



Programa de Neuroimunologia



**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
CENTRO DE ESTUDOS GERAIS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE NEUROIMUNOLOGIA**

JULIANA LOURENÇO ABRANTES

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-HSV-1 DE TERPENOS ISOLADOS DE ALGAS
PARDAS MARINHAS**

**NITERÓI
2006**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

CENTRO DE ESTUDOS GERAIS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

PROGRAMA DE NEUROIMUNOLOGIA

JULIANA LOURENÇO ABRANTES

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-HSV-1 DE TERPENOS
ISOLADOS DE ALGAS PARDAS MARINHAS**

Niterói

2006

JULIANA LOURENÇO ABRANTES

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-HSV-1 DE TERPENOS ISOLADOS DE ALGAS PARDAS MARINHAS

Trabalho desenvolvido no laboratório de Virologia Molecular do Departamento de
Biologia Celular e Molecular, Programa de Neuroimunologia, Instituto de Biologia –
UFF.

Dissertação de mestrado
submetida à Universidade Federal
Fluminense como requisito parcial
para obtenção de grau de Mestre
em Neuroimunologia.

Orientadora: Izabel Christina de Palmer Paixão Frugulhetti

Co-orientadora: Valéria Laneuville Teixeira

NITERÓI
2006

Abrantes, Juliana Lourenço

Estudo da atividade anti-HSV-1 de terpenos isolados de algas pardas marinhas./ Juliana Lourenço Abrantes – Niterói, 2006

XIII, 81f

Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia) – Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, 2006

1. HSV-1 2. Produtos Naturais
3. Agentes antivirais 4. Algas Pardas

– Teses. I. Título

CDD

JULIANA LOURENÇO ABRANTES

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-HSV-1 DE TERPENOS ISOLADOS DE ALGAS PARDAS MARINHAS

Dissertação de mestrado
submetida à Universidade Federal
Fluminense como requisito parcial
para obtenção de Mestre em
Neuroimunologia

Niterói, 11 de agosto de 2006

BANCA EXAMINADORA

Dra. Helena Carla Castro Rangel
UFF

Dra. Angélica Ribeiro Soares
UFRJ

Dr. Carlos Frederico Leite Fontes
UFRJ

REVISORA E SUPLENTE

Dr. Elizabeth Giestal de Araújo
UFF

NITERÓI
2006

"A melhor maneira de
ter uma boa idéia é ter
muitas idéias".

Linus Pauling

AGRADECIMENTOS

Às professoras Izabel Frugulhetti e Valéria Laneuville Teixeira pela orientação e amizade.

Aos professores Renato Crespo e Valéria Teixeira e aos alunos do Departamento de Biologia Marinha da UFF, pela colaboração que nos permite o desenvolvimento da pesquisa na área de antivirais.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Neuroimunologia pelos ensinamentos indispensáveis para a minha formação acadêmica.

Aos Professores Carlos Frederico Leite Fontes e Júlio Alberto Mignaco do Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ e a todos os seus alunos, por estarem sempre dispostos a colaborar com o nosso trabalho.

À banca desta dissertação.

À professora Elizabeth Giestal de Araújo pela revisão desta dissertação.

A todos os colegas do curso de Pós-Graduação em Neuroimunologia.

Às amigas Samara e Hania Rosado pela indispensável prestação de serviços técnicos.

A todos os meus amigos, que são muito especiais.

Aos amigos do Laboratório de Virologia Molecular da UFF, Luciano Sant'Anna, Priscila Born, Tamara Fogel, Silmara Souza, Diego Queiroz, Marcelo do Nascimento Costa, Milene Dias Miranda e Thiago Moreno Lopes e Souza.

À minha família por ter me dado apoio e todo suporte necessário para o desenvolvimento desta dissertação.

E ao meu namorado Thiago Moreno Lopes e Souza por toda a orientação profissional, além de todo o carinho, dedicação, companheirismo e amor.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| LISTA DE ABREVIATURAS----- | X |
| RESUMO----- | XII |
| ABSTRACT----- | XIII |
| 1. INTRODUÇÃO----- | 1 |
| 1.1. O Vírus Herpes Simples Tipo 1(HSV-1)----- | 1 |
| 1.1.1 Histórico e Transmissão----- | 1 |
| 1.1.2. Morfologia----- | 4 |
| 1.1.3. Mecanismos da multiplicação viral----- | 8 |
| 1.1.3.1. A entrada do HSV-1 na célula hospedeira (Adsorção e Penetração)- | 8 |
| 1.1.3.2. Latência e ciclo lítico (produtivo) ----- | 11 |
| 1.2. Drogas utilizadas no tratamento de pacientes infectados com HSV-1--- | 18 |
| 1.3. Produtos Naturais----- | 21 |
| 2. OBJETIVOS----- | 26 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS----- | 27 |
| 3.1. Drogas e Linhagens Celulares----- | 27 |
| 3.2. Preparação do Vírus ----- | 27 |
| 3.3. Ensaio de Placa ----- | 28 |
| 3.4. Inibição do Efeito Citopático----- | 28 |
| 3.5. Ensaio de Citotoxicidade ----- | 29 |
| 3.6. Inibição da produção de partículas virais ----- | 30 |
| 3.7. Infecção Curso –Temporal ----- | 30 |
| 3.8. Ensaio de Inibição da Adsorção Viral----- | 32 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.9. | Efeito das substâncias DA-1 e Dol-2 em células infectadas sobre a Síntese de Proteínas ----- | 32 |
| 3.10. | Eletroforese em Gel de Poliacrilamida e Auto-radiografia----- | 33 |
| 3.11. | Ensaio de Inibição da enzima DNA polimerase viral ----- | 33 |
| 3.12. | Análise Estatística ----- | 34 |
| 4. | RESULTADOS ----- | 35 |
| 4.1. | Avaliação da atividade antiviral----- | 35 |
| 4.2. | Avaliação da citotoxicidade----- | 37 |
| 4.3. | Os produtos naturais apresentaram valores de inibição comparáveis ao do ACV----- | 37 |
| 4.4. | As substâncias podem estar atuando em fases iniciais da replicação viral----- | 39 |
| 4.5. | As substâncias não atuam sobre a adsorção viral na célula hospedeira ----- | 42 |
| 4.6. | As substâncias revertem a inibição da síntese de proteínas em células Vero infectadas com HSV-1 ----- | 44 |
| 4.7. | A inibição da expressão de proteínas virais ----- | 46 |
| 4.8. | As substâncias não inibem a atividade da DNA polimerase viral ----- | 49 |
| 5. | DISCUSSÃO ----- | 51 |
| 6. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ----- | 58 |
| 7. | Anexo----- | 75 |

LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g}/\text{mL}$ – micrograma por mililitro

$\mu\text{Ci}/\text{mL}$ – microCurie por mililitro

μM – Micromolar

M - Molar

α -TIF – Fator indutor de transcrição de proteínas de fase α .

ACV – Aciclovir

CC_{50} – Citotoxicidade em 50%

CO_2 – Dióxido de Carbono

DMEM – Dubelcco's modified Eagle medium

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DTT - Dithiothreitol

EC_{50} – Concentração da droga capaz de inibir em 50% a replicação viral

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

FBS – Soro fetal bovino

g – Força da gravidade

HCF – Proteína estabilizadora de fator de transcrição

HCl – Ácido clorídrico

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

HVEM – Mediador da entrada de herpesvirus

HSV-1 – Vírus herpes simples tipo – 1

HSV-2 – Vírus herpes simples tipo - 2

ICP – Proteína de célula infectada

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MHC - Principal complexo de histocompatibilidade

MOI – Multiplicidade de infecção

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbrometo

NGF – Fator de crescimento do nervo

h p.i. – Horas pós - infecção

PBS – Salina tamponada com fosfato

PFU – Unidades formadoras de placas virais

PMSF - Fenilmetilsulfonil fluoreto

RNA – Ácido ribonucléico

RNA_m – Ácido desoxirribonucléico mensageiro

RPM – Rotações por minuto

SDS - Dodecilsulfato de sódio

SI – Índice de Seletividade

TAP – Transportador associado com o processamento do antígeno

TCA – Ácido tricloroacético

TNF – fator de necrose tumoral

TK – Timidina cinase

Vero - Células de rim de macaco verde africano

VHS – *Virus host shut-off*

OCT-1 e OCT-2 – proteínas reguladoras de transcrição

RESUMO

O vírus herpes simples tipo-1 pode causar doenças como encefalite, ceratoconjuntivite e escarificação mucocutânea. O aciclovir é o composto mais utilizado no tratamento de pacientes acometidos por estas doenças. Neste trabalho avaliamos o mecanismo de ação de terpenos isolados das algas pardas *Dictyota menstrualis*, *Dictyota pfaffii* e *Styopodium zonale*, coletadas na costa Brasileira, na replicação “*in vitro*” do vírus Herpes Simples Tipo-1 em células Vero. Podemos observar que estas moléculas inibiram a expressão de proteínas de fase β . Isto sugere que os compostos podem estar atuando sobre a fase α da replicação viral, já que cada etapa da replicação do vírus herpes simples tipo-1 ocorre como uma cascata, onde cada fase é dependente da fase anterior ou que as substâncias poderiam estar atuando sobre proteínas de fase β expressas anteriormente àquelas que foram inibidas.

Palavras-chave: HSV-1, produtos naturais, agentes antivirais e algas pardas.

ABSTRACT

The herpes simplex type-1 virus can cause illness such as encephalitis, keratoconjunctivitis and mucocutaneous scarification. The acyclovir is the reference compound used to treat these threats. In this work, we evaluated the mechanism of action of terpenes isolated from the brown algae *Dictyota menstrualis*, *Dictyota pfaffii* and *Styopodium zonale* collected in Brazilian shore on the “*in vitro*” replication of herpes simplex type-1 virus in Vero cells. We could observe that these molecules inhibited the expression of β proteins. It suggests that the compounds could be acting at α phase of viral replication, since each step of herpes simplex type-1 virus replication occurs in a pathway, in which each phase depends on the previous one or the substances could be acting at β proteins expressed upstream those that were inhibited.

Key-words: HSV-1, natural products, antiviral agents and brown algae.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – O Vírus Herpes Simples tipo 1 (HSV-1)

1.1.1 – Histórico e transmissão

O vírus Herpes Simples tipo 1 (HSV-1), também denominado Herpesvirus Humano tipo 1 (HHV-1) foi primeiramente documentado pelo médico grego Hipócrates (460/377 a.C.), que o batizou de *herpes* (do latim *herpin* = rastejar, reptil) devido ao aspecto das lesões causadas pelo vírus, como vesículas no trato bucal, febre e ulcerações nos lábios. Todas estas manifestações caracterizavam a doença *Herpes febrilis*, descrita mais tarde por Heródoto (484/425 a.C.). No entanto, somente no século XX, entre 1920 a 1960, foi demonstrado que os isolados virais infectavam uma grande gama de hospedeiros, como ratos, camundongos, coelhos, cobaias e macacos. Além disso, também foi demonstrado que este vírus poderia se multiplicar rapidamente em cultura de células fibroblásticas, epiteliais, nervosas e ovos embrionados, levando à lise celular. Em 1968, os pesquisadores Nahmias e Dowdle classificaram o vírus herpes no gênero *Simplex* e, com base em diferenças imunológicas, epidemiológicas e clínicas, separaram este vírus em duas espécies diferentes, classificando-os de HSV-1 e HSV-2 (Miranda *et al.*, 2002). Contudo, desde a última reunião do *International Comitee for Viruses taxonomy* (ICVT) o vírus herpes simples tipo 1 foi classificado como pertencente à família *Herpesviridae* e à subfamília *alphaherpesviridae*,

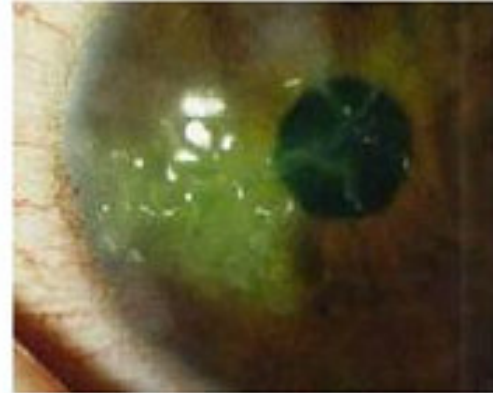
devido as suas características genômicas, sorológicas, ciclo replicativo e latência (Miranda *et al.*, 2002).

Hoje sabemos que a transmissão do HSV-1 ocorre por contato direto da mucosa ou pele com algum tipo de abrasão com as secreções que contenham o vírus em questão. Após sua entrada, as partículas virais são transportadas retrogradamente, ao longo dos neurônios sensoriais até o gânglio trigêmeo, onde podem estabelecer infecções latentes por toda vida do hospedeiro (Brady *et al.*, 2004).

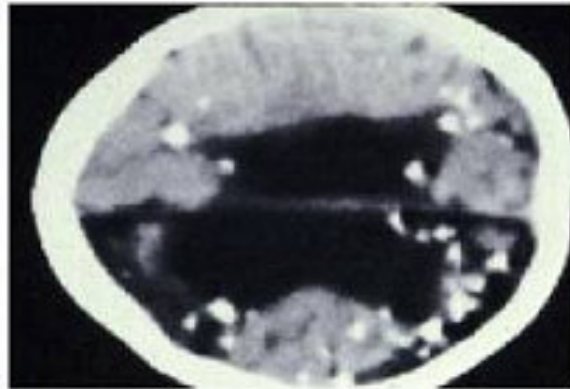
A lesão orolabial recorrente causada pelo HSV-1 tem como sintomas uma vermelhidão em torno dos lábios e pode ser precedida por formigamento ou queimação local (Whitley *et al.*, 2002). O HSV-1 pode causar lesões mucocutâneas, encefalite em pacientes imunocomprometidos e neonatos, e ceratoconjutivite, sendo uma das principais causas de cegueira em países em desenvolvimento (Corey & Spear, 1986) (Esquema 1). Apesar do HSV-1 ser classicamente conhecido como causador do herpes labial, outros herpesvírus como o HSV-2, classicamente descrito como causador do herpes genital, pode ser encontrado no sítio labial; neste caso, a transmissão se dá, sobretudo, através do sexo oral. Da mesma forma pode acontecer a infecção pelo HSV-1 no trato genital, com conseqüente estabelecimento de latência nos gânglios lombo-sacros (Bhattarakosol *et al.*, 2005).



Lesão Orolabial



Ceratoconjunctivite



Encefalite

Esquema 1 - Lesões causadas pelo HSV-1 (<http://www.google.com.br>)

1.1.2 – Morfologia

A partícula viral completa do HSV-1 mede cerca de 150nm. Além disso, este vírus apresenta um envelope lipídico, no qual estão inseridas as glicoproteínas virais e algumas proteínas de envelope, como gE, gI e C-1, relacionadas com a inibição do complemento pelas vias clássica e alternativa. Outras glicoproteínas virais, como gM, gK e gL, estão relacionadas com o espalhamento do HSV-1 pelas junções intercelulares e pela formação de sincício (Flakow, 1996) (Tabela 1).

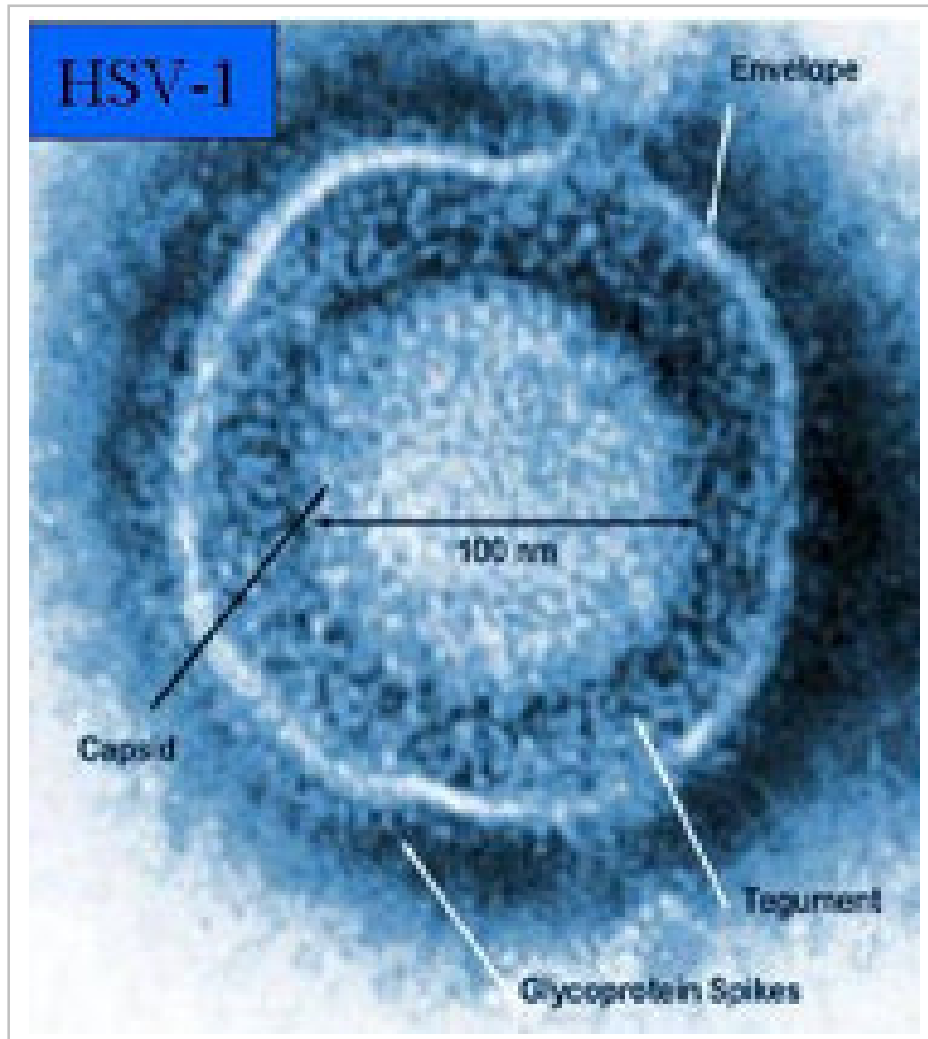
Abaixo do envelope lipídico a partícula viral apresenta um material protéico e amorfo, denominado tegumento, que é composto pela proteína majoritária ICP5 e também pelas proteínas VHS, responsável pela degradação do RNAm celular e desagregação de polissomas, e α -TIF, responsável pela formação do complexo de pré-iniciação, dando início ao processo de transcrição viral. Além do tegumento, o HSV-1 apresenta um capsídeo, também de natureza protéica, que mede cerca de 100nm e que serve de cerne para o genoma viral (Esquema 2).

O genoma viral é representado por uma molécula de DNA dupla fita linear que contém cerca de 150kb, sendo constituído por 2 segmentos: um longo (L) e um curto (S). Estes segmentos estão ligados covalentemente e são flanqueados por seqüências invertidas e repetidas (Esquema 3). No genoma viral existem seqüências para codificação de cerca de 70 proteínas. Durante a infecção ocorre a circularização do DNA viral no núcleo da célula hospedeira (Whitley, 1996; Roizman & Sears, 1996).

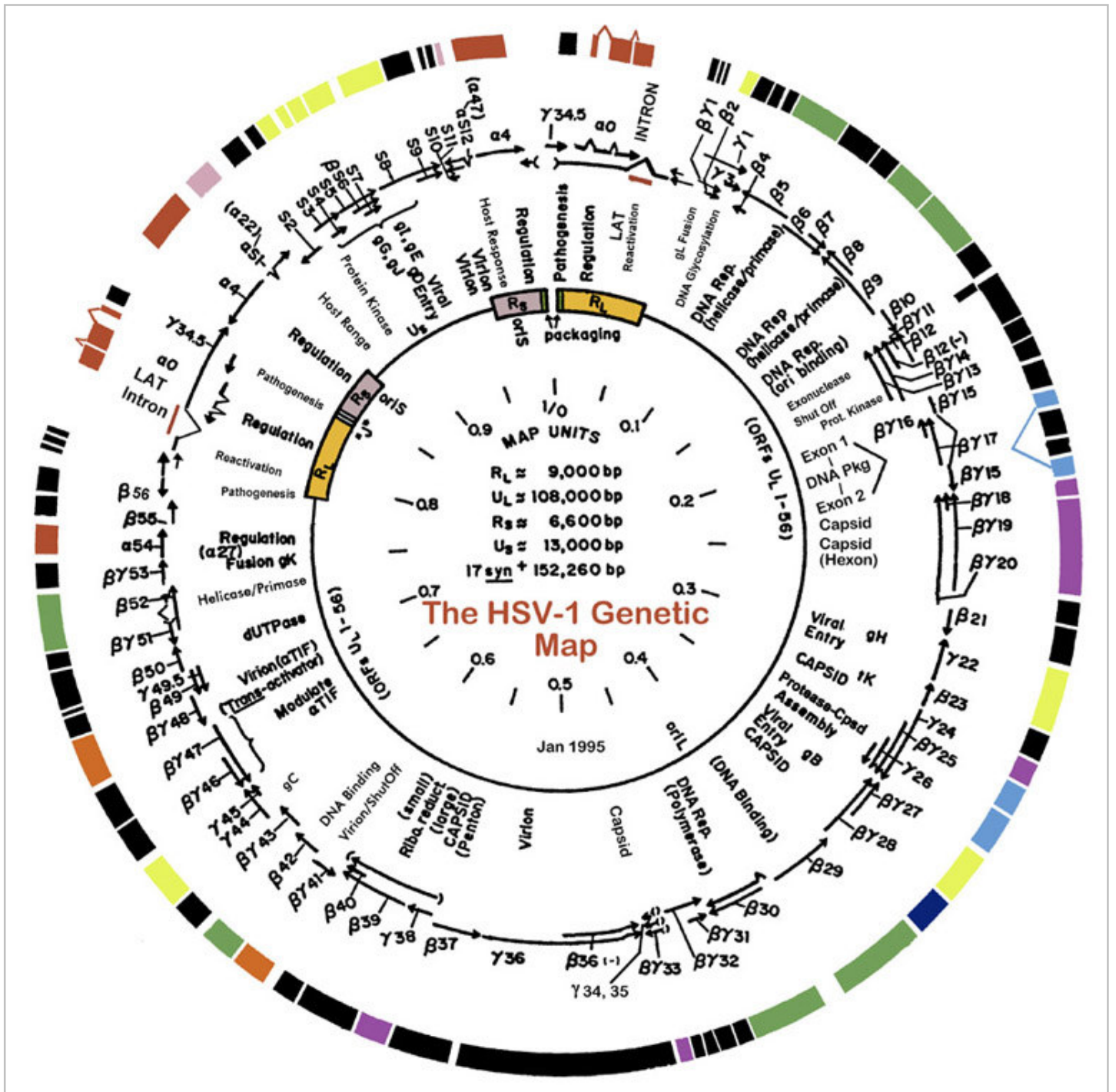
GLICOPROTEÍNAS FUNÇÕES

| | |
|----|--|
| gB | Interação com GAGs; Adsorção e Fusão; Formação de sincício |
| gC | Interação com GAGs |
| gD | Adsorção em receptores diferentes dos GAGs; Espalhamento célula-célula; Não forma sincício |
| gE | Receptor para Fc de Imunoglobulinas |
| gI | Forma complexo com gE; Envolvido com o espalhamento pelas junções intercelulares |
| gH | Forma complexo com gL; Envolvido na fusão do envelope viral com a membrana plasmática |
| gL | Forma complexo com gH |
| gK | Envolvido com o transporte do vírion pelo citoplasma |
| gM | Interação com receptores nas junções intercelulares, mediando o espalhamento viral |

Tabela 1 – Função de algumas glicoproteínas do HSV-1. (Adaptado de Miranda *et al.*, 2002)



Esquema 2 – Eletromicrografia do HSV-1 (<http://darwin.bio.uci.edu>)

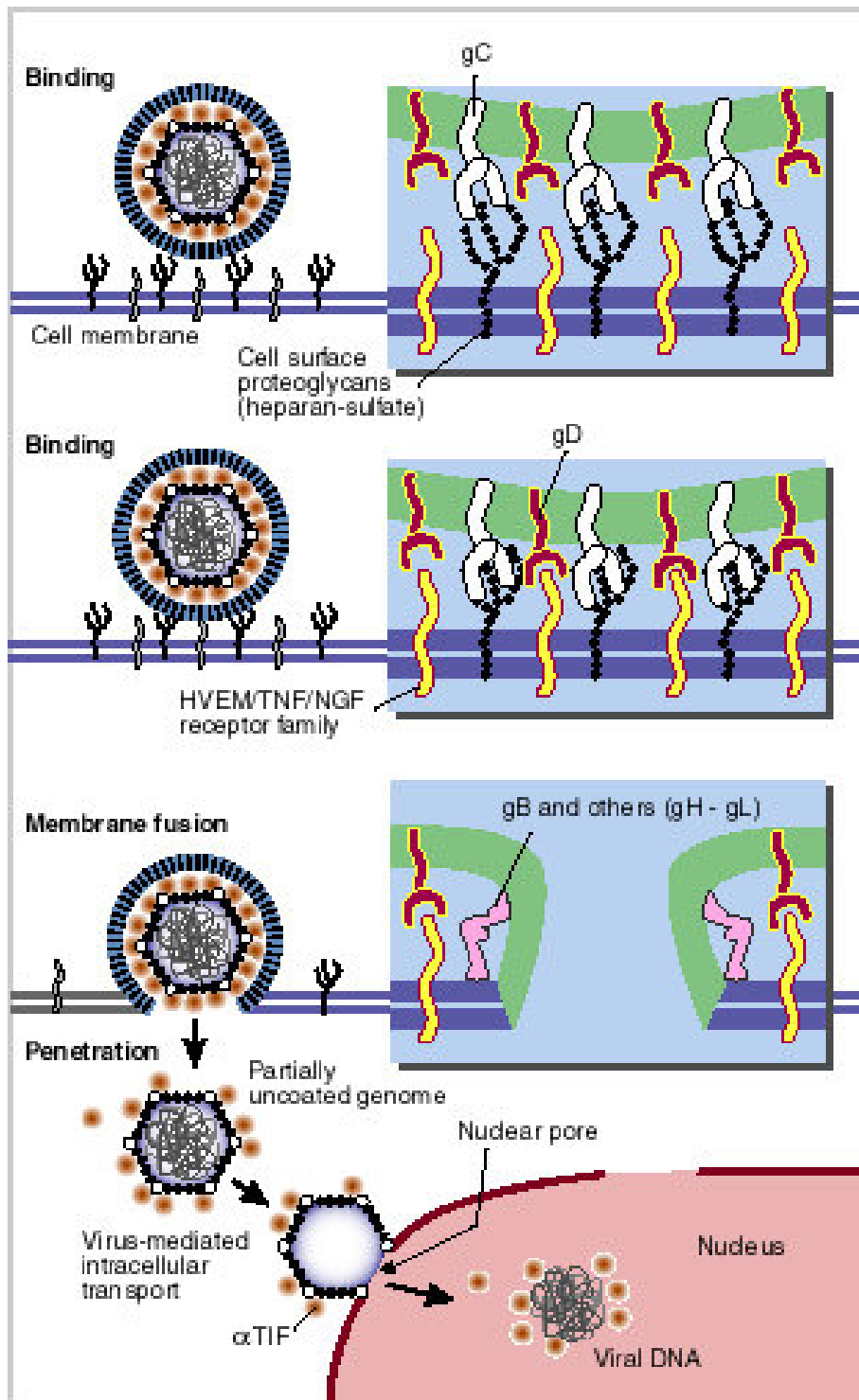


Esquema 3 – Mapa genético do HSV-1 (<http://darwin.bio.uci.edu>)

1.1.3 – Mecanismos da multiplicação viral

1.1.3.1 - A entrada do HSV-1 na célula hospedeira (Adsorção e Penetração)

A primeira etapa da infecção viral inicia-se no momento em que ocorre a adsorção do HSV-1 na célula hospedeira. Nesta etapa, ocorre a interação das glicoproteínas virais gC e gB com proteoglicanos celulares, principalmente com moléculas de heparan sulfato. Após este processo, a glicoproteína gD pode interagir com três tipos distintos de receptores secundários, responsáveis pela entrada do vírus na célula hospedeira (Esquema 4): o mediador da entrada de herpesvírus (HVEM - *herpesvirus entry mediator*), um membro da superfamília dos receptores do TNF/NGF; os receptores da família da Nectina -1 e Nectina -2, membros da superfamília das imunoglobulinas; e moléculas de heparan sulfato modificadas em sítios específicos pela ação da enzima 3 – O – sulfotransferase (Spear *et al.*, 2000; Spear & Longnecker, 2003; Spear, 2004; Spear *et al.*, 2006).



Esquema 4 – Entrada do HSV-1 na célula hospedeira (<http://darwin.bio.uci.edu>)

O receptor HVEM é um receptor da família do TNF que pode ser encontrado em uma grande variedade de tecidos e tipos celulares, incluindo células T e B, células epiteliais e fibroblastos. Porém, ainda não foi constatada sua presença em neurônios (Montgomery *et al.*, 1996). Além da glicoproteína viral gD, outras moléculas também podem interagir com o HVEM através de sítios específicos de ligação, como por exemplo os ligantes endógenos como o LIGHT e a Linfotoxina- α (LT- α), não sendo possível a ligação de todas estas moléculas ao mesmo tempo (Whitbek *et al.*, 1997; Mauri *et al.*, 1998; Sarrias *et al.*, 2000; Benedict *et al.*, 2001; Benedict *et al.*, 2003; Ware, 2003).

Os receptores Nectina -1 e Nectina -2 são as únicas isoformas dos receptores da Nectina capazes de permitir a entrada do HSV-1, apresentando uma grande importância sobretudo no que diz respeito à dispersão célula-célula deste vírus (Yoon & Spear, 2002; Marozin *et al.*, 2004). Estes receptores podem ser encontrados em células epiteliais, fibroblastos e neurônios, co-localizando com caderinas em junções aderentes, participando dos processos de adesão celular (Spear, 2004).

Já as moléculas de heparan sulfato são glicosaminoglicanas, sintetizadas pela adição de unidades repetidas de *N*-acetil-glicosamina e ácido glicurônico seguido pela sulfatação por ação enzimática (Lindahl *et al.*, 1998).

Após o processo de adsorção ocorre a exposição de resíduos hidrofóbicos de diversas glicoproteínas virais, como gD e gH/gL, resultando na fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula hospedeira. Em seguida, as proteínas do tegumento, juntamente com o nucleocapsídeo, são liberadas no

citoplasma da célula hospedeira. O nucleocapsídeo será, então, transportado via citoesqueleto para a área perinuclear, onde o capsídeo é desmontado, ocorrendo a liberação do genoma viral no núcleo da célula hospedeira (Esquema 4) (Roizman & Sears, 1996).

1.1.3.2 – Latência e ciclo lítico (produtivo)

Após a sua entrada na célula hospedeira, o HSV-1 pode estabelecer a latência ou o ciclo lítico. Apesar dos fatores que possam estar influenciando a latência ou o ciclo produtivo ainda não serem bem estabelecidos, pesquisas indicam que a presença de Fator de Crescimento do Nervo (NGF) pode induzir a latência em gânglios da raiz dorsal pela indução da transcrição do gene viral LAT (*Latency-Associated-Transcript*) (Preston, 2000; Mitchell *et al.*, 2003).

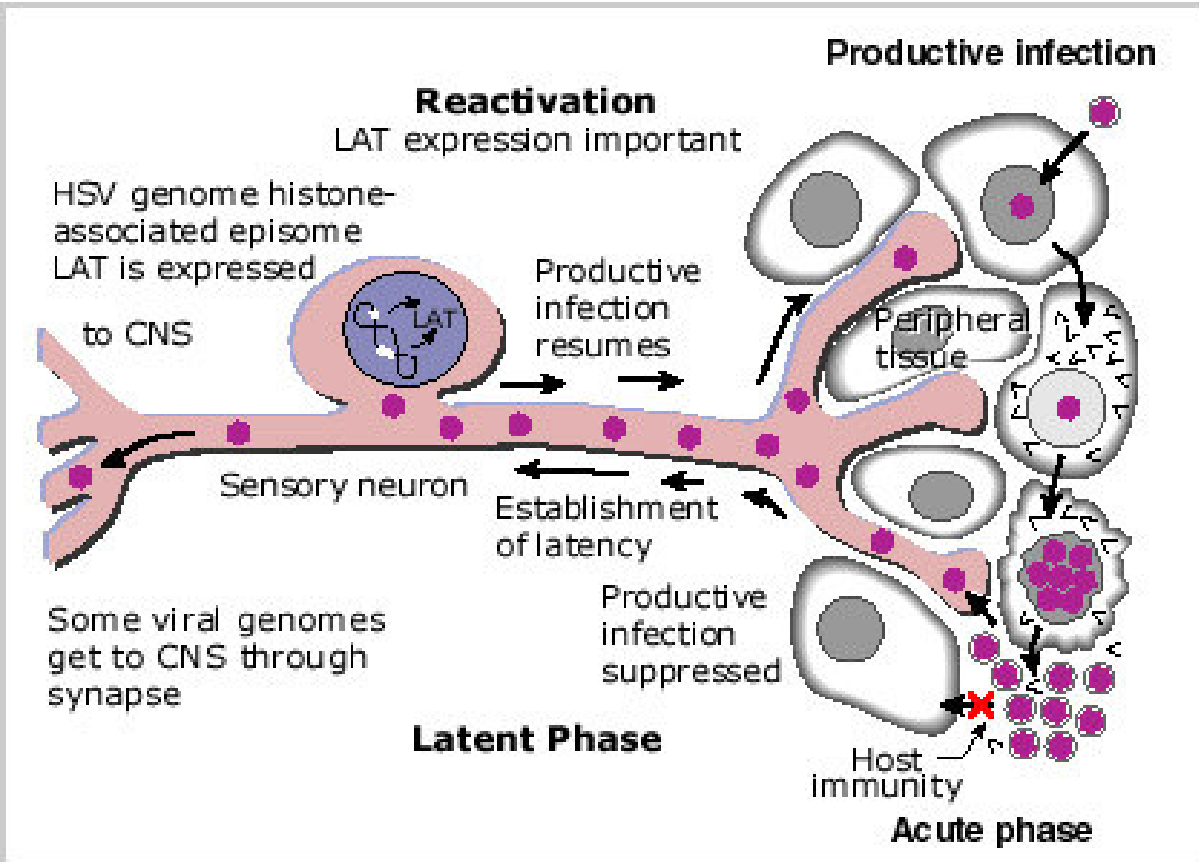
Durante o período de latência o HSV-1 associa-se a histonas, formando um DNA episomal. Além disso, a latência ocorre principalmente no sistema nervoso onde há uma maior expressão do fator nuclear OCT-2 em relação a isoforma OCT-1, que é expressa principalmente em outros tecidos. Na maioria dos tecidos a proteína do tegumento viral α -TIF interage preferencialmente com a proteína OCT-1. Esta ligação é estabilizada pelo fator HCF proporcionando a formação do complexo de pré-iniciação junto ao TATA Box do genoma do HSV-1, iniciando a transcrição de genes de fase alfa e conseqüente infecção produtiva (Preston, 2000).

Algumas situações como estresse, hipertermia, aumento das concentrações citosólicas de AMPc, transplante de órgãos e imunossupressão, o HSV-1 pode ser reativado (Kuo *et al.*, 1987) (Esquema 5). Durante a reativação, as partículas virais são transportadas via transporte anterógrado ao longo dos neurônios sensoriais periféricos, causando a infecção produtiva, podendo provocar lesões no tecido mucocutâneo. Em alguns casos, como em pacientes imunocomprometidos e neonatos, as partículas virais podem migrar em direção ao sistema nervoso central, podendo provocar quadros de encefalite e ceratoconjuntivite (Corey & Spear, 1986; Roizman & Sears, 1996; Brady *et al.*, 2004). Além disso, o HSV-1 parece ser um fator importante para disseminação do HIV-1, podendo causar uma série de enfermidades associadas à AIDS (Mann *et al.*, 1984; Chen *et al.*, 1998).

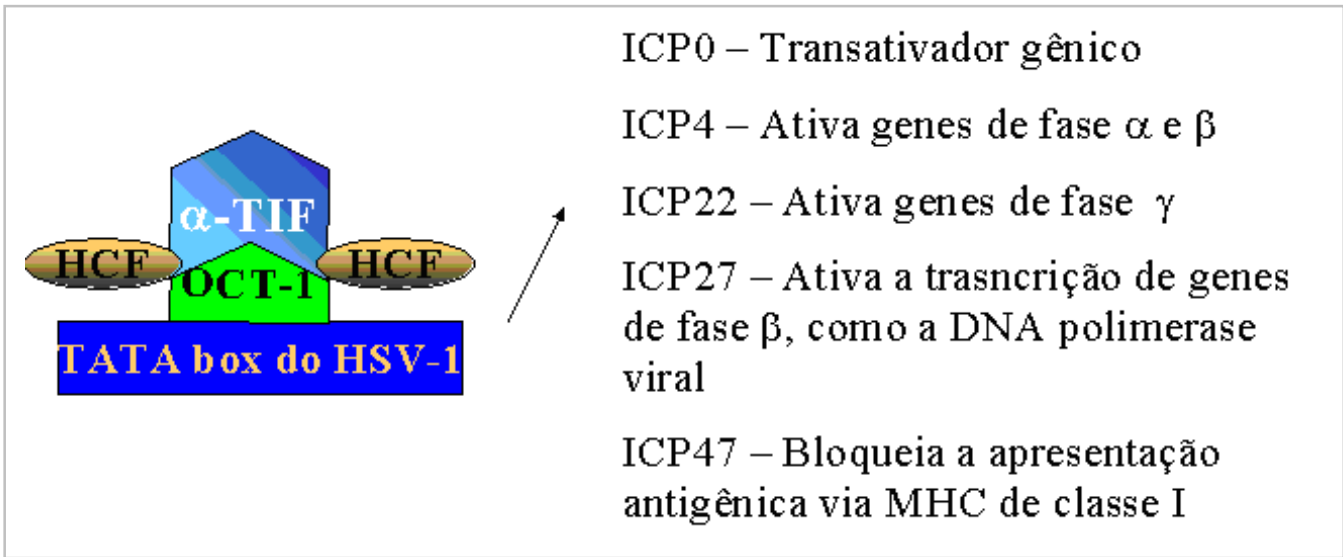
O ciclo produtivo do HSV-1 pode ser cineticamente dividido em três fases (Esquemas 6, 7 e 8). A primeira delas é denominada fase alfa (Immediately-early), que tem início no momento em que a proteína do tegumento viral α -TIF, associada aos fatores nucleares OCT-1 e HCF, se liga ao TATA Box no genoma viral, formando o complexo de pré-iniciação viral. Inicia-se, então, a síntese de proteínas de fase alfa, como ICP4, ICP27 e ICP47, responsáveis pela regulação positiva das fases beta e gama, além de inibir a ação das proteínas TAP inibindo a apresentação de antígenos virais pelo MHC de classe I. Após a fase alfa inicia-se a fase beta (Early), na qual são sintetizadas enzimas análogas às celulares e que possibilitam a replicação do DNA, como a timidina cinase (TK) e UL30/UL42 (DNA polimerase viral). A última fase é denominada fase gama (Late), na qual são

produzidas as proteínas estruturais do vírion, ocorrendo a montagem da partícula viral (Roizman & Sears, 1996; Whitley, 1996; Boehmer & Lehman, 1997).

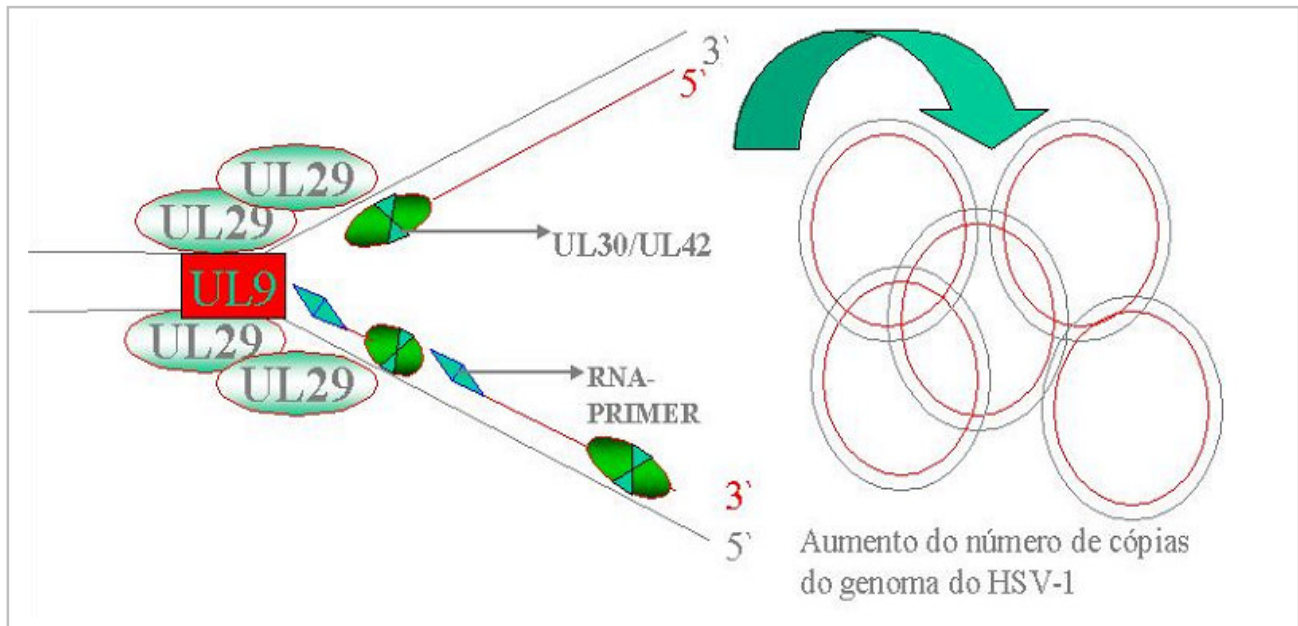
Após a montagem das partículas virais no núcleo da célula hospedeira, o nucleocapsídeo viral é envelopado, através da fusão com a membrana nuclear interna, havendo o aumento de vírus envelopados no espaço perinuclear. Para que as partículas virais possam ser liberadas do núcleo da célula hospedeira ocorre a fusão do envelope viral com a membrana nuclear externa, havendo uma acumulação de capsídeos sem envelope no citoplasma. Os capsídeos são então re-envelopados por vesículas derivadas do complexo de Golgi. Esta última etapa pode estar sendo mediada por interações entre proteínas do tegumento viral e porções citoplasmáticas de glicoproteínas virais, que já estariam inseridas nas vesículas derivadas do Golgi (Melancon *et al.*, 2004) (Esquema 9).



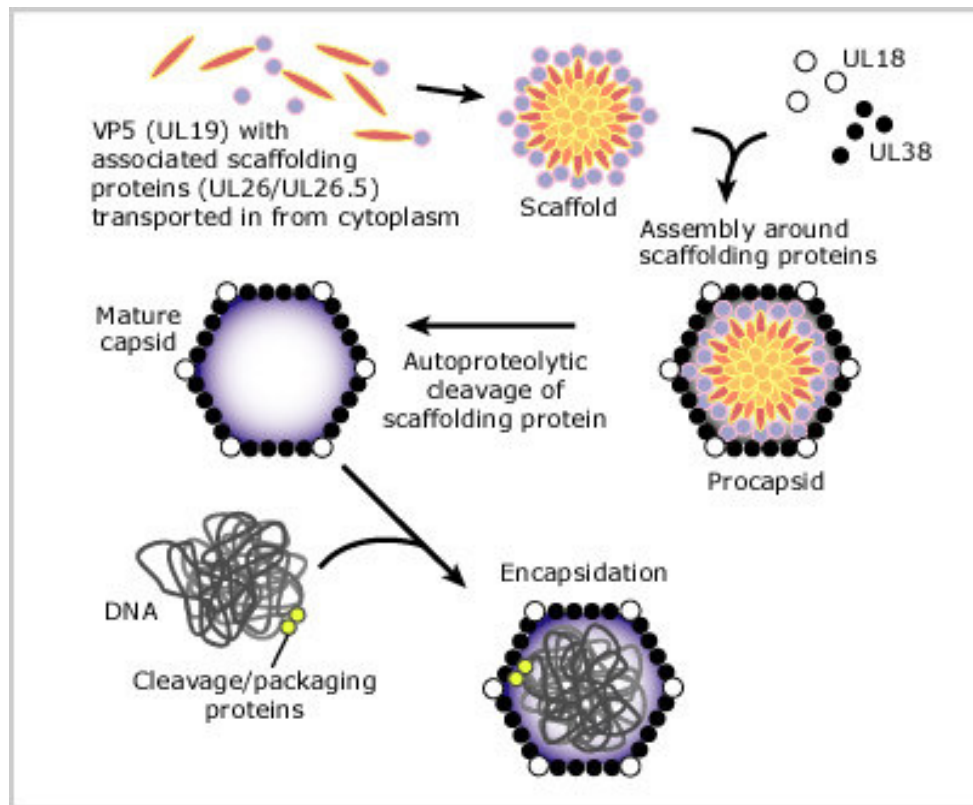
Esquema 5 - Latência e Reativação do HSV-1 (<http://darwin.bio.uci.edu>)



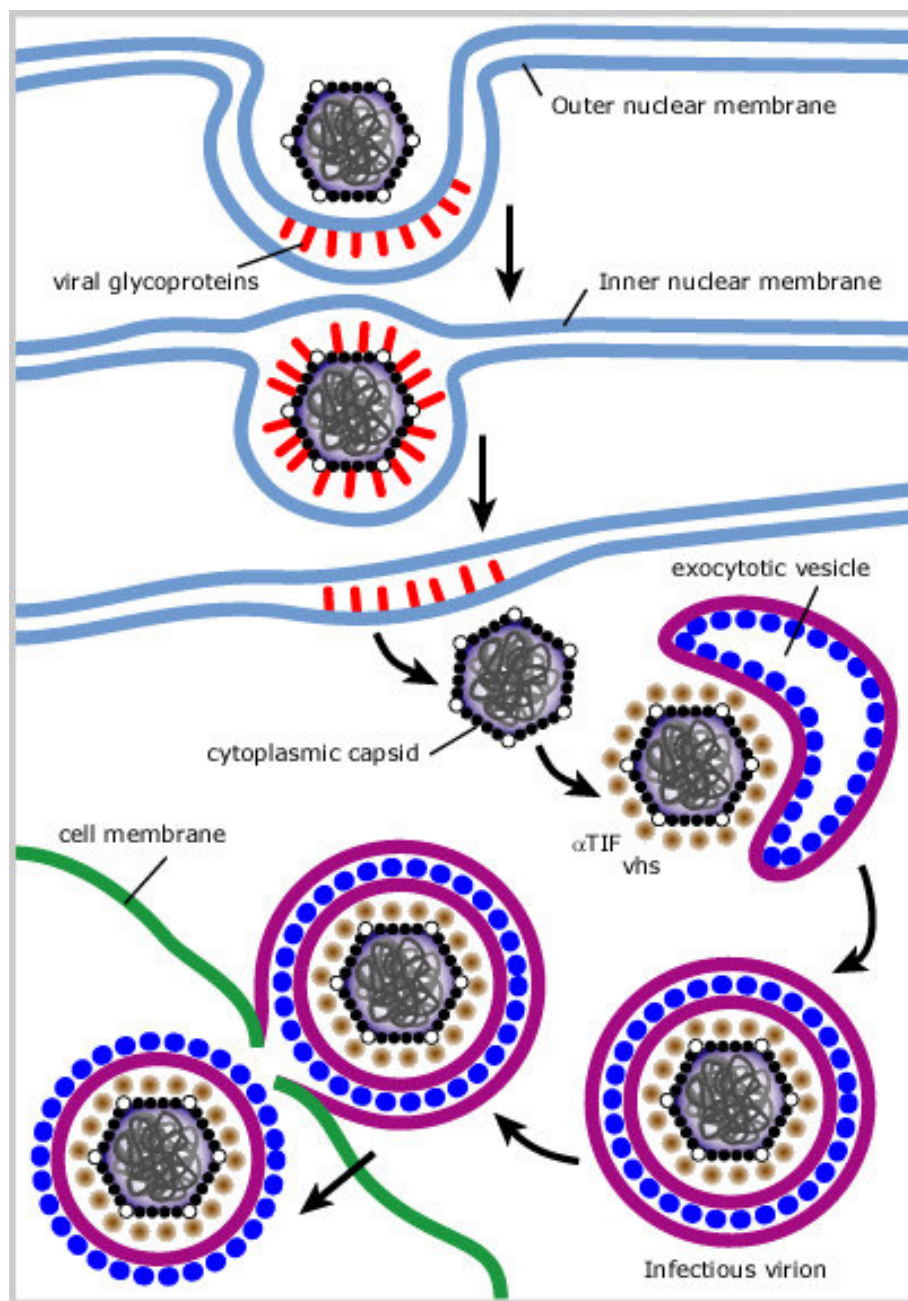
Esquema 6 – Início da replicação viral, fase α (Baseado em Roizman & Sears, 1996)



Esquema 7 – Segunda fase da replicação do HSV-1, fase β . (UL-29 – proteína ligadora de fita simples; UL-9 – Helicase; UL-30/UL-42 – DNA polimerase viral) (Baseado em Roizman & Sears, 1996)



Esquema 8 – Terceira fase da replicação do HSV-1, fase γ (<http://darwin.bio.uci.edu>)



Esquema 9 – Liberação das partículas virais da célula hospedeira (<http://darwin.bio.uci.edu>)

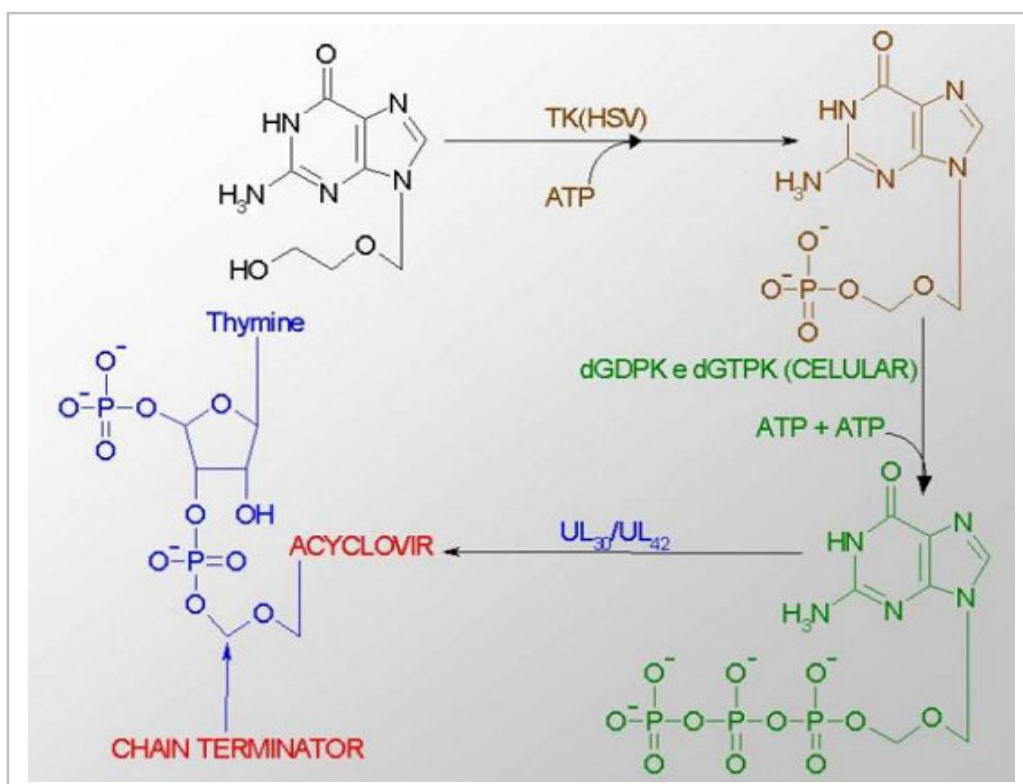
1.2 – Drogas utilizadas no tratamento de pacientes infectados com HSV-1

Dentre as drogas mais utilizadas no tratamento de pacientes infectados com o HSV-1 destacam-se o Aciclovir (ACV), Ganciclovir, Cidofovir e Foscarnet. O ACV é uma guanina com grupamento ribosil incompleto, isto é, não apresenta os carbonos 2' e 3' e suas respectivas hidroxilas. Tal composto é primeiramente fosforilado pela timidina cinase viral e di e trifosforilado por enzimas celulares. Finalmente, a molécula é captada pela DNA polimerase viral (complexo UL30/UL42), resultando na terminação de cadeia da fita de DNA, pela ausência do 3'-OH (De Clercq, 2004) (Esquema 10). O ACV é considerado uma droga segura para o tratamento de pacientes com lesões herpéticas devido à sua baixa citotoxicidade. No entanto, vem sendo observado o aumento do número de cepas de HSV-1 resistentes a esta droga, principalmente isoladas de pacientes imunocomprometidos, além desta droga poder causar neurotoxicidade (Coen, 1996; Ernst & Franey, 1998; Stranska *et al.*, 2005). Além disso, a administração sistêmica de ACV vem sendo correlacionada com a formação de cristais e conseqüente falha no funcionamento renal (Lyon *et al.*, 2002).

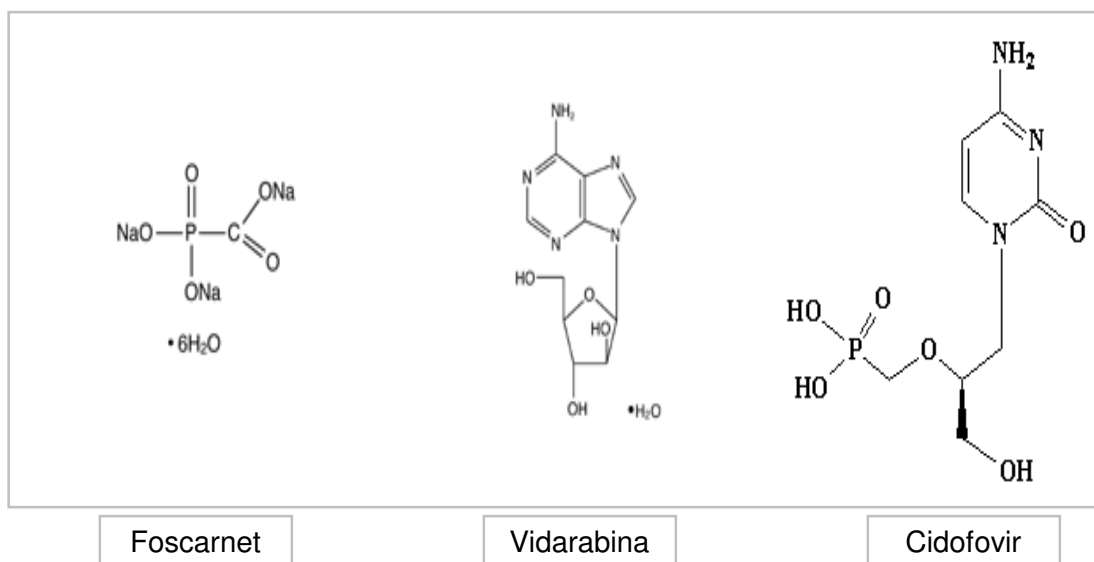
Uma outra molécula utilizada no tratamento de pacientes infectados pelo HSV-1 é o Ganciclovir, que também atua como inibidor da DNA polimerase viral (De Clercq, 2004). Porém, além de poder causar neurotoxicidade, assim como a ACV, está associado com a supressão da atividade de medula óssea (Liu *et al.*, 2004) e, em alguns casos, com carcinogênese (Wutzler & Thust, 2001). Drogas como o foscarnet, têm sido empregadas no tratamento de pacientes infectados com cepas resistentes ao ACV (Esquema 11). Porém, a sua utilização pode

ocasionar em falhas no funcionamento renal devido a sua cristalização após administração intravenosa (Zanetta *et al.*, 1999), além de poder ocorrer a seleção de enzimas DNA polimerase mutantes (Hwang *et al.*, 1992).

Pelo fato das drogas que são utilizadas no tratamento de pacientes infectados pelo HSV-1 causarem vários efeitos colaterais, o número de trabalhos voltados em demonstrar a atividade anti-HSV-1 de análogos não nucleosídicos vem crescendo muito em vários países. Várias moléculas derivadas de produtos naturais vêm sendo extraídas e modificadas com o objetivo de obtermos mais moléculas bioativas e menos tóxicas. Além disso, moléculas isoladas de organismos marinhos, como algas e esponjas, vêm ganhando um grande espaço na pesquisa em antivirais.



Esquema 10 – Mecanismo de ação do Aciclovir (ACV) (Hardman, *et al.*,2001)



Esquema 11 – Outras moléculas utilizadas como anti-HSV-1 (<http://www.google.com.br>)

1.3 – Produtos Naturais

Os produtos naturais, tanto compostos purificados quanto extratos, podem ser considerados uma grande fonte de novas moléculas com efeitos farmacológicos devido a sua grande diversidade química (Cos *et al.*, 2006). Estes produtos já foram explorados pelo homem com diversos propósitos, incluindo seu uso em alimentos, fragrâncias, pigmentos, inseticidas e fármacos, que muitas vezes são descobertos através da medicina popular.

Existem diversos trabalhos na literatura demonstrando a atividade anti-herpética de plantas e ervas medicinais (Khan *et al.*, 2005). Como por exemplo, pode-se citar os óleos essenciais isolados da planta *Santolina insularis*, capazes de inibir a dispersão do HSV célula-célula (De logu *et al.*, 2000), os compostos isolados de ervas como a *Psychotria serpens* e *Limonium sinense* (Kuo *et al.*, 2001; Kuo *et al.*, 2002), capazes de inibir o HSV em várias etapas de sua replicação, extratos isolados de plantas da Tailândia, que apresentaram efeito seletivo sobre o HSV-1 (Lipipun *et al.*, 2003) e substâncias isoladas da erva chinesa *Polygonatum cyrtoneura*, as quais apresentaram atividade anti-HSV-2 em cultura de células (Liu *et al.*, 2004).

Os oceanos também apresentam uma grande diversidade de produtos naturais, que podem ser derivados de diversos organismos como esponjas, moluscos, bactérias marinhas, cianobactérias e algas multicelulares, os quais podem apresentar substâncias com efeitos farmacológicos contra doenças causadas por fungos, parasitas, bactérias e vírus, além de alguns deles também apresentarem efeito anticâncer (Donia *et al.*, 2003). Os primeiros registros da

utilização de produtos isolados de organismos marinhos datam de 1600 a.C., quando os Fenícios utilizavam a secreção de moluscos para produzir um corante de roupas denominado "Púrpura de Tyrian" (Faulkner, 1992).

Dentre os organismos marinhos, as esponjas e as algas, além de fornecerem o maior número de produtos naturais marinhos conhecidos, deram origem a cerca de 65% das patentes existentes em antitumorais e antivirais (Bongiorni & Pietra, 1996). Além disso, dados da literatura descrevem compostos isolados de oalgas que possuem atividade antiviral para herpesvírus (HSV-1, HSV-2 e HCMV), togavírus (Sindbis e Semliki), paramixovírus (RSV), rabdovírus (VSV) e retrovírus (SIV e HIV) (De Clercq, 2000).

Nosso grupo já demonstrou a atividade anti-HSV-1 de alcalóides isolados da esponja *Aaptos aaptos* (Coutinho *et al.*, 2002), como também de diterpenos isolados da alga parda *Dictyota paffii* (Barbosa *et al.*, 2004) e, além disso, a inibição da enzima transcriptase reversa (TR) do vírus HIV pelo diterpeno DA-1, isolado da alga parda *Dictyota menstrualis* (Pereira *et al.*, 2004).

Desde 1.500 A.C. as algas marinhas já eram utilizadas como fonte de fármacos para o tratamento de gota, fístulas e de algumas formas de câncer. Entretanto, somente a partir de 1970 é que vários grupos de pesquisadores iniciaram a triagem sistemática de extratos de algas com intuito de encontrar produtos com atividade biológica. Como resultado, foram encontradas substâncias com atividade antiviral, antifúngica, antibacteriana e anticâncer, mostrando que as algas são uma fonte muito rica de produtos potencialmente utilizáveis como fármacos (Bongiorni & Pietra 1996).

As algas podem ser unicelulares e procariontes, como as algas azuis ou cianobactérias, unicelulares e eucariontes como as euglenófitas, dinoflagelados e diatomáceas ou pluricelulares e eucariontes como as algas verdes (Chlorophytas), pardas (Phaeophytas) e vermelhas (Rhodophytas) (Vidotti & Rollemberg, 2004).

As algas pardas e vermelhas caracterizam-se pela produção de hidrocarbonetos voláteis, polifenóis e terpenos. Os hidrocarbonetos podem atuar como feromônios sexuais e os polifenóis como mecanismo de defesa contra herbivoría. Os terpenos também podem atuar contra herbivoría. Além disso, essas substâncias parecem reforçar a proteção das algas contra bactérias, fungos ou organismos incrustantes como esporos de algas e larvas de invertebrados, podendo assim, aumentar as vantagens das algas na competição interespecífica por espaço (Teixeira *et al.*, 2001).

Algumas espécies de algas pardas e vermelhas participam de maneira bastante abrangente na vida cotidiana do homem, através dos colóides extraídos dos seus talos. Existem alguns produtos de importância econômica, como os ácidos algínicos (alginatos), as agaranas e as carragenanas, os quais são usados como matéria prima em vários segmentos da indústria alimentícia, farmacêutica, cosméticos, têxtil, bebidas, etc., como também na biotecnologia (Vidotti & Rollemberg, 2004).

A primeira evidência de que as algas marinhas possuem propriedades antivirais foi demonstrada por Gerber e colaboradores em 1958, que observaram que polissacarídeos extraídos de *Gelidium cartilagenium* protegiam embriões de galinha contra a infecção por vírus influenza B e vírus da caxumba. Posteriormente, o efeito inibidor de vários produtos isolados de várias espécies de

algas para diferentes vírus foi demonstrado (Carlucci *et al.*, 1997; Duarte *et al.*, 2001).

Desde estas descobertas, a pesquisa da atividade antiviral de polissacarídeos sulfatados obtidos de algas marinhas tem sido explorada, observando-se sua ação inibitória na replicação de herpes vírus (Carlucci *et al.*, 1999; Duarte *et al.*, 2001; Carlucci *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2004; Talarico *et al.*, 2004; Faria-Tischer *et al.*, 2006), vírus da imunodeficiência humana (Lee *et al.*, 1999), vírus linfotrófico de células T humanas tipo 1 (Romanos *et al.*, 2002), vírus respiratórios (Hasui *et al.*, 1995) e vírus da dengue (Talarico *et al.*, 2005).

Organismos marinhos são grandes produtores de metabólitos secundários derivados de unidades isoprênicas, incluindo os monoterpenos (C10), os sesquiterpenos (C15), os diterpenos (C20), os triterpenos (C30) e os tetraterpenos (C40). Dentre esses organismos, as algas marinhas estão entre os principais produtores destas substâncias (Blunt *et al.*, 2006). Dos 15.000 metabólitos secundários de origem marinha, descobertos até o ano passado, aproximadamente 55% são derivados terpenoídicos. Esta proporção pode ser muito superior em alguns filos, representando até 90% dos metabólitos isolados (Harper *et al.*, 2001).

Esqueletos terpenoídicos são produzidos por representantes de todas as divisões de macroalgas marinhas, dentre eles, derivados halogenados e terpenos de origem biossintética mista (meroterpenóides), como os metabólitos isolados de algas vermelhas do gênero *Laurencia* (Ceramiales, Rhodomelaceae) e de algas pardas do gênero *Styppodium* (Dictyotaceae) (Soares, 2003; Kladi *et al.*, 2006).

A extensa área costeira do Brasil e diversidade de espécies encontradas nesta região, principalmente de algas multicelulares, constituem fontes de grande potencialidade para a descoberta de novos fármacos, com potencial aplicação em diversos tipos de patologia. Neste trabalho foram utilizados diterpenos, isolados das algas marinhas *Dictyota menstrualis* e *Dictyota pfaffii* e meroditerpenos, isolados da alga *Styopodium zonale*. Todas essas algas são encontradas no litoral brasileiro e pertencem à classe Phaeophyceae.

2 – OBJETIVOS

Sendo o HSV-1 um patógeno de grande interesse clínico, existem diversas drogas utilizadas no tratamento de pacientes infectados com este vírus. Porém, o fato destas drogas poderem causar efeitos colaterais e também devido ao aparecimento de cepas de HSV-1 resistentes a compostos de referência, como o ACV, torna a busca de novas moléculas com atividade anti-HSV-1 de suma importância. Com isso, nossos objetivos neste trabalho foram:

- I. Avaliar o potencial anti-HSV-1 de produtos naturais isolados de algas pardas marinhas.
- II. Determinar a citotoxicidade destas substâncias;
- III. Determinar o índice de seletividade *in vitro*;
- IV. Determinar o possível alvo de ação destas substâncias frente à replicação do HSV-1.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Linhagens Celulares e Drogas

Células de rim de macaco verde africano (Vero) foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) contendo 5% de soro fetal bovino (SFB), 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina e 2,5µg/mL de anfotericina B. As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Durante a passagem, as células foram tratadas com PBS1/EDTA (Reagen) e tripsina 0,25% (GIBCO).

Todas as substâncias testadas neste trabalho foram isoladas no Departamento de Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense, diluídas em Dimetilsulfóxido (DMSO) 100% e estocadas nas concentrações de 50mM ou a 2mg/mL a -20°C. Durante os testes, as substâncias foram diluídas em DMEM com soro.

3.2 - Preparação do Vírus

As partículas virais (cepa AR-29, cedida gentilmente pela professora Márcia Wigg da Universidade Federal do Rio de Janeiro) foram diluídas em meio DMEM sem soro e multiplicadas em células Vero, utilizando-se uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1 (Lagrota *et al.*, 1994; Esquenazi *et al.*, 2002). Após 24h p.i., as células foram lisadas por ciclos de congelamento e descongelamento. O

conteúdo foi centrifugado a 400x g por 20min a 4°C e o título viral foi dosado pelo método de ensaio de placa (Kuo *et al.*, 2001).

3.3 - Ensaio de Placa

Para determinarmos o título viral, células Vero mantidas em placas de 6 poços (3×10^5 células/poço) foram infectadas com diferentes diluições de HSV-1 por 1h a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Após este período, o inóculo viral foi retirado e as monocamadas cobertas com DMEM com 5% de soro fetal bovino e 1% de Metilcelulose (Fluka) (meio para ensaio de placa). Após 72h as monocamadas de células foram fixadas com 10% de formaldeído e coradas com 0,1% de cristal violeta. Em seguida as placas virais foram contadas e o título viral foi determinado de acordo com o número de placas virais (PFU/mL).

3.4 - Inibição do Efeito Citopático

A avaliação da inibição do efeito citopático viral pelas substâncias foi realizada em células Vero, mantidas em placas de 96 poços (1×10^4 células/poço) e infectadas com diferentes diluições de HSV-1 durante 1h a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, para que iniciasse o processo de adsorção viral. Após este período, o inóculo viral foi retirado e as células foram tratadas com as substâncias nas concentrações de 50µM ou 2µg/mL. Após 72h, o título viral foi determinado na presença e na ausência das drogas (Read & Muench, 1938).

3.5- Ensaios de Citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada por duas metodologias: No primeiro método, células Vero em placas de 24 poços (4×10^4 células/poço) permaneceram em contato ou não com diferentes concentrações das substâncias por 72h a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Após este período, as células foram tratadas com PBS/EDTA, tripsinizadas e coradas com azul de Trypan a 0,04% em PBS. A viabilidade celular foi determinada de acordo com o seguinte cálculo:

$$VIABILIDADE = \frac{VIÁVEIS}{TOTAIS} \times 100$$

No segundo método, células Vero, mantidas em placas de 96 poços (1×10^4 células/poço), permaneceram em contato ou não com diferentes concentrações das substâncias por 72h a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Após esse período, foi adicionado MTT a 5mg/mL. Após 4h de incubação a 37°C foi adicionado 100µL da solução de 10% de SDS, 0,01N de HCl e após 24h os poços foram analisados em um leitor de Elisa a 540 e 620nm.

3.6- Inibição da produção de partículas virais

Células Vero, mantidas em placas de 24 poços (1×10^5 células/poço), foram infectadas com HSV-1 (cepa AR29) utilizando-se um MOI de 1 ou 5 por 1h a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Após esse período as células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos em DMEM contendo 5% de SFB. As células foram lisadas por 3 ciclos de congelamento e descongelamento 20hp.i.. O sobrenadante foi titulado pelo ensaio de inibição do efeito citopático.

3.7- Infecção Curso -Temporal

Para determinarmos a etapa da replicação viral na qual as substâncias poderiam estar agindo, células Vero, mantidas em placas de 6 poços (3×10^5 células/poço), foram separadas em 5 grupos (Gong *et al.*, 2002):

Adsorção → Células Vero foram tratadas com os compostos a 10µM por 2h a 4°C. Após a lavagem, as células foram infectadas com 100 PFU/mL por 1h a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, para permitir a penetração viral. Após esse período, o inóculo viral foi retirado e a monocamada coberta com DMEM com 5% de SFB e 1% de Metilcelulose (meio para ensaio de placa). Após 72h o número de placas virais foi contado.

Penetração → Células Vero foram infectadas com 100 PFU/mL a 4°C por 1h para permitir o processo de adsorção viral. Após esse período, as células foram lavadas com solução de glicina em PBS pH 2.2, para remover as partículas virais que não adsorveram nas células. Após esse processo, as células foram tratadas com as substâncias a 10µM e a temperatura elevada para 37°C por 1h para permitir a penetração viral. Após esse período a monocamada foi coberta com meio para ensaio de placa. Após 72h, o número de placas virais foi contado.

0-3hp.i. → Células Vero foram infectadas com 100 PFU/mL de HSV-1 por 1h a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Após esse período (tempo 0), o inóculo viral foi retirado e as células tratadas com as substâncias a 10µM de 0 a 3hp.i.. Foi adicionado o meio para ensaio de placa e após 72h, o número de placas virais foi contado.

3-6hp.i. → Células Vero foram infectadas com 100 PFU/mL de HSV-1 por 1h a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Após esse período (tempo 0), o inóculo viral foi retirado e as monocamadas cobertas com meio DMEM com soro. No tempo 3hp.i. as células foram tratadas com as substâncias a 10µM, que permaneceram em contato com as células até 6 h p.i.. Foi adicionado o meio para ensaio de placa e após 72h, o número de placas virais foi contado.

6-20hp.i. → Células Vero foram infectadas com 100 PFU/mL de HSV-1 por 1h a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Após esse período (tempo 0), o inóculo

viral foi retirado e as monocamadas cobertas com meio DMEM com soro. No tempo 6hp.i. as células foram tratadas com as substâncias a 10 μ M, que permaneceram em contato com as células até 20 h p.i.. Foi adicionado o meio para ensaio de placa e após 72h, o número de placas virais foi contado.

3.8– Ensaio de Inibição da Adsorção Viral

Para analisarmos se os compostos DA-1 e Dol 2 poderiam influenciar a adsorção viral, células Vero, mantidas em placas de 6 poços (3x10⁵ células/poço), foram infectadas com 100 PFU/poço e tratadas com valores de EC₅₀ dos compostos por 1h a 4°C. Após este período, as células foram lavadas com PBS, cobertas com meio para ensaio de placa e a temperatura foi elevada para 37°C, permitindo a entrada das partículas virais. Após 72h as células foram coradas conforme descrito no item 3.3 e as placas virais foram contadas.

3.9 – Efeito das substâncias DA-1 e Dol-2 em células infectadas sobre a Síntese de Proteínas

Células foram mantidas em garrafas de cultura de 25 cm² (2 x 10⁶ células) e infectadas ou não com HSV-1 com MOI de 5 e 20 por 1h a 37°C. Em seguida, o vírus residual foi lavado e as células foram incubadas na presença ou ausência de DA-1 ou Dol-2 na concentração de 10 μ M. Após 4h de infecção foi adicionado [³⁵S]-Metionina (50 μ Ci/mL) e mantido por 2h quando as culturas foram lisadas com

TØ (Tris-HCl (pH 6,8) 1M; azul de bromofenol 0,02%; β -mercaptoetanol 5%; SDS 10%; glicerol 10%).

Para que fosse realizada a medição da radiação por cintilação de fase líquida, as amostras foram tratadas com TCA 10% e filtradas em filtros de fibra de vidro (Whatman) GF/A.

3.10- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida e Auto-radiografia

Para analisarmos o perfil protéico das células, as amostras obtidas, conforme descrito no item anterior, foram dosadas pelo método de Bradford e separadas em gel SDS-PAGE. As amostras de proteínas mantidas em tampão TØ foram aquecidas a 100°C por 1min e submetidas a um gel contendo 10% de poliacrilamida, 0,1% de SDS, posteriormente corado com azul de Coomassie 0,1%. Em seguida, o gel foi desidratado com glicerol 50% e etanol 25% e submetido a uma auto-radiografia em filme X-OMAT (Kodak). Posteriormente, o perfil protéico foi analisado.

3.11 – Ensaio de Inibição da enzima DNA polimerase viral

Para que pudéssemos observar se as substâncias poderiam estar atuando sobre a atividade da enzima DNA polimerase viral foi realizado, primeiramente, o isolamento da enzima de células Vero infectadas com HSV-1. Para tal finalidade, células Vero foram infectadas com MOI de 5 por 12h em atmosfera com 5% de

CO₂. Após esse período foi adicionado um tampão específico (0,25 mM fosfato de potássio (pH 7,2), 10mM de 2-mercaptoetanol, 1mM EDTA, 0,5% Triton-X-100, 20% de glicerol e 0,5 mM de PMSF), as células foram sonicadas 8X por 15 segundos e o conteúdo foi centrifugado a 12.000 rpm (Sorvall RCS. 5B) por 10 min a 4°C.

A reação enzimática foi realizada por 30 min a 37°C em um volume final de 100 µL, contendo 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,5 mM DTT, 8 mM MgCl₂, 100 mM sulfato de amônia, 0,1 mM dNTP, sendo [³H]-dTTP (0,5 µCi/nmol) e 25 µg de DNA de esperma de salmão desnaturado. Os compostos foram testados na concentração de 50µM. Após esse período a reação foi interrompida pela adição de TCA 10%. As amostras foram filtradas em filtros de fibra de vidro GF/C (Whatman) previamente lavados com TCA 10%, e a radioatividade incorporada foi determinada por cintilação de fase líquida (Knopf, 1979).

3.12- Análise Estatística

A análise estatística foi feita utilizando-se os programas Excel para Windows. A significância dos dados foi determinada através do teste t de Student. Utilizamos um intervalo de confiança de 95%; logo, valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Todos os dados foram analisados a partir da média, do desvio padrão ($\bar{x} \pm D.P.$) e de, no mínimo, três experimentos independentes totalizando um n=6 para todos os experimentos.

4- RESULTADOS

4.1- Avaliação da atividade antiviral

Para avaliarmos se os produtos naturais estudados apresentariam potencial antiviral, utilizamos o teste de inibição do efeito citopático viral (Read & Muench, 1938). As substâncias em questão foram isoladas das algas pardas *Dictyota menstrualis*, *Dictyota pfaffii* e *Styopodium zonale*. Nossos resultados mostram que todas as substâncias apresentaram inibições maiores que 80%, comparáveis a do Aciclovir (ACV) na concentração de 10 μ M, que é capaz de inibir 92% do efeito citopático viral (Figuras 1, 2 e 3).

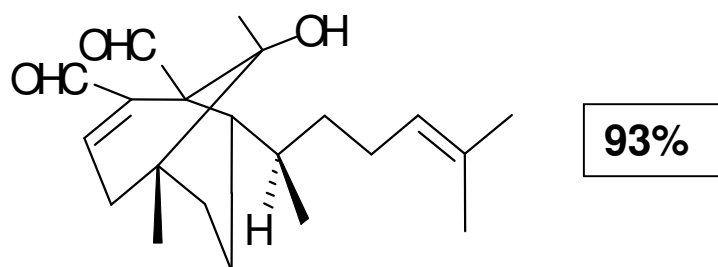


Figura 1 – Estrutura da substância DA-1, isolada da alga parda *Dictyota menstrualis* e a sua porcentagem de inibição do efeito citopático viral, quando testada na concentração de 50 μ M.

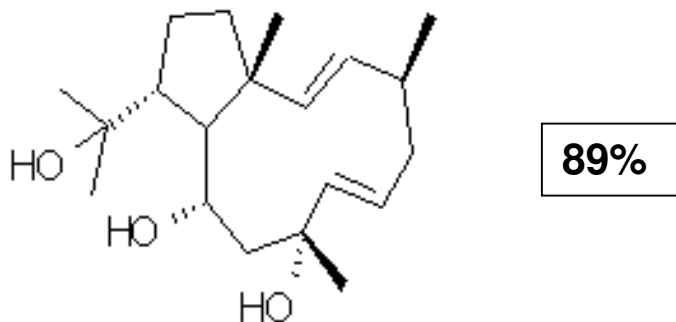
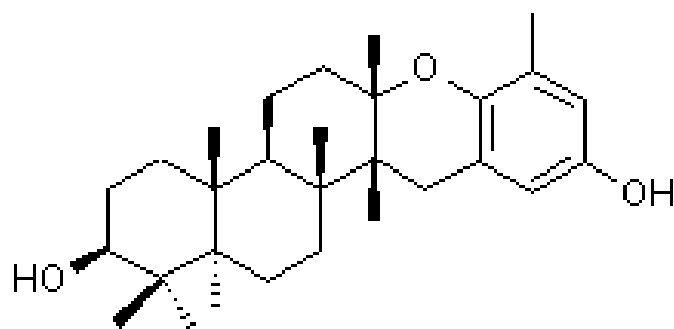
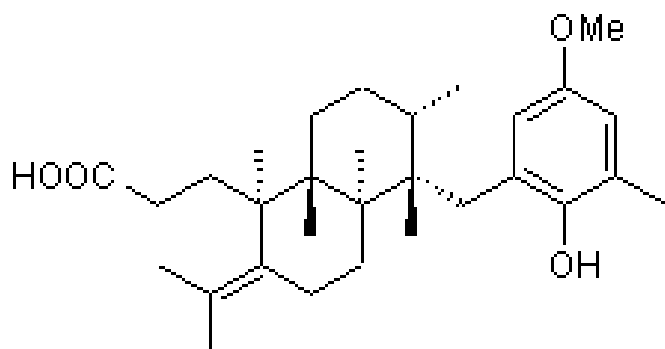


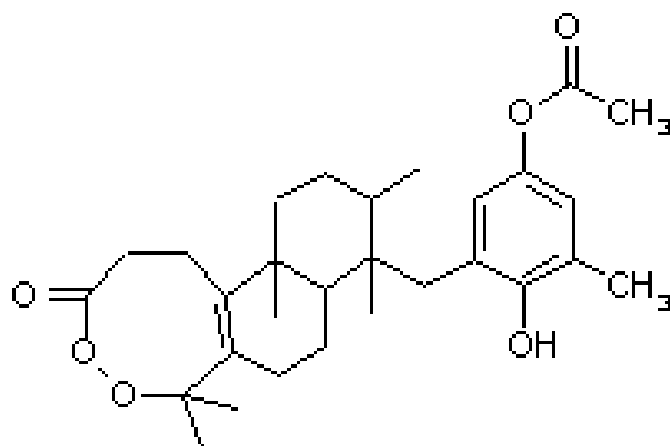
Figura 2 – Estrutura da substância Dolabellano 2 (Dol-2), isolada da alga parda *Dictyota pfaffii* e a sua porcentagem de inibição do efeito citopático viral, quando testada na concentração de 50 μ M.

Angel 1 – Extrato Bruto **96%**



Angel 2 **99%**

Angel 3 **98%**



Peroxilactona **83%**

Figura 3 – Estrutura das substâncias Angel 2, Angel 3 e Peroxilactona, isoladas da alga parda *Styopodium zonale* e as suas respectivas porcentagens de inibição do efeito citopático viral, quando testadas na concentração de 2µg/mL (~4,5µM).

4.2 – Avaliação da citotoxicidade

Visto que os produtos naturais testados apresentaram porcentagens de inibição do efeito citopático viral acima de 80%, tornou-se necessário a avaliação da citotoxicidade dos mesmos. Para isso, buscamos a concentração das substâncias necessária para inibir em 50% a viabilidade de células Vero (CC_{50}), através das metodologias de azul de tripan e MTT. Os resultados mostram que o composto DA-1 foi menos citotóxico do que as outras substâncias testadas. Apesar de apresentarem valores de citotoxicidade menores do que o do ACV, as substâncias isoladas das *Styopodium zonale* e *Dictyota pfaffii* também apresentaram valores satisfatórios, 10 ou 4X maiores do que as concentrações necessárias para inibir o efeito citopático viral, respectivamente (Tabela 2).

4.3 – Os produtos naturais apresentaram valores de inibição comparáveis ao do ACV

Para que pudéssemos determinar as concentrações mais efetivas das substâncias, capazes de inibir a produção de partículas virais, utilizamos a medida de EC_{50} , ou seja, a concentração dos compostos capaz de inibir em 50% a produção de partículas virais. Fizemos esta avaliação tanto em células Vero infectadas com MOI de 1 quanto com MOI de 5 e os valores de EC_{50} foram calculados a partir de uma curva dose-resposta. Podemos observar que os compostos apresentaram valores de EC_{50} comparáveis ao do ACV, com exceção da substância peroxilactona, com EC_{50} um pouco mais elevado, aproximadamente 2X maior do que os demais compostos isolados da alga *S. zonale*, que

apresentaram valores muito aproximados. É importante ressaltar que o valor de EC_{50} para o composto Angel 1 não foi determinado por se tratar de um extrato bruto. Podemos observar também que quando utilizamos 5X mais vírus, na infecção com MOI de 5, foi necessário aproximadamente 5X mais droga para inibir 50% da replicação, mostrando que o EC_{50} foi dependente do MOI utilizado. Além disso, no MOI de 5, as substâncias DA-1 e Dol-2 foram efetivas em concentrações um pouco menores do que o ACV (Tabela 2), sugerindo que, com MOI maiores, os produtos naturais podem ser mais eficazes do que o ACV. Os resultados apresentados na tabela 2 serviram de base para calcularmos as concentrações dos compostos nos experimentos subsequentes.

Com relação ao Índice de Seletividade (SI), que representa o grau de segurança para a utilização da droga *in vitro*, podemos observar que a substância DA-1 apresentou um valor mais aproximado ao do ACV do que os demais compostos e, além disso, como já esperado, os valores de SI no MOI de 1 foram maiores do que aqueles observados no MOI de 5. Observamos também que a substância DA-1 apresentou melhor SI (MOI=5) do que o ACV. Este resultado já era esperado uma vez que a DA-1 apresentou um menor EC_{50} do que o ACV no mesmo MOI (Tabela 2).

Tabela 2 – Citotoxicidade e atividade antiviral dos produtos naturais e ACV.

| Substâncias | CC ₅₀ (µM) | EC ₅₀ (µM) | | SI* | |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|-------|--------|-------|
| | | MOI=1 | MOI=5 | MOI=1 | MOI=5 |
| DA-1 | 1000 | 1,6 | 5,9 | 625 | 169,4 |
| Dol-2 | 189 | 1,2 | 5,1 | 157,5 | 37 |
| Angel 1 ^e | >200 | ND | ND | ND | ND |
| Angel 2 | >452 | 1,28 | ND | >353,1 | ND |
| Angel 3 | >485 | 1,34 | ND | >361,9 | ND |
| Peroxilactona | >413 | 2,38 | ND | >173,5 | ND |
| ACV | 860 | 1,2 | 6,5 | 716,6 | 132,3 |

* – Índice de seletividade calculado a partir da razão entre CC₅₀ e EC₅₀.

ND – Não dosado.

^e – Por se tratar de um extrato bruto, foi testado em µg/mL.

4.4 – As substâncias podem estar atuando em fases iniciais da replicação viral

Além da substância DA-1 ter sido a molécula mais promissora, devido a sua baixa citotoxicidade e boa atividade anti-HSV-1, já havia sido demonstrado pelo nosso grupo o seu efeito anti-HIV-1, assim como o efeito da substância Dol-2 sobre o mesmo vírus (Cirne-Santos *et al.*, 2006). Por estas razões, resolvemos prosseguir com o trabalho estudando o efeito anti-HSV-1 somente destas duas substâncias.

Com base nestas justificativas, fomos avaliar em qual momento do ciclo replicativo do HSV-1 as substâncias DA-1 e Dol-2 poderiam apresentar seu melhor efeito. Para isso, células Vero foram infectadas com HSV-1 e tratadas por diferentes períodos pós-infecção: adsorção, penetração e quando ocorre o pico

das proteínas de fase α (0-3 hp.i.), β (3-6 hp.i.) e γ (6-20 hp.i.) (Roizman & Sears, 1996; Boehmer & Lehman, 1997). Neste estudo foram utilizadas as substâncias DA-1 e Dol-2 na concentração de 10 μ M, já que nesta concentração, estas drogas inibem em 100% a produção de partículas virais.

Podemos observar na Figura 4 que o melhor efeito da substância DA-1 sobre a replicação do HSV-1 ocorreu no período de 0-3h p.i., no qual ocorre o pico de proteínas de fase α , as quais são reponsáveis pela regulação das demais fases do ciclo replicativo do HSV-1 (Roizman & Sears, 1996; Boehmer & Lehman, 1997). Não foi observado nenhum efeito significativo da substância DA-1 sobre as demais etapas da replicação do HSV-1. Por outro lado, no tratamento com a substância Dol-2, podemos notar que houve uma inibição em dois momentos distintos: em 0-3h p.i. e em 3-6h p.i., nos quais ocorrem os picos de proteínas de fase α e β , respectivamente. Isto sugere que esta droga tem como alvo alguma macromolécula sintetizada nestas fases, ou que este composto atue exatamente em 3 hp.i..

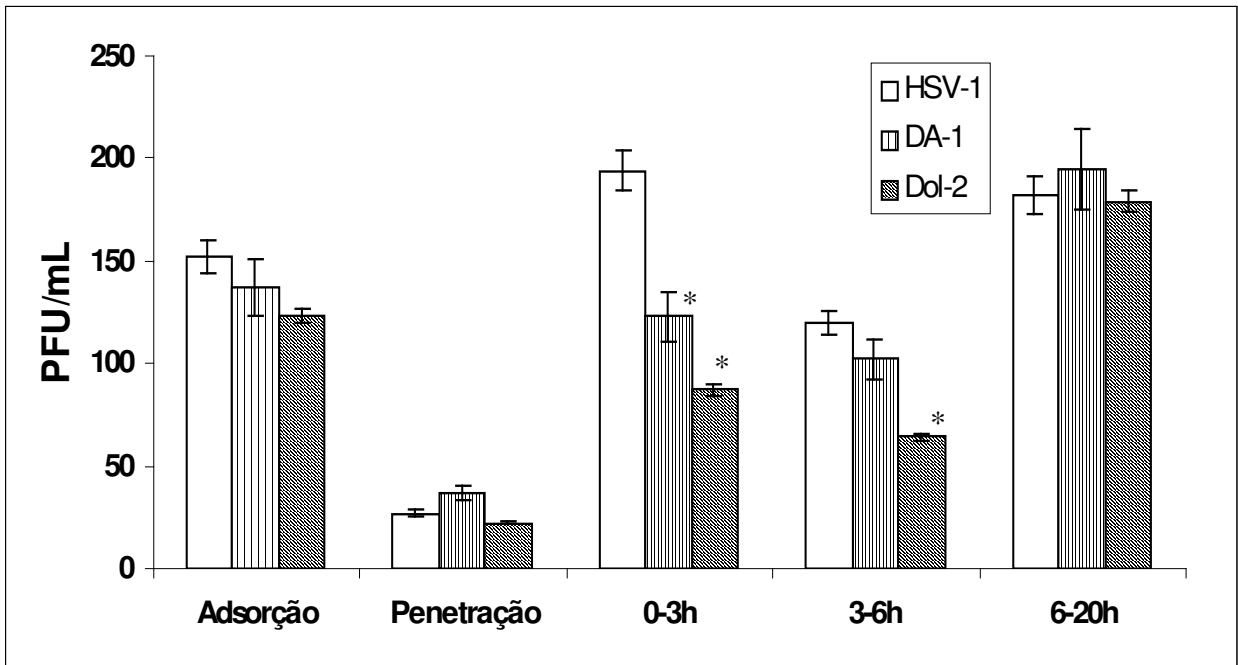


Figura 4 – Período de ação dos diterpenos sobre a replicação do HSV-1. Células Vero foram infectadas e tratadas com as drogas por diferentes períodos, conforme já foi descrito no item 3.7 da seção Material e Métodos. Observamos que os compostos DA-1 e Dol-2 apresentaram melhor efeito de 0-3h, sugerindo uma participação na fase α . Vale lembrar que essa última substância também apresentou uma inibição significativa de 3-6h, sugerindo uma participação na fase β . O asterisco indica um $P < 0,05$.

4.5 – As substâncias não atuam sobre a adsorção viral na célula hospedeira

A partir dos resultados obtidos durante o ensaio curso-temporal observamos que a adsorção não seria uma etapa inibida por nenhuma das drogas. Porém, por esta etapa ser um dos alvos destes compostos sobre a replicação do vírus HIV-1 (Pereira *et al.*, 2004; Cirne-Santos, dados não publicados), fomos avaliar se as substâncias DA-1 e Dol-2 realmente não teriam efeito relevante sobre esta etapa da replicação viral. Para isso, as células foram infectadas e tratadas com valores de EC_{50} dos compostos. Utilizamos como controle positivo a heparina na concentração de $1\mu\text{g/mL}$; esta concentração é necessária para inibir cerca de 80% da adsorção do HSV-1 (Bender *et al.*, 2005). Observamos que esta etapa não é, de fato, o alvo de ação de nenhuma das duas drogas (Figura 5).

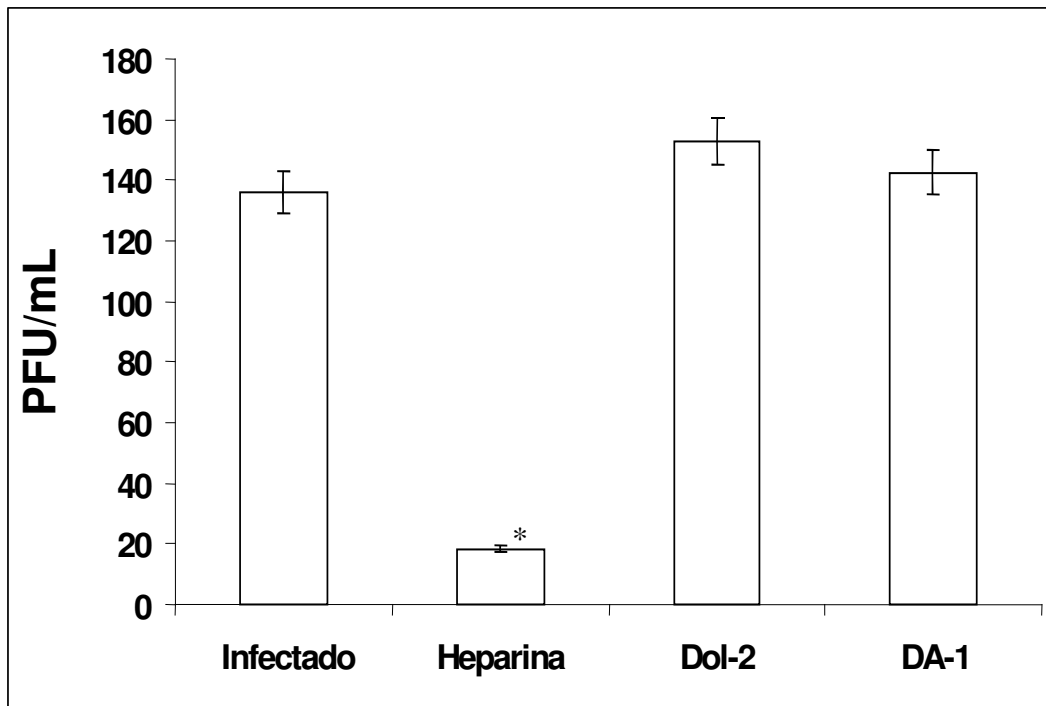


Figura 5 – Os diterpenos testados não inibiram a etapa de adsorção do ciclo replicativo do HSV-1. Células Vero foram infectadas por 1h a 4°C na presença dos compostos Dol-2 ou DA-1 na concentração de 1µM, ou do controle positivo Heparina a 1µg/mL. Em seguida as células foram lavadas (item 3.3) e após 72h, as placas virais foram coradas e contadas. Podemos observar nos resultados que não houve uma mudança dos títulos virais na presença dos compostos testados. O asterisco indica um $P < 0,05$.

4.6- As substâncias revertem a inibição da síntese de proteínas em células Vero infectadas com HSV-1

Desde a década de 70 já se sabe que o vírus Herpes é capaz de provocar uma diminuição da síntese de macromoléculas da célula hospedeira (Fenwick & Walker, 1978). Com base nesta informação e pelo fato de que durante o ensaio curso-temporal obtivemos melhores inibições das drogas em períodos que coincidem com etapas de produção de síntese de proteínas, fomos avaliar se estas substâncias seriam capazes de reverter a inibição da síntese de proteínas de células Vero, infectadas com HSV-1 com MOI de 5 e 20 e tratadas com 10 μ M dos compostos, através de pulso de [³⁵S]-Metionina (50 μ Ci/mL) de 4 a 6hp.i..

As células Vero foram divididas em quatro grupos: controle (C), infectado (I), controle tratado (CT) e infectadas e tratadas (IT). Como já esperado, houve uma inibição da síntese de macromoléculas de células infectadas com HSV-1 (I). Além disso, o tratamento com os compostos (IT) foi capaz de reverter à inibição induzida pelo HSV-1, tanto no MOI de 5 quanto no MOI de 20. Além disso, no tratamento com o composto DA-1 obtivemos um efeito dependente do MOI utilizado, ou seja, a droga só conseguiu reverter a inibição viral em células infectadas com MOI de 5, enquanto que no MOI de 20, o perfil observado foi semelhante ao do controle. Já o efeito do composto Dol 2 se mostrou ser independente do MOI, visto que nos dois MOI utilizados observamos a reversão da inibição causada pelo HSV-1 (Figura 6).

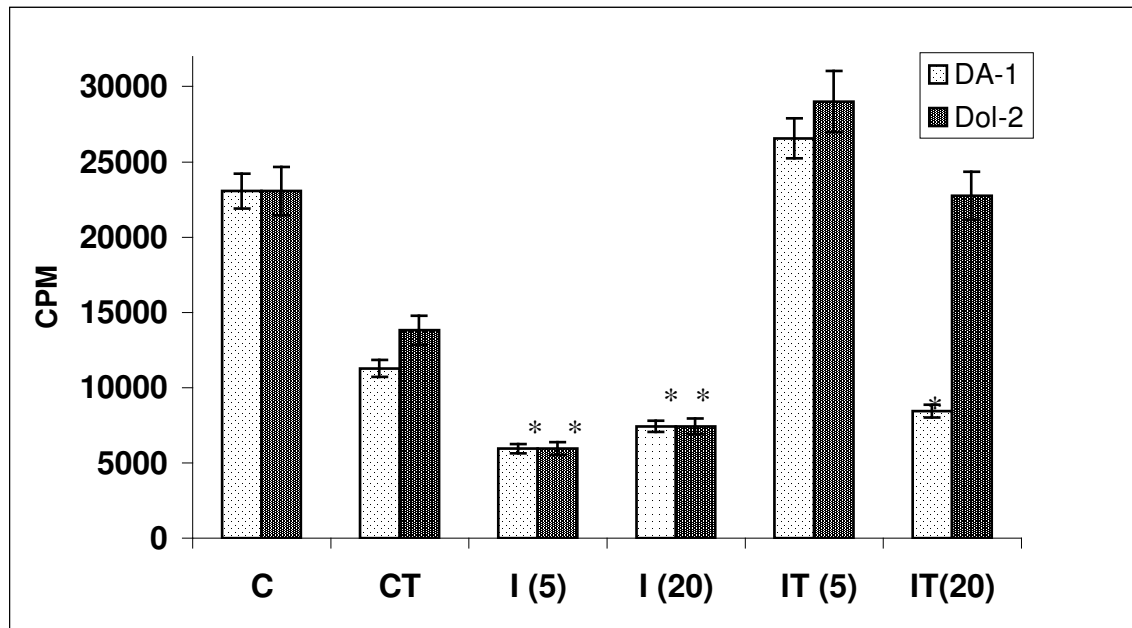
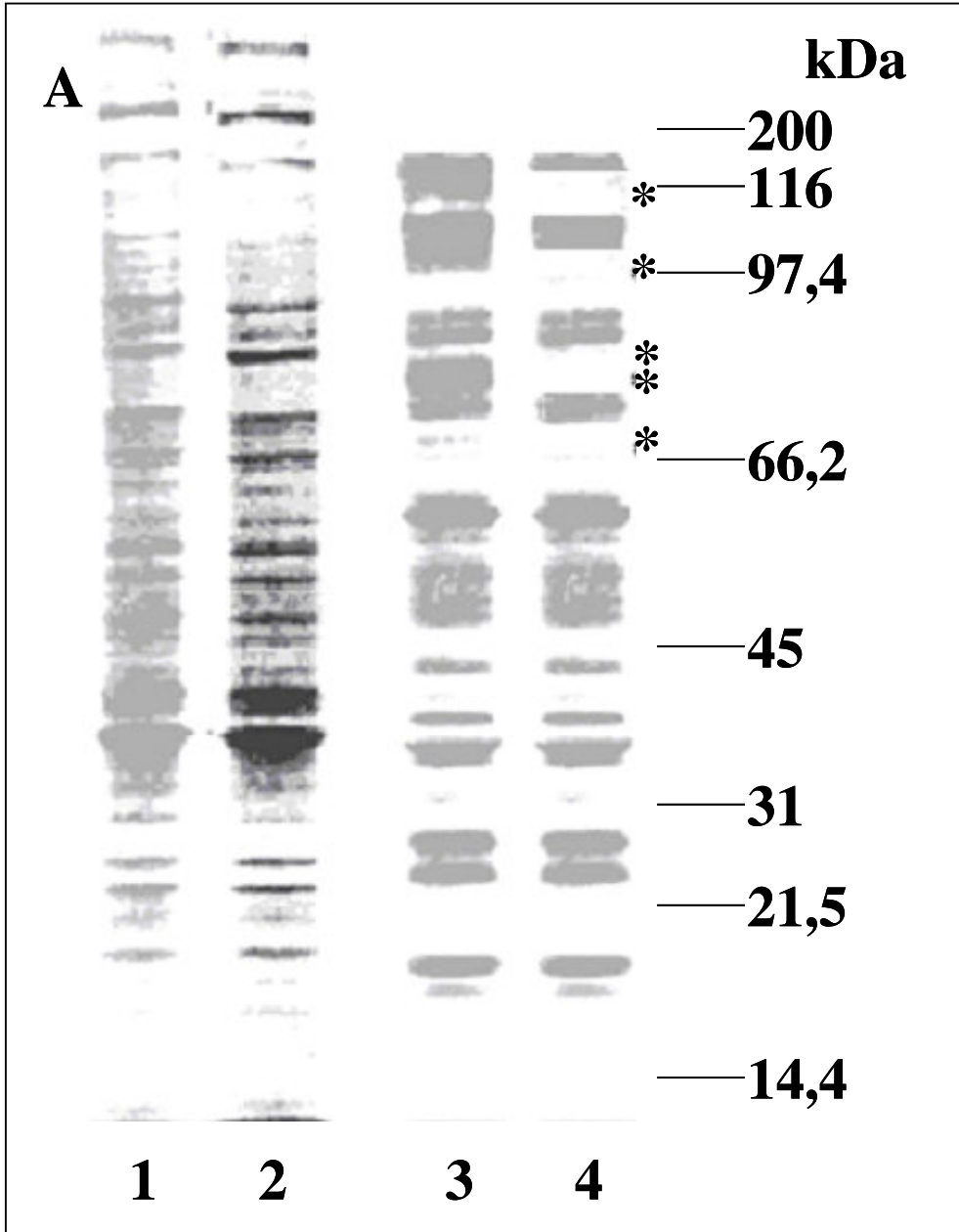


Figura 6 – Os produtos naturais previnem a inibição da síntese de proteínas induzida pelo HSV-1. Células Vero foram infectadas com MOI de 5 ou de 20 e tratadas com 10 μ M de DA-1 ou Dol-2. Posteriormente, a síntese de proteínas foi traçada conforme descrito no item 3.9, utilizando [³⁵S]-Metionina. C – células controle não infectadas, CT – células controle não infectadas e tratadas com os compostos, I (5) – células infectadas com MOI de 5, I(20) – células infectadas com MOI de 20, IT (5) - células infectadas e tratadas com MOI de 5, IT(20) – células Infectadas e tratadas com MOI de 20. Observamos que a substância DA-1 preveniu a inibição da síntese protéica induzida pelo HSV-1 de forma dependente do MOI e a Dol-2 preveniu tal evento independentemente do MOI. O asterisco representa um P < 0,05.

4.7 – A inibição da expressão de proteínas virais

Com o intuito de entendermos se o efeito das drogas foi realmente nas fases sugeridas no ensaio curso-temporal, analisamos o perfil protéico através de gel SDS-PAGE e autoradiografia das amostras obtidas no ensaio com [³⁵S]-Metionina, conforme descrito no item anterior. Observamos que não havia diferença entre o controle (C) e o controle tratado (CT) com relação às proteínas expressas, tanto para a DA-1 quanto para o Dol-2, independente do MOI utilizado. Utilizando-se o MOI de 5, ambas as drogas conseguiram prevenir completamente a infecção, quando comparamos o infectado tratado (IT) com o controle (dados não mostrados). Já no MOI de 20 observamos que ambas as drogas inibiram a expressão de proteínas de fase β . De acordo com os pesos moleculares destas proteínas, as duas drogas dificultaram a expressão das proteínas UL-8, RL-1 e UL-12 (Figura 7 A e B). No entanto, Dol-2 também dificultou a expressão das proteínas DNA polimerase e UL-9 (Figura 7 A). Estes resultados sugerem que estas drogas atuam sobre alguma das primeiras proteínas produzidas na fase β ou sobre alguma proteína de fase α , o que poderia dificultar a expressão de proteínas de fase β , já que as proteínas de fase α são regulatórias.



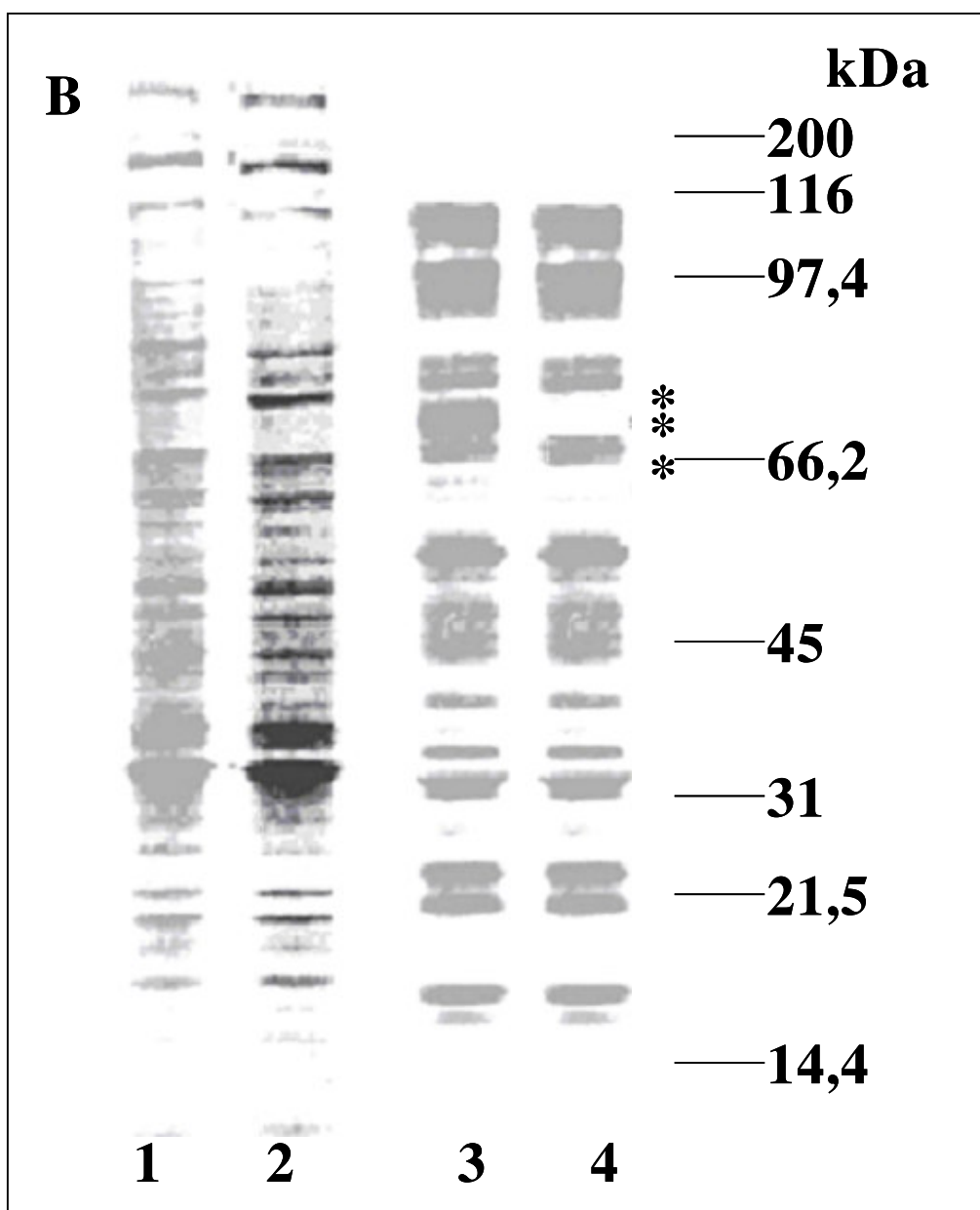


Figura 7 – Efeito dos produtos naturais sobre a síntese protéica. Células Vero foram infectadas com MOI de 20 e tratadas com DA-1 ou Dol-2 na concentração de 10 μ M. A síntese protéica foi marcada com [35 S]-Metionina, as proteínas separadas por gel SDS-PAGE e identificadas por autoradiografia. 1 – Célula controle, 2 – células controle tratadas com os compostos, 3 – células infectadas e 4 – células infectadas e tratadas com os compostos. Em (A) observamos os efeitos do Dol-2 e em (B) os efeitos da DA-1. Observamos uma inibição da expressão de proteínas virais de fase β . Os asteriscos representam as proteínas virais inibidas por ação dos produtos naturais.

4.8 - As substâncias não inibem a atividade da DNA polimerase viral

As enzimas DNA polimerase do HSV-1 e a transcriptase reversa do HIV-1 pertencem à família das polimerases do tipo B, por apresentarem um domínio polimerase e um domínio endonuclease. Uma vez determinado que estas drogas inibem a enzima transcriptase reversa (Barbosa *et al.*, 2004; de Souza *et al.*, 2005;) resolvemos verificar se elas poderiam estar inibindo a atividade da DNA polimerase do HSV-1. Para isso, verificamos o efeito dos produtos sobre esta enzima não purificada, a partir do extrato crú de células Vero infectadas. Estes ensaios foram realizados sob condições cinéticas de primeira ordem para captação de dTTP; além disso, foi adicionado ao meio de reação 100mM de sulfato de amônio para inibir a atividade de prováveis DNA polimerases celulares contaminantes. Podemos observar na Figura 8 que não houve inibição da atividade enzimática, mesmo na elevada concentração de droga testada, demonstrando que diferentemente do efeito inibitório destas drogas frente a enzima do HIV, este não é o alvo da DA-1 e Dol-2 sobre a replicação do HSV-1.

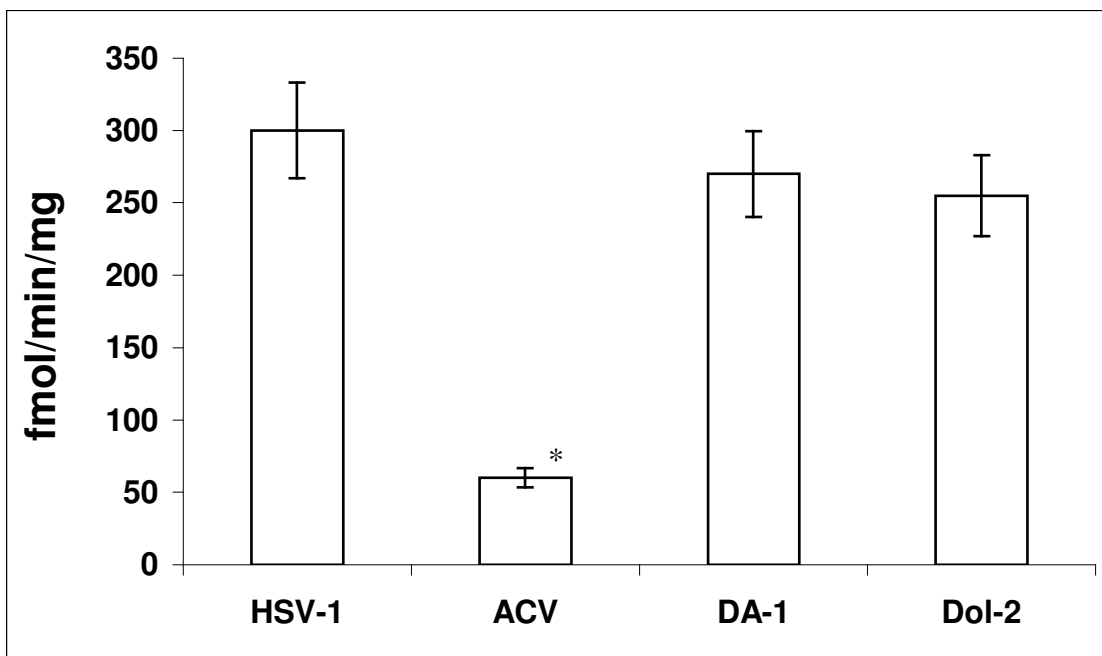


Figura 8 – Os produtos naturais não inibem a atividade DNA polimerase viral. A partir do extrato cru de células Vero infectadas com MOI de 5, avaliamos a atividade da enzima DNA polimerase do HSV-1, conforme descrito no item 3.11. Observamos que os produtos naturais não inibem tal atividade enzimática. O asterisco representa um $P < 0,05$.

5-DISCUSSÃO

A incidência global de doenças causadas por vírus, como o HIV e HSV, é bastante significativa na população humana mundial. Estima-se que milhões de indivíduos em todo o mundo sejam acometidos por alguma das doenças causadas por estes vírus. Sendo assim, estudos que visem o controle de propagação e manifestação de tais doenças, além da inativação destes patógenos, seriam de grande interesse da população mundial, sobretudo com o desenvolvimento de novos fármacos, inclusive através da obtenção de novas patentes das substâncias mais promissoras.

Produtos naturais podem representar uma nova classe de antivirais sendo organismos marinhos uma fonte muito rica destas substâncias. Além disso, já foram isoladas moléculas de algas com grande potencial antiviral para alguns herpesvírus (De Clercq, 2000).

Muitas destas substâncias naturais com potencial antiviral são terpenos. Os terpenos utilizados neste trabalho foram isolados das algas pardas marinhas *Dictyota menstrualis*, *Dictyota paffii* e *Styopodium zonale*, coletadas no litoral brasileiro. Estas substâncias foram isoladas no Departamento de Biologia Marinha da UFF, como parte do projeto que visa a pesquisa por compostos naturais com potencial antiviral e baixa citotoxicidade.

Durante a triagem inicial das substâncias, obtivemos porcentagens de inibição do efeito citopático causado pelo HSV-1 maiores do que 80%. Dentre as substâncias isoladas da alga *Styopodium zonale*, a substância Peroxilactona foi o

que apresentou a menor porcentagem de inibição, cerca de 10% menor do que as demais substâncias.

Em seguida, avaliamos a citotoxicidade destes compostos e observamos que a molécula DA-1 foi a menos citotóxica, com CC_{50} igual a $1000\mu\text{M}$, sendo cerca 16% menos citotóxica do que o composto de referência utilizado, o ACV. Por outro lado, embora os produtos isolados das algas *Dictyota pfaffii* e *Styopodium zonale* tenham apresentado valores de CC_{50} 4X e 10X maiores do que a concentração necessária para inibirem o efeito citopático viral, eles foram mais citotóxicos do que o ACV. Apesar disto, estes compostos são menos citotóxicos do que outros diterpenos descritos na literatura, cujo foco da pesquisa acaba sendo a atividade antitumoral (De Inês *et al.*, 2006).

Semelhantemente com o que ocorreu durante a triagem das drogas, obtivemos resultados um pouco diferentes com a substância peroxilactona em relação às moléculas Angel 2 e 3. A peroxilactona apresentou seu EC_{50} cerca de 2X maior do que estas outras moléculas. Talvez a diferença mais marcante desta molécula em relação às demais seja pela presença do grupamento funcional -O-O-, que é característico dos peróxidos. Este resultado pode ser explicado visto que normalmente moléculas com este grupamento apresentam melhor atividade inibitória para outros patógenos como *Plasmodium sp.* (El Sayed *et al.*, 2001).

A substância DA-1 foi a molécula que apresentou o valor de SI mais próximo ao do ACV em relação aos outros compostos. Quando as células foram infectadas com MOI de 1, o valor de SI da DA-1 foi menor do que o do ACV, contudo quando infectamos com MOI de 5, o SI da DA-1 foi maior do que o do ACV. Isso pode ser

explicado pela diferença entre os valores de EC_{50} , já que no MOI de 1 a substância DA-1 tem o EC_{50} em $1,6\mu\text{M}$, um pouco maior do que o do ACV, que é $1,2\mu\text{M}$. No entanto, no MOI de 5, obtivemos com a DA-1 um valor de EC_{50} em $5,9\mu\text{M}$, menor do que o do ACV, que é $6,5\mu\text{M}$.

Com relação a substância Dol-2 podemos perceber que apresentou valores de SI bem menores em relação a DA-1 e o composto de referência ACV, o que pode ser explicado pela sua maior citotoxicidade. Por outro lado, o EC_{50} , tanto do Dol-2 quanto da DA-1, no MOI de 5, foi menor do que o do ACV, sugerindo que quando as células são infectadas com uma quantidade maior de vírus os terpenos utilizados podem ser mais eficazes do que o ACV. Isto também indica que possíveis modificações estruturais no anel dolabelano do Dol-2 ou no anel dicotoma da DA-1 podem levar a uma redução dos seus valores de EC_{50} . Outros produtos naturais, sobretudo diterpenos, já foram descritos como agentes anti-herpéticos; contudo, grande parte destes produtos apresenta baixos índices de seletividade, justificando a necessidade de modificações estruturais pós-isolamento (Khan *et al.*, 2005).

Uma das razões que incentivaram a continuidade do estudo apenas com os compostos DA-1 e Dol-2 foi devido aos resultados obtidos no nosso laboratório, que demonstraram que estas substâncias são potentes inibidores do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) (Barbosa *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2004; de Souza *et al.*, 2005; Cirne-Santos *et al.*, 2006). Sendo assim, realizamos o ensaio curso-temporal com o objetivo de determinarmos o momento de ação dos compostos e com isso tentarmos entender o mecanismo de ação destas drogas.

Este ensaio curso-temporal foi realizado seguindo as instruções de Gong e colaboradores de 2002, levando em consideração a capacidade do HSV-1 de se replicar com uma cinética bastante constante, isto é, um ciclo replicativo que gira em torno de 18 a 20h e com pico de proteínas de cada uma de suas fases nos tempos de 0-3h (α), 3-6 (β) e 6-20h (γ) (Roizman & Sears, 1996; Boehmer & Lehman, 1997). Neste experimento observamos que a DA-1 poderia estar atuando no período de 0-3h do ciclo replicativo viral, período este que coincide com a produção de proteínas de fase α , na qual são produzidas proteínas responsáveis por regular as demais fases da replicação viral, como a ICP4, ICP27 e ICP47. Já o composto Dol-2 poderia estar atuando em dois períodos distintos da replicação; um deles seria o mesmo alvo da DA-1 e o outro seria o período de 3-6h, que coincide com a produção de proteínas de fase β , na qual são produzidas proteínas necessárias para que ocorra a duplicação do DNA viral, como a timidina cinase (TK) e o complexo UL30/UL42 (DNA polimerase viral).

As outras etapas da replicação do HSV-1, ou seja, adsorção, penetração e fase γ , na qual ocorre a produção de proteínas estruturais do vírion, parecem não ser o alvo de ação dos compostos utilizados neste trabalho. Podemos observar também com este ensaio que o mecanismo de ação destes compostos frente a replicação do HSV-1 é diferente daquele observado para a replicação do HIV-1, já que estas substâncias atuam durante a adsorção do HIV-1 na célula hospedeira (Pereira *et al.*, 2004 & Cirne-Santos, dados não publicados).

Alguns trabalhos clássicos que abordam a replicação do HSV-1 mostram que este vírus é capaz de inibir a maquinaria de síntese de macromoléculas da

célula hospedeira (Fenwick & Walker, 1978). Isto representa uma importante vantagem para a replicação viral, já que a maquinaria de síntese de macromoléculas do hospedeiro fica disponível para que ocorra a replicação viral (Roizman & Sears, 1996). Sendo assim, avaliamos a capacidade dos diterpenos das algas *D. menstrualis* e *D. pfaffii* em prevenir este efeito do HSV-1. Para isto, infectamos células Vero com HSV-1 com MOI de 5 e traçamos a síntese protéica com [³⁵S]-Metionina e observamos que houve uma redução da síntese de proteínas quando as células Vero foram infectadas; contudo, quando estas células foram tratadas com as substâncias foi possível prevenir esta inibição, retornando a níveis iguais ao do controle não infectado e não tratado. Já no MOI de 20 o composto DA-1 não conseguiu prevenir esta inibição viral, mostrando ser dependente do MOI utilizado, conforme já esperado, pois a concentração testada foi duas vezes maior que o EC₅₀ para o MOI de 5. Curiosamente, o mesmo não aconteceu com o Dol-2, já que este atuou de maneira independente do MOI. Uma provável explicação para este efeito pode residir na correlação estrutural entre do Dol-2 e o éster de fosbol PMA (Liu & Heckman, 1998). Se assumirmos que o Dol-2 poderia também ativar a PKC, teríamos um efeito independente do MOI, pois seria um efeito sobre a célula; como o número de células durante todo o experimento é constante, teríamos, novamente, um efeito independente do MOI. No entanto, esta hipótese deve ser confirmada experimentalmente.

Neste mesmo ensaio podemos observar que houve uma diminuição da contagem no controle tratado com as substâncias em relação ao controle não infectado e não tratado. Isso pode ser explicado por alguma diferença na sinalização celular de maneira que as drogas reduzissem transitoriamente a

síntese protéica celular, já que estes compostos apresentaram valores de citotoxicidade em 50% (CC₅₀) bem maiores do que a concentração de 10µM utilizada neste ensaio.

Com relação a expressão de proteínas decidimos estudar o perfil protéico no MOI de 20, pois conseguimos obter um bom perfil de proteínas virais, isto é, podemos observar proteínas de todas as fases da replicação do HSV-1 e, assim, podemos reduzir significativamente a interferência de proteínas celulares devido à alta inibição da síntese de macromoléculas induzida pelo vírus. Portanto, observamos em células Vero infectadas e tratadas no MOI de 20 que ambas as drogas inibiram a expressão de proteínas de fase β, dificultando a expressão das proteínas virais helicase (UL-8), modulador da expressão gênica e ciclo celular (RL-1) e desoxiribonuclease (UL-12), sendo que o Dol-2 também dificultou a expressão das proteínas DNA polimerase (UL30) e *Ori binding protein* (UL-9). Estas proteínas foram identificadas pelos seus pesos moleculares no sitio da web contendo o proteoma do HSV-1 cepa 17+ (http://www.virusys.com/HSV-1/HSV-1_ORFS/hsv-1_orfs.html).

Sendo assim, estas substâncias podem estar atuando sobre alguma das primeiras proteínas produzidas na fase β que seja sintetizada antes destas que tem sua expressão inibida ou sobre alguma proteína de fase α, cuja atividade poderia dificultar a expressão de proteínas de fase β, já que as proteínas de fase α são regulatórias (Boehmer & Lehman, 1997). Levando em consideração os dados da infecção curso-temporal e a análise do perfil protéico, podemos concluir que proteínas virais de fase α são o alvo dos diterpenos estudados.

Por fim, como estas drogas também foram utilizadas como inibidores da transcriptase reversa do HIV-1 (Barbosa *et al.*, 2004; de Souza *et al.*, 2005), analisamos se eles seriam eficazes em inibir a atividade da enzima DNA polimerase do HSV-1. Observamos que este não é o alvo de ação destas drogas na replicação do HSV-1, mostrando novamente que o alvo destas drogas é diferente nos dois tipos de vírus. Este efeito característico parece ser compartilhado com outros produtos naturais que inibem os dois vírus simultaneamente por mecanismos diferentes (Smit, 2004). Porém, esta característica difere de alguns produtos sintéticos como os cloroxoquinolínicos, que apresentam o mesmo alvo na replicação do herpes e do HIV (Souza *et al.*, dados não publicados; Souza, 2005). Podemos, ainda, comparar um outro parâmetro dos compostos testados entre a replicação do herpes e do HIV que é seu EC₅₀; os valores desta medida para replicação do herpes foram cerca de 8x menores do que aqueles obtidos para replicação do HIV, sugerindo que o principal alvo das moléculas testadas é a replicação do HSV-1.

Sendo assim, o estudo de novas moléculas derivadas de algas marinhas com potencial antiviral pode ser uma boa oportunidade para o desenvolvimento de fármacos com boa atividade antiviral sobre a fase α da replicação do HSV-1 e com baixa citotoxicidade. É particularmente interessante o desenvolvimento de novos compostos contra esta fase da replicação do HSV-1, pois não existem drogas disponíveis na clínica que tenham como alvo esta etapa, além de ser uma etapa diferente daquela inibida pelo ACV, sugerindo que a combinação destes compostos pode apresentar um efeito terapêutico aditivo ou sinérgico.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, J.P., PEREIRA, R.C., ABRANTES, J.L., SANTOS, C.C.C., REBELLO, M.A., FRUGULHETTI, I.C.P.P. & TEIXEIRA, V.L. (2004) *In vitro* antiviral diterpenes from the brazilian brown alga *Dictyota pfaffii*. *Planta Medica*, 70, p.1 - 5.

BENDER, F.C., WHITBECK, J.C., LOU, H. COHEN, G.H. & EISENBERG, R.J. (2005) Herpes Simplex Virus Glycoprotein B Binds to Cell Surfaces Independently of Heparan Sulfate and Blocks Virus Entry. *Journal of Virology*, 79(18), p. 11588-11597.

BENEDICT, C. A. & WARE, C. F. (2001) Virus targeting of the tumor necrosis factor superfamily. *Virology*, 289 (1), p.1 - 5.

BENEDICT, C. A., BANKS, T. A. & WARE, C. F. (2003) Death and survival: viral regulation of TNF signaling pathways. *Curr. Opin. Immunol.*, 15 (1), p. 59 - 65.

BHATTARAKOSOL, P., VISAPROM, S., SANGDARA, A. & MUNGMEE, V. (2005) Increase of genital HSV-1 and mixed HSV-1 and HSV-2 infection in Bangkok, Thailand. *J. Med. Assoc. Thai.*, 88, p. 300-304.

BLUNT, J.W., COPP, B.R., MUNRO, M.H., NOTHCOTE, P.T. & PRINSET, M.R. (2006) Marine Natural products. *Natural Product Reports*, 23(1), p.26-78.

BOEHMER, P. E. & LEHMAN, I. R. (1997) Herpes simplex virus DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.*, 66, p.347 - 384.

BONGIORNI, L. & PIETRA, F. (1996) Marine natural products for industrial applications. *Chemistry & Industry*, 2, p. 54-58.

BRADY, R.C. & BERNSTEIN, D.I. (2004). Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Research*, 61, p.73 - 81.

CARLUCCI, M. J., PUJOL, C. A., CIANCIA, M., NOSEDA, M. D., MATULEWICZ, M. C., DAMONTE, E. & CEREZO, A. S. (1997) Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. *Int. J. Biol. Macromol.*, 20, p.97-105.

CARLUCCI, M.J., CIANCIA, M., MATULEWICZ, M.C., CEREZO, A.S. & DAMONTE, E.B. (1999) Antiherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types. *Antiviral Research*, 43(2), p. 93-102.

CARLUCCI, M.J., SCOLARO, L.A., NOSEDA, M.D., CEREZO, A.S. & DAMONTE, E.B. (2004) Protective effect of a natural carrageenan on genital herpes simplex virus in mice. *Antiviral Research*, 64, p.137–141.

CHEN, H., TENG, L., LI, J. N., PARK, R., MOLD, D. E., GNABRE, J., HWU, J. R., TSENG, W. N. & HUANG, R. C. (1998) Antiviral activities of methylated nordihydroguaiaretic acids. 2. Targeting herpes simplex virus replication by the mutation insensitive transcription inhibitor tetra –O-methyl-NDGA. *J. Med. Chem.*, 41, p. 3001 - 3007.

CIRNE-SANTOS, C. C., TEIXEIRA, V.L., CASTELLO-BRANCO, L.R., FRUGULHETTI, I.C.P.P. & BOU-HABIB, D. C. (2006) Inhibition of HIV-1 replication in human primary cells by a dolabellane diterpene isolated from the marine algae *Dictyota pfaffii*. *Planta Medica*, 72 (4), p. 295-299.

COEN, D.M. (1996) Antiviral drug resistance in herpes simplex virus. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 394, p. 49 - 57.

COUTINHO, A. F., CHANAS, B., SOUZA, T.M.L., FRUGULHETTI, I.C.P.P. & EPIFANIO, R.A. (2002). Anti HSV-1 alkaloids from a feeding deterrent marine sponge of the genus *aaptos*. *Heterocycles*, 57 (7), p.1265 - 1272.

COREY, L. & SPEAR, P. G. (1986) Infections with herpes simplex viruses
1. *New Engl. J. Med.*, 314, p. 686 - 691.

COS, P., VLIETINCK, A.J., BERGHE, D.V. & MAES, L. (2006). Anti-
infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro
'proof-of-concept'. *Journal of Ethno-pharmacology*, article in press.

DE CLERCQ, E. (2000) Current lead natural products for the chemotherapy
of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Med. Res. Rev.*, 20, p.
323-349.

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

DE INES, C., REINA, M., GAVIN, J.A. & GONZALEZ-COLOMA, A. (2006)
In vitro cytotoxicity of norditerpenoid alkaloids. *Z. Naturforsch*, 61, p.1-8.

**DE LOGU, A., LOY, G., PELLERANO, M. L., BONSIGNORE, L. &
SCHIVO, M. L.** (2000) Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of
cell-to-cell virus spread by *Santolina insularis* essential oil. *Antiviral
Research*, 48 p. 177 - 185.

DE SOUZA H.P., LEÃO-FERREIRA, L.E., MOUSSATCHE, N., TEIXEIRA, V.L., CAVALCANTI, D.N., DA COSTA, L.J., DIAZ, R. & FRUGULHETTI, I.C.P.P. (2005) Effects of diterpenes isolated from Brazilian marine alga *Dictyota menstrualis* on HIV-1 reverse transcriptase. *Planta Medica*, 71(11), p.1019 -1024.

DONIA, M. & HAMANN, M.T. (2003). Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *Lancet. Infect. Dis.*, 3, p.338 – 348.

DUARTE, M.E.R, NOSEDA, D.G., NOSEDA, M.D., TULIO, S., PUJOL, C.A. & DAMONTE, E.B. (2001). Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication *in vitro*. *Phytomedicine*, 8 (1), p. 53-58.

DUARTE, M. E. R., CAUDURO, J. P., NOSEDA, M. D., GONCALVES, A. G., PUJOL, C. A., NOSEDA, D. G., DAMONTE, E. B. & CEREZO, A. S. (2004) The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity in agarans. *Carbohydr. Res.*, 339, p. 335-347.

EL SAYED, K.A., HAMANN, M.T., HASHISHI, N.E. SHIER, W.T., KELLY, M. & KHAN, A.A. (2001) Antimalarial, antiviral and antitoxoplasmosis norsesterterpene peroxid acids from the red sea esponje *Diacarnus erythraeanus*. *Journal of Natural Products*, 64(4), p. 522-524.

ERNST, M. E. & FRANEY, R. J. (1998) Acyclovir and ganciclovir induced neurotoxicity. *Ann. Pharmacother.*, 32, p.111 - 113.

ESQUENAZI, D. M. D., WIGG, M. M. F. S., MIRANDA, H. M., RODRIGUES, J. B., TOSTES, S., ROZENTAL, A., SILVA, J. R. & ALVIANO, C. S. (2002) Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. *Research in Microbiology*, 153, p. 647 - 652.

FARIA-TISCHER, P. C. S., TALARICO, L. B., NOSEDA, M. D., GUIMARAES, S. M. P. B., DAMONTE, E. B. & DUARTE, M. E. R. (2006) Chemical structure and antiviral activity of carrageenans from *Meristiella gelidium* against herpes simplex and dengue virus. *Carbohydr. Polym.*, 63, p. 459-465.

FAULKNER, D. J. (1992) Marine natural products. *Natural Product Reports*, 9 (4), p. 323-364.

FENWICK, M. L. & WALKER, M. J. (1978) Suppression of the synthesis of cellular macromolecules by herpes simplex virus. *Journal of General Virology*, 41, p. 37 -51.

FLAKOW (1996) Molecular Virology in Principles of Microbiology, Ronald Atlas. McGraw-Hill Science/Engineering/Math; 2nd edition (November 18).

GERBER, P., DUTCHER, J.D., ADAMS, E.V. & SHERMAN, J.H. (1958) Protective effect of seaweed extracts for chicken embryos infected with influenza B or mumps virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 99, p. 590-593.

GONG, Y., MATTHEWS, B., CHEUNG, D., TAM, T., GADAWSKI, I., LEUNG, D., HOLAN, G., RAFF, J. & SACKS, S. (2002) Evidence of dual sites of action of dendrimers: SPL-2999 inhibits both virus entry and late stages of herpes simplex virus replication. *Antiviral Research*, 55, p. 319 - 329.

GOOGLE (2006) Disponível em <http://www.google.com.br>

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD,L.E. & GILMAN, A.G. (2001) The Pharmacological basis of therapeutics – Section VIII – Antimicrobial Agents: Antiviral Agents (Nonretroviral), tenth edition, 1313 – 1348.

HARPER, M.K., BUGNI, T.S., COPP, B.R., JAMES, R.D., LINDSAY, B.S., RICHARDSON, A.D., SCHNABEL, P.C., TASDEMIR, D., VANWAGONER, R.M., VERBITSKI, S.M. & IRELAND, C.M. (2001) Introduction to the chemical ecology of marine natural products. In: *Marine Chemical Ecology*. McClintock, J.B. & Baker, B.J. (eds.). 1^a. Ed.: 3-69.

HASUI, M., MATSUDA, M., OKUTANI, K. & SHIGETA, S. (1995) In vitro antiviral activities of sulfated polysaccharides from a marine microalga (*Cochlodinium polykrikoides*) against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. *Int J Biol Macromol.*, 17(5), p.293-297.

HWANG, C. B., RUFFNER, K. L. & COEN, D. M. (1992) A point mutation within a distinct conserved region of the herpes simplex virus DNA polymerase gene confers drug resistance. *Journal of Virology*, 66, p.1774 - 1776.

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

KLADI, M., XENAKI, H., VAGIAS, C., PAPAZAFIRI P. & ROUSSIS, V. (2006) New cytotoxic sesquiterpenes from the red algae *Laurencia obtusa* and *Laurencia microcladia*. *Tetrahedron*, 62, p.182–189.

KNOFF, K. W. (1979) Properties of herpes simplex virus DNA polymerase and characterization of its associated exonuclease activity. *European Journal of Biochemistry*, 98, p. 231 - 244.

KUO, Y.C., LIN, C.Y., CHENG, S.F., LIN, C.C. & LIU, W.T. (1987). Impaired natural killer cytotoxicity during recrudescence of recurrent herpes simplex virus type 1 infection. *Cancer Detect. Prev.*, 1, p. 51 - 55.

KUO, Y. C., CHEN, C. C., TSAI, W. J. & HO, Y. H. (2001) Regulation of herpes simplex virus type 1 replication in Vero cells by *Psychotria serpens*: relationship to gene expression, DNA replication, and protein synthesis. *Antiviral Research*, 51, p. 95 - 109.

KUO, Y. C., LIN, L. C., TSAI, W. J., CHOU, C. J., KUNG, S. H. & HO, Y. H. (2002) Samarangenin B from *Limonium sinense* Suppresses Herpes Simplex Virus Type 1 Replication in Vero Cells by Regulation of Viral Macromolecular Synthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 9 p. 2854 – 2864.

LAGROTA, M. H. C., WIGG, M. D., SANTOS, M. M. G., MIRANDA, M. M. F. S., CÂMARA, F. P., COUCEIRO, J. N. S. S. & COSTA, S. S. (1994) Inhibitory activity of extracts of *Althernantera brasiliiana* (Amaranthaceae) against the herpes simplex virus. *Phytotherapy Research*, 8 p. 358 - 361.

LEE, J.B., HAYASHI, K., HAYASHI, T., SANKAWA, U. & MAEDA, M. (1999) Antiviral activities against HSV-1, HCMV, and HIV-1 of rhamnan sulfate from *Monostroma latissimum*. *Planta Medica*, 65(5), p. 439-441.

LINDAHL, U., KUSCHE-GULLBERG, M. & KJELLÉN, L. (1998) Regulated diversity of heparan sulfate. *Journal of Biological Chemistry*, 273 p.24979 - 24982.

LIPIPUN, V., KUROKAWA, M., SUTTISRI, R., TAWEECHOTIPATR, P., PRAMYOTHIN, P., HATTORI, M. & SHIRAKI, K. (2003) Efficacy of Thai medicinal plant extracts against herpes simplex virus type 1 infection in vitro and in vivo. *Antiviral Research*, 60, p.175-180.

LIU, W.S. & HECKMAN, C.A. (1998) The sevenfold way of PKC regulation. *Cell signal.*, 10(8), p. 529-542.

LIU, F., LIU, Y., MENG, Y., YANG, M. & HE, K. (2004). Structure of polysaccharide from *Polygonatum cyrtoneuma* Hua and antiherpetic activity of its hydrolysed fragments. *Antiviral Research*, 63 p.183-189.

LYON, A.W., MANSOOR, A. & TROTTER, M.J. (2002) Urinary gems: acyclovir crystalluria. *Arch Pathol Lab Med.*, 126(6), p.753-754.

MANN, S. L., MEYERS, J. D., HOLMES, K. L. & COREY, L. (1984) Prevalence and incidence of herpesvirus infections among homosexually active men. *Journal of Infectious Diseases*, 149, p.1026 -1027.

MAROZIN, S., PRANK, U. & SODEIK, B. (2004) Herpes simplex virus type 1 infection of polarized epithelial cells requires microtubules and access to receptors present at cell-cell contact sites. *Journal of General Virology*, 85, p.775 - 786.

MAURI, D. N., EBNER, R., MONTGOMERY, R. I., KOCHER, K. D., CHEUNG, T. C. & YU, G. L. (1998) LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin α are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity*, 8, p.21 - 30.

MELANCON, J. M., FOSTER, T. P. & KOUSOULAS, K. G. (2004) Genetic analysis of the herpes simplex virus type 1 UL 20 protein domains involved in cytoplasmic virion envelopment and virus-induced cell fusion. *Journal of Virology*, 78(14), p.7329 -7343.

MIRANDA, M. M. F. S. (2002) *Viroses dermatópicas In: Introdução a virologia humana (Santos, N.S.O.; Romanos, M.T.V.; Wigg, M.D.) 1ed. Guanabara Koogan. Capítulo 7. pp.75 - 85.*

MITCHELL, B.M.; BLOOM, D.C.; COHRS, R.J.; GILDEN, D.H. & KENNEDY, P.G. (2003) Herpes simplex virus-1 and varicella zoster virus latency in ganglia. *Journal of Neurovirology*, 9 (2), p.194 - 204.

MONTGOMERY, R. I., WARNER, M. S., LUM, B. J. & SPEAR, P. G. (1996) Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/ NGF receptor family. *Cell*, 87, p. 427 - 436.

PEREIRA, H. S., LEÃO-FERREIRA, L. R., MOUSSATCHÉ, N., TEIXEIRA, V.L., CAVALCANTI, D. N., COSTA, L. J., DIAZ, R. & FRUGULHETTI, I. C. P. P. (2004). Antiviral activity of diterpenes isolated from the Brazilian marine alga *Dictyota menstrualis* against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Antiviral Research*, 64, p.69-76.

PRESTON, C. M. (2000) Repression of viral transcription during herpes simplex virus latency. *Journal of General Virology*, 81, p.1 - 19.

READ, J. & MUENCH, M. (1938) A simple method of estimating 50% endpoints. *American Journal Virology*, 27, p. 492 - 497.

ROIZMAN, B. & SEARS, A. E. (1996) Herpes simplex viruses and their replication. In: Knipe, D. & Howley, P. (Eds.). *Fields Virology*, 4th ed. Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia, 2231 – 2295.

ROMANOS, M.T.V., ANDRADA-SERPA, M.J., MOURÃO, P.A.S., YONESHIGUE-VALENTIN, Y, COSTA, S.S., PEREIRA, M.S., MIRANDA, M.M.F.S., GONÇALVES, J.L.S. & WIGG, M.D. (2002) A sulphated fucan from the *Laminaria abyssalis* inhibits the human T cell lymphotropic virus type 1-induced syncytium formation in HeLa cells. *Antiv. Chem. Chemother.*, 13, p. 219-221.

SARRIAS, M. R., WHITEBECK, J. C., ROONEY, I., WARE, C. F., EISENBERG, R. J., COHEN, G. H. & LAMBRIS, J. D. (2000) The three HveA receptor ligands, gD, LT- α and LIGHT bind to distinct sites on HveA. *Molecular Immunology*, 37, p. 665 - 673.

SMIT, A.J. (2004) Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *Journal of Applied Phycology*, 16, p.245-262.

SOARES, A.R.; TEIXEIRA, V.L.; PEREIRA, R.C. & VILLAÇA, R. (2003) Variation on diterpene production by the Brazilian alga *Stypopodium zonale* (Dictyotales, Phaeophyta). *Biochemical Systematics and Ecology*, 31, p.1347-1350.

SOUZA, T.M.L. (2005) Efeito de Análogos Oxoquinolínicos Sobre a Replicação *in vitro* do Vírus Herpes Simples Tipo – 1. Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Pós-graduação em Química Biológica.

SPEAR, P. G., ELISENBERG, R. J. & COHEN, G. H. (2000) Three Classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology*, 275, p.1 - 8.

SPEAR, P. G. & LONGNECKER, R. (2003) Herpesvirus entry: an update. *Journal of Virology*, 77(19), p.10179 –10185.

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

SPEAR, P. G.; MANOJ, S.; YOON, M.; JOGGER, C. R.; ZAGO, A. & MYSCOFSKI, D. (2006) Different receptors binding to distinct interfaces on herpes simplex virus gD can trigger events leading to cell fusion and viral entry. *Virology*, 344, p. 17-24.

STRANSKA, R., SCHUURMAN, R., NIENHUIS, E., GOEDEGEBUURE, I.W., POLMAN, M., WEEL, J.F., DILLEN, P.M., BERKHOUT, R.J. & VAN LOON, A.M. (2005) Survey of acyclovir-resistant herpes simplex virus in the

Netherlands: prevalence and characterization. *Journal of Clinical Virology*, 32(1), p.7-18.

TALARICO, L.B., ZIBETTI, R.G., FARIA, P.C., SCOLARO, L.A., DUARTE, M.E., NOSEDA, M.D., PUJOL, C.A. & DAMONTE, E.B. (2004) Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 34, p. 63 – 71.

TALARICO, L.B., PUJOL, C.A., ZIBETTI, R.G., FARIA, P.C., NOSEDA, M.D., DUARTE, M.E. & DAMONTE, E.B. (2005) The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. *Antiviral Research*, 66 (2-3), p.103-110.

TEIXEIRA, V.L. CAVALCANTI, D.N. & PEREIRA, R.C. (2001) Chemotaxonomic study of the diterpenes from the brown alga *Dictyota menstrualis*. *Biochemistry Systematics and Ecology*, 29, p. 313 - 316.

VIDOTTI, E.C. & ROLLEMBERG, M.C. (2004) Algas: Da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. *Química Nova*, 27(1), p.139-145.

VIRUSYS CORPORATION (2006). Disponível em:
http://www.virusys.com/HSV-1/HSV-1_ORFS/hsv-1_orfs.html

WAGNER WEB SITE. (2001). Disponível em: <http://darwin.bio.uci.edu>

WARE, C. F. (2003) The TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 14 (33-44), p.181 -184.

WHITBECK, J. C., PENG, C., LOU, H., XU, R., WILLIS, S. H. & PONCE DE LEON, M. (1997) Glycoprotein D of herpes simplex virus (HSV) binds directly to HVEM, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily and a mediator of HSV entry. *Journal of Virology*, 71, p. 6083 - 6093.

WHITLEY, R. J. (1996) Herpes simplex viruses. In: Knipe, D. & Howley, P. (Eds.). *Fields Virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia, 2297 – 2342.

WHITLEY, R.J. (2002) Herpes simplex virus infection. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.*, 13, p. 6 -11.

WUTZLER, P. & THUST, R. (2001) Genetic risks of antiviral nucleoside analogues – a survey. *Antiviral Research*, 49, p. 55 -74.

YOON, M. & SPEAR, P. G. (2002) Disruption of adherens junctions liberates nectin-1 to serve as receptor for herpes simplex virus and pseudorabies virus entry. *Journal of Virology*, 76(14), p. 7203 -7208.

ZANETTA, G., MAURICE-ESTEPA, L., MOUSSON, C., JUSTRABO, E., DAUDON, M., RIFLE, G. & TANTER, Y. (1999) Foscarnet- induced crystalline glomerulonephritis with nephrotic syndrome and acute renal failure after kidney transplantation. *Transplantation*, 67(10), p. 1376-1378.

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](#)