos, as curvas de crescimento foram realizadas somente com o flavonóide quercetina na concentração de 300µg/mL nos tempos 4, 8, 12, 24, 48 horas, observando-se uma redução do título viral de ambos os herpesvirus de cerca de 99,99% ou cerca de 4 log a partir de 4h p.i. (Figura 4).

3.4 Ensaios *in vivo*

Os animais foram inoculados para avaliação da replicação viral, dos sinais clínicos, tratamento terapêutico e também para avaliação de nefrotoxicidade e hepatotoxicidade nos grupos de animais correspondentes ao controle negativo e no grupo de animais apenas tratados com quercetina sem inoculação viral. Os animais do grupo 2 (inoculados com MEM e tratados com quercetina) não demonstraram nenhum sinal adverso ao tratamento ou sinal clínico, bem como os animais do grupo 1 não apresentaram sinal de infecção (controle negativo).

Já os animais do grupo 3 (controle positivo) apresentaram sinais da infecção viral: dos 10 animais pertencentes a esse grupo, 5 animais apresentaram sinais clínicos da infecção viral, mas apenas 1 dos 5 animais doentes foi a óbito com sinais de comprometimento neurológico grave com infecção aguda pelo BoHV 5. Os sinais clínicos foram observados a partir do quinto dia d.p.i. e permaneceram até o oitavo dia, sendo que os outros animais se recuperaram lentamente permanecendo apáticos e sem ingerir alimentos até 10 d.p.i. No grupo 4 (animais inoculados com BoHV 5 e tratados com quercetina), apenas um animal apresentou aumento da secreção nasal e ocular, sem evoluir para sinais clínicos (Quadro 1).

3.5 Isolamento viral

Dos 20 animais inoculados com BoHV 5, todos foram positivos pelo isolamento viral em suabes nasal, no entanto, foram encontradas diferenças entre os animais não tratados e tratados com quercetina referentes ao tempo de excreção viral (Quadro 1). O número de dias de excreção viral nos animais positivos pelo

isolamento viral foi maior no grupo 3 em média de 2 dias que no grupo 4, bem como o início da excreção viral foi mais tardia no grupo 4 (4 animais no 1º e 2º) quando comparado com o início da excreção viral dos animais do grupo 3 (8 animais no 1° dia e 10 animais no 2º dia) (Quadro 1).

3.6 Exames histopatológicos

As análises histopatológicas de fígado e rim não mostraram sinais compatíveis com hepatotoxicidade e nefrotoxicidade causada pela administração de quercetina na dose utilizada. No rim foram encontrados focos de infiltrados inflamatórios com predominância de células mononucleares, geralmente de localização perivascular ou periglomerular, os quais normalmente ocorrem nesse órgão na fase de viremia, compatíveis com a replicação viral. Em alguns animais do grupo 3 também se observaram áreas de cicatrização. As lesões encontradas nos animais do grupo 3 (controle positivo) foram mais evidentes que nos animais do grupo 4 (animais tratados com quercetina), já que nos primeiros, estes infiltrados eram multifocais (Quadro 2).

No SNC, os achados histopatológicos foram característicos da infecção pelo BoHV 5. Observou-se meningoencefalite, com infiltrado linfocitário, manguitos perivasculares, hiperemia, principalmente nas meninges, gliose, áreas de malácia, hemorragia e neuronofagia. Em alguns casos também se observaram pequenas áreas de necrose, principalmente nos animais do grupo 3. O grau das lesões considerou o número de focos e a extensão das lesões; e as características das lesões focais e difusas demonstraram maior comprometimento do parênquima cerebral nos animais do grupo controle positivo (grupo 3) quando comparado com os animais tratados (grupo 4) (Figura 4).

4 DISCUSSÃO

Compostos fenólicos e flavonóides estão sendo amplamente empregados em pesquisas como potenciais medicamentos contra infecções víricas devido a diversas formas de interações desses compostos como agentes antivirais e como citoprotetores.

Estudos com vários flavonóides tais como a quercetina, rutina e morina, dentre muitos outros, têm apresentado resultados de atividade antiviral contra vários vírus, incluindo parainfluenza, adenovirus, poliovirus, rhinovirus, Sindbis vírus, herpes simplex, entre outros (WANG et al. 1998).

Os herpesvirus são uma das famílias virais mais empregadas nos estudos com drogas antivirais, devido sua importância para população humana, saúde pública, diversas infecções causadas por membros dessa família em várias espécies, além do impacto econômico de suas infecções nos humanos e animais. Em nossos ensaios com os compostos fenólicos (ácido ferúlico e ácido transcinâmico) e os flavonóides (quercetina e kaempherol) buscou-se avaliar o potencial antiviral desses compostos contra o BoHV 1 e 5 em cultivo celular, e avaliar o potencial da quercetina contra a infecção *in vivo* em coelhos infectados com BoHV 5 no tratamento da doença clínica e na replicação viral.

Em pacientes portadores de HIV, as infecções herpéticas são um dos maiores problemas de saúde pública no mundo (GONG et al. 2004). Tratamentos preventivos e terapêuticos para as diferentes infecções herpéticas nesses pacientes tem grande importância, visando principalmente que existe resistência viral a muitos medicamentos comerciais utilizados atualmente. Estudos com medicamentos fitoterápicos ou produzidos sinteticamente.29891Tc -10.665 -1.715ea3iso um dos

Os resultados nos ensaios de atividade antiviral e atividade virucida revelaram que os flavonóides kaempherol e principalmente a quercetina possuem atividade sobre os herpesvirus bovino 1 e 5 concordando com os resultados de SERKEDJIEVA & IVANCHEVA (1999). Nos ensaios de atividade virucida onde a quercetina, à 300mg/mL, apresentou redução do título viral de até 99,99%, demonstrando significativo potencial antiviral, superior àquelas encontradas contra os HSV contra ambos os herpesvirus bovino por essa substância. No trabalho descrito por esses autores com extratos de *Geranium sanguineum L.*, ricos em flavonóides, ácidos fenólicos e tanino contra HSV 1 e 2, o efeito virucida foi proporcional à concentração dessas substâncias. No entanto, apenas com o flavonóide quercetina nossos resultados da atividade virucida foram semelhantes, onde a medida que aumentou-se a concentração desse composto houve aumento da atividade virucida proporcional ao aumento da concentração.

O kaempherol apresentou menor atividade de redução do título viral em relação a quercetina, o que pode ser devido a ausência de uma hidroxila em um dos anéis aromáticos na estrutura do kaempherol que diminui sua capacidade antioxidante. A hidrofobicidade e a polaridade influenciadas pelos radicais das moléculas dos flavonóides, podem interferir na ligação às glicoproteínas do envelope ou capsídeo viral e metabolismo intracelular e replicação viral (DE CLERQ 2000, LI et al. 2000, LIU et al. 2005).

Os resultados na curva de crescimento viral indicam que houve uma interrupção de uma ou mais etapas do ciclo replicativo dos herpesvírus bovinos estudados. A quercetina pode ter provocado falha na ligação e entrada do vírus na célula, nos eventos de replicação viral, como já foi demonstrado para o HIV, HSV 1 e 2 (De CLERCQ 2000, LIU et al. 2005, KHAN et al. 2005)

Nos resultados *in vivo*, no grupo de animais tratados com quercetina observou-se redução da excreção viral em dias (média 2 dias), atenuação dos sinais clínicos e menor mortalidade. O tratamento com a quercetina parece ter apresentado um resultado terapêutico satisfatório, havendo redução da atividade viral, podendo esse efeito estar relacionado com a atuação da mesma nos eventos de replicação viral, bem como citoprotetividade, uma vez que segundo DAJAS et al. (2003), a quercetina protege do estresse oxidativo, danos vasculares e danos ao DNA. Os resultados dos exames histopatológicos dos rins e SNC confirmam os resultados anteriores demonstrando sinais de redução da resposta inflamatória no parênquima

visceral, proteção vascular e menores áreas de cicatrização parenquimal, presumindo-se uma menor replicação viral no grupo de animais tratados, principalmente no parênquima cerebral. A neuroproteção da quercetina já foi relatada por ALBA et al. (2002).

DAJAS et al. 2003 demonstraram que a quercetina inibe a peroxidação de lipídios, podendo atuar na inibição a ação da enzima inositol trifosfato quinase (IP_3 cinase) impedindo a formação de radicais livres.

O potencial antioxidante, neuroprotetor da quercetina, além do potencial antiviral reforça a sua possível utilização em doenças do SNC, entre elas infecções víricas como as encefalites por herpesvírus, tais como, o BoHV 5, HSV 2 e, ocasionalmente o HSV 1, entre outras encefalites virais, como a encefalite eqüina Venezuelana/EEV (ALBA et al. 2002). Devido a semelhanças na replicação e a presença de lesões no SNC causada pelos *Alphaherpesvirus*, pode-se presumir uma ação terapêutica da quercetina para as HSVE humanas, já que ela possui efeito eficaz em lesões epiteliais causadas pelos HSV 1e 2 (SERKEDJIEVA & IVANCHEVA 1999) e apresentou resultados satisfatórios terapêuticos e neuroprotetores contra o BoHV 5.

Os resultados encontrados nesses ensaios, juntamente com os dados já descritos na literatura, permitem sugerir que a quercetina pode ser um candidato a medicamento terapêutico e preventivo contra as infecções herpéticas, bem como para outras viroses e doenças do SNC, devido à sua ação neuroprotetora. Esse efeito preventivo e terapêutico da quercetina, aliado à ausência de toxicidade, reforça o interesse na utilização dessa substância no tratamento antiviral.

Quadro 1: Isolamento viral a partir de suabes nasais coletados do grupo de animais inoculados com o BoHV 5 não tratados e tratados com quercetina.

Animais (Grupo)	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	Sinais clínicos	d.p. (dias positivo/ total)
G3[a] – 1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	Score 1 e 2	**4/9**
G3 – 2	-	+	+	+	+	+	+	-	-		**6/9**
G3 – 3	+	+	+	+	+	+	+	-	-		**7/9**
G3 – 4	+	+	+	-	-	+	-	-	-		**4/9**
G3 – 5	+	+	+	+	+	+	+	Óbito		Score 1, 2 e 3	**7/7**
G3 – 6	+	+	+	+	+	+	+	-	-		**7/9**
G3 – 7	-	+	+	+	+	+	+	-	-		**6/9**
G3 – 8	+	+	+	+	+	+	-	-	-	Score 1 e 2	**6/9**
G3 – 9	+	+	+	+	-	-	-	-	-	Score 1 e 2	**4/9**
G3 – 10	+	+	+	+	+	+	-	-	-	Score 1 e 2	**6/9**
Positivos/Total	**8/10**	**10/10**	**10/10**	**9/10**	**7/10**	**8/10**	**5/10**	**0/9**	**0/9**		
G4[b] – 1	+	+	+	+	+	+	+	-	-		**7/9**
G4 – 2	-	-	-	+	+	+	-	-	-		**3/9**
G4 – 3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Score 1	**5/9**
G4 – 4	+	+	+	+	+	+	+	-	-		**7/9**
G4 – 5	-	-	-	+	+	-	-	-	-		**2/9**
G4 – 6	-	-	+	+	+	-	-	-	-		**3/9**
G4 – 7	+	+	+	+	+	+	+	-	-		**7/9**
G4 – 8	-	-	+	+	+	-	-	-	-		**3/9**
G4 – 9	-	-	+	-	+	+	-	-	-		**3/9**
G4 – 10	-	-	-	-	+	+	-	-	-		**2/9**
Positivos/Total	**4/10**	**4/10**	**7/10**	**8/10**	**10/10**	**6/10**	**3/10**	**0/10**	**0/10**		

[a]G-3: grupo inoculado com a cepa SV-507 do BoHV 5 não tratados. [b]G-4: grupo inoculado com a cepa SV507/BoHV 5 tratados com 20mg/kg de quercetina via oral de 12/12h.

Quadro 2: Análise histopatológica do rim coletado dos animais do grupo controle positivo e do grupo de animais tratados com quercetina.

Tratamentos	Lesões[f]			
	Ausente[1]	Leve[2]	Moderada[3]	Severa[4]
G-1[a]	5/6	1/6	0/6	0/6
G-2[b]	6/6	0/6	0/6	0/6
G-3[c]	1/10	3/10	1/10	5/10
G-4[d]	3/10	2/10	2/10	3/10

[a] G-1 animais do controle negativo; [b]G-2 animais do controle negativo tratados com quercetina [c]G-3 animais controle positivo, [d] G-4 animais positivos e tratados com quercetina. Ausente[1] sem qualquer alteração histopatológica; Leve[2] até 4 focos de lesões inflamatórias em grau leve; Moderada[3] de 4 a 8 focos em grau moderado; Severa[4] de 4 a mais focos com grau severo de comprometimento da área afetada. [f] lesões em ambos os rins.

Quadro 3: Resposta inflamatória no parênquima cerebral dos animais do grupo controle positivo G3 e do grupo de animais tratados com quercetina G4; achados histopatológicos.

Tratamentos	Lesões[c]			
	Ausente[1]	Leve[2]	Moderada[3]	Severa[4]
G-3[a]	0/10	2/10	2/10	6/10
G-4[b]	1/10	6/10	2/10	1/10

[a]G-3 animais controle positivo, [b]G-4 animais positivos e tratados com quercetina. Ausente[1] sem qualquer alteração histopatológica; Leve[2] até 4 focos de lesões inflamatórias com áreas afetadas pequenas; Moderada[3] de 4 a 8 focos em grau moderado; Severa[4] de 4 a mais focos com grau severo de comprometimento da área afetada. [c] parênquima cerebral.

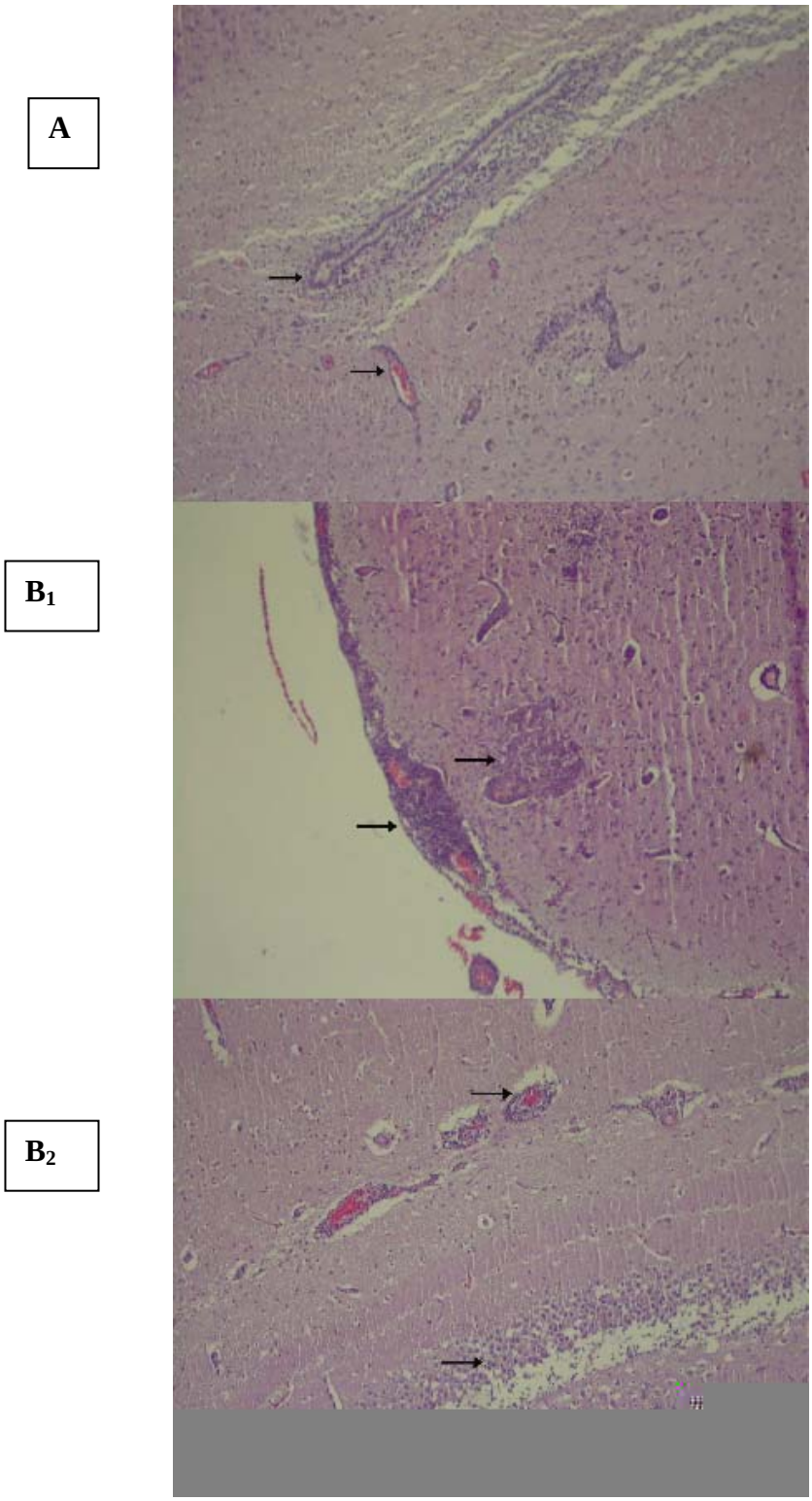


Fig 4-1. **A**: SNC com leve infiltrado inflamatório perivascular (1-2 camadas linfocitárias) e meningite, animal inoculado com BoHV 5 e tratado com quercetina (G4). **B_1**: SNC com intensa meningite, infiltrados inflamatórios perivascular (várias camadas linfocitárias), vasos congestos, áreas de gliose, malácia, animal inoculado com BoHV 5 e não tratado com quercetina (G3) **B_2**: SNC de outro animal do G3 com infiltrados inflamatórios perivascular, subependimário e manguitos perivasculares, muitas células linfocitárias e meningite. H&E, 10X.

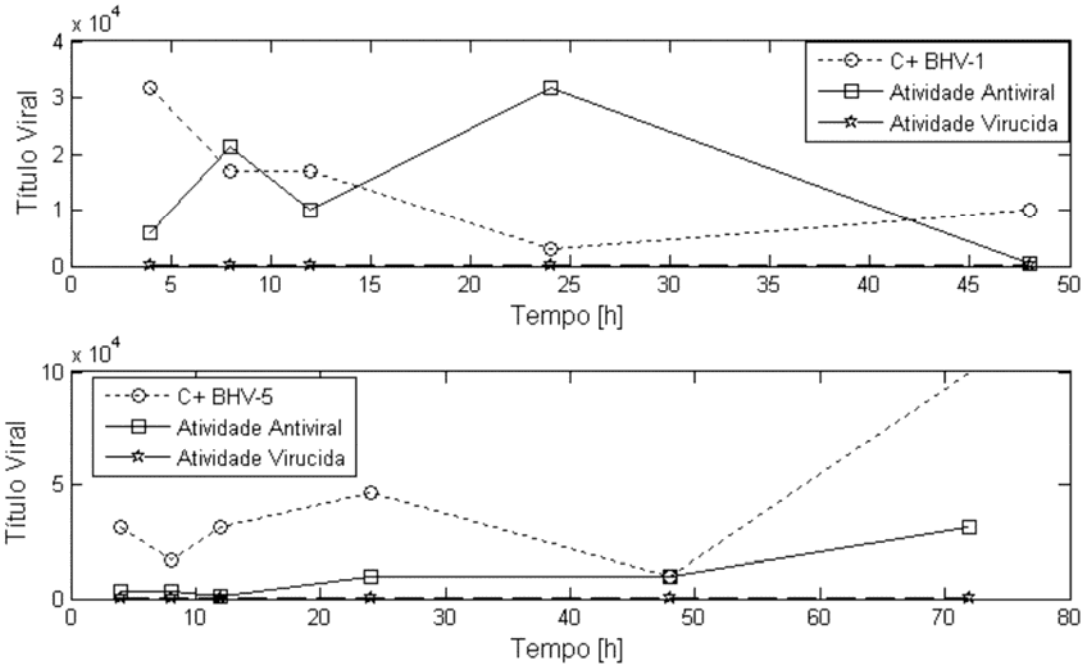


Fig 4-4. Curva de crescimento dos vírus BoHV1 e BoHV5 utilizando a concentração de 250mg/mL de quercetina em ambos os tipos de tratamentos. EAV tratamento pré-infecção ou efeito antiviral; EV tratamento de inativação ou efeito virucida.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBA J., EDGAR J., JEANNTTE M., OMAR E., RAMOS B., CASTILLO A. Actividad antiviral de flavonoides de hirtella castilanum ante los vírus herpes simplex vírus tipo2 encefalitis eqüina Venezolana. Rev. Inst. Nac. Hig. v.33 p.6-9, 2002.

BELTRÃO N., FLORES E.F., WEIBLEN R. Infecção e enfermidade neurológica pelo herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5): coelhos como modelo experimental. Pesq. Vet. Bras. v.20, p.144-150, 2000.

CAMPOS A. M. & LISSI E. A. Total Antioxidant Potential of Chilean Wines. Nutrition Res. v.16, p.385-389, 1996.

DAJAS F., BLASINA F., ARREDONDO F., ABIN-CARRIQUIRY J.A., COSTA G., ECHEVERRY C., LAFON L, HEIZEN H., FERREIRA M. Neuro protection by flavonoids. Brás. Jour. Med. and Biol. Res. v.36, p.1613-1620, 2003.

DE CLERQ E. Current lead natural products for the chemotherapy of humam immunodeficiency virus (HIV) infection. Med. Res. Rev. v.20, nº5, p.329-349, 2000.

ERLUND L., KOSONEM T., ALFTHAN G. Pharamackinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. Eur. J. Clin. Pharmacol. v.56, p.545-553, 2000.

ERLUND I., SILASTE M.L., ALFTHAN G. RANTALA M., KESÄNIEMI Y. ARO A. Plasma concentrations of the flavonoids naringenin, hesperetin and quercetin in human subjects following their habitual diets, or diets high or low in fruits and vegetables. Eur. J. Clin. Nutr. v.56, p.891-898, 2002.

FORMICA J.V. & REGELSON W. Review of biology of quercetin and related bioflavanoids. Food Chemical Toxicology, v.33, p.1061-1080, 1995.

FLORES E. & DONIS R. Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to bovine viral diarrhea virus infection due to a block in viral entry. Virology, v.208, p.565–575, 1995.

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

HARBORNE J.B. & WILLIAMS C.A. Advances in flavonoid research 1992. Phytochemistry. v.55, p.481-504, 2000.

HUDSON J.B. Antiviral compounds from plants. CRC Press, Florida. p.119-131, 1990.

IMANISHI, N., TUJI, Y., KATADA, Y. MARUHASHI, M., KONOSU S. Additional inhibitory effect of tea extract on the growth oh influenza A and B virus in MDCK cells. Microbiol. Immunol. v.46, p.491-494, 2002.

KHAN M.T.H, ATHER A., THOMPSON K.D., GAMBARI R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. Antiviral Res. v.67, p.107-119, 2005.

KENNEDY P.G. Viral encephalitis: causes, differential diagnosis, and management. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. v.75, nº1, p.10-15, 2004.

KINSELLA J.E., FRANKEL E., GERMAN B. AND KANNER J. Possible Mechanisms for the Protective Role of Antioxidants in Wine and Plant Foods. Food Technology, nº4, p.85-89,1993.

LAHOUEL M., BOULKOUR S., SEGUENI N., FILLASTRE J.P. Effect protecteur des flavonoides contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathione hepatique. Phatologie Biologie. v.52, p.314-322, 2004.

LI B. Q., TAO FU, DONGYAN Y., KANG E.A. Flavonoid Baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. Bioch. and Bioph. Res. Comm. v.276, p.534-538, 2000.

LIU S., LU H., ZHAO Q., HE Y., NIU J., DEBNATH A.K., WU S., JIANG S. Theaflavin derivatives in black tea and cathechin derivatives in green tea inhibit HIV-1 entry by targeting gp41. Biochim. Biophys Acta. v.25, p.270-281, 2005.

METZLER A.E., SCHUDEL A.A., ENGEL S. M. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. Arch. Virol. v.87, p.205-217, 1986.

MEYER G., LEMARIE M., ROS C. BELAK K., GABRIEL A., CASSART D., COIGNOUL F., BELAK S., THIRY E. Comparative pathoogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 5. Arch. Virol. v.146, p. 633-652, 2001.

MURPHY F.A., GIBBS E.P.J., HORZINEK M.C. & STUDDERT M.J. Veterinary Virolology. 3rd ed. Academic Press, New York. Boston, USA, 629p.,1999.

OLIVEIRA M. C. C., CARVALHO M. G., FERREIRA D. T., BRAZ-FILHO R. Flavonóides das flores de *Stiffitia chrysantha* Mikan. Química Nova. v.22, Mar./Apr. 1999.

PEREZ S.E., BRETSCHNEIDER C., LEUNDA M.R., OSÓRIO F.A., FLORES E.F., ODEÓN A.C. Primary infection, latency and reactivation of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in the bovine nervous system. Vet. Pathol. v.39, p.437-444, 2002.

RASCHILAS F., WOLF M., DELATOUR F., CHAFFAUT C., DE BROUCKER T., CHEFRET S., LEBON P., CANTON P., ROZEMBERG F. Outcome of and prognostic factors for herpes simplex encephalitis in adult patients: results of a multicenter study, Clin. Infect. Dies. v.35, p.254-260, 2002.

ROIZMAN B. The family herpesviridae: an update. Arch. Virol. v.123, p.425-449, 1992.

SÁ FILHO D. J. Efeito do extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* e de diferentes flavonóides na multiplicação do vírus Mayaro. Monografia: Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 40p. 1995.

SELLNER J. DVORAK F., ZHOU Y., HASS J. KEHM R., WILDEMANN B., MEYDING-LAMADE U. Acute and long-term alteration of chemokine mRNA expression after anti-viral and anti-inflammatory treatment in herpes simplex virus encephalitis. Neuroscience Letters. v. 374, p.197-202, 2005.

SELWAY A. Plant flavonoids in biology and medicine. Biochemical, Pharmacological and Structure - Activity Relationships, v.213, p.521-536, 1986.

SERKEDJIVA J. & IVANCHEVA S. Antiherpes virus activity of extracts from medicinal plant *Geranium sanguineum* L. J. of Ethnopharmacol. v.64, p.59-68, 1999.

SPENCER J.P.E., KUHNLE G.G., WILLIANSA R.J. Intracelular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. Biochem. J. v.372, p.173-181, 2003.

VISON J. A. Flavonoids in foods as *in vitro* and *in vivo* antioxidants. Flavonoids in the Living System. Manthey and Buslig Plenum Press, New York, 1998.

WANG H. K., XIA Y., YANG Z. Y., JIANG S. Recent advances in the discovery and development of flavonóides and their analogues as antitumor and anti-HIV agents. Flavonoids in the Living System. Manthey and Buslig Plenum Press, New York, 1998.

WILLIAMS C.A. & HARBORNE J.B. In: Harborne JB. The Flavonoids. Advances in research since 1986. London: Chapman & Hall; 337-385 p., 1994.

6 CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ Os estudos *in vitro* dos ácidos fenólicos e flavonóides contra os herpesvírus bovino tipo 1 e 5 apresentaram resultados diferentes para os tratamentos antiviral e virucida, sendo que os melhores resultados de redução no título viral foram encontrados no tratamento virucida.
- ✓ Os ácidos fenólicos não apresentaram resultados significativos para ambos os herpesvírus nos dois tipos de tratamentos.
- ✓ Embora o flavonóide kaempherol não tenha apresentado resultados promissores contra os herpesvírus bovino tipo 1 e 5, ele pode ser testado em associação com outras substâncias, pois segundo dados da literatura, esse flavonóide apresenta atividade antiviral, apesar de nossos resultados não confirmarem essa afirmativa.
- ✓ O flavonóide quercetina apresentou os melhores resultados no tratamento antiviral e no tratamento virucida, onde os resultados foram considerados muito bons, pois houve redução de 99,999% no título viral.
- ✓ Nos experimentos *in vivo* utilizando a quercetina em coelhos inoculados com o herpesvirus bovino 5, foram observados redução dos sinais clínicos nos animais tratados, redução da excreção viral, redução da morbidade e mortalidade. Ainda foram encontrados redução na resposta inflamatória no rim e, principalmente no sistema nervoso central, inferindo-se uma suposta neuroproteção da quercetina e também menor replicação viral, devido à redução na replicação viral visualizada no rim e parênquima cerebral dos animais tratados com quercetina.
- ✓ No experimento *in vitro* contra o vírus da Cinomose Canina utilizando os ácidos fenólicos e flavonóides, foram encontrados resultados superiores para todas as substâncias testadas no tratamento virucida e no tratamento antiviral.
- ✓ Houve uma redução significativa no título do vírus da Cinomose Canina no tratamento antiviral pelo ácido ferúlico e pela quercetina. Já o ácido transcinâmico e o kaempherol não apresentaram resultados significativos.

7 PERSPECTIVAS

- ✓ A quercetina parece apresentar um resultado promissor contra infecções por *alhpaherpesvirus*. Novos experimentos para confirmação de seu potencial terapêutico e, ou, preventivo poderão ser realizados para estudar seus mecanismos de ação intracelular e *in vivo*.
- ✓ Com relação ao vírus da Cinomose Canina, pretende-se desenvolver mais estudos *in vitro* com a quercetina e também experimentos *in vivo* para avaliar o potencial terapêutico desse composto no tratamento da doença clínica.
- ✓ Espera-se que a partir dos resultados encontrados por nós e daqueles já descritos na literatura, que a quercetina possa ser utilizada futuramente na clínica de pequenos animais, minimizando os sinais clínicos da doença, principalmente os sinais nervosos responsáveis pela morte e sacrifício dos animais. Sabe-se que não há medicamentos específicos disponíveis no mercado para a sintomatologia nervosa, assim espera-se que a quercetina possa auxiliar na terapêutica dos animais que chegam em estado grave aos veterinários e às clínicas.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo