

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Avaliação de atividade antirretroviral de extratos e substâncias isoladas de *Hypericum connatum* frente ao vírus da imunodeficiência felina (FIV) como modelo experimental para o HIV

RAFAELA WACHHOLZ HEPP

PORTO ALEGRE, 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação de atividade antirretroviral de extratos e substâncias isoladas de *Hypericum connatum* frente ao vírus da imunodeficiência felina (FIV) como modelo experimental para o HIV

Dissertação apresentada por **Rafaela Wachholz Hepp** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Gilsane Lino von Poser

Co-Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ravazzolo

Porto Alegre, 2020

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 19.05.2020, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Ana Cláudia Franco

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Luiz Carlos Rodrigues Júnior

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Profa. Dr. Miriam Anders Apel

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Wachholz Hepp, Rafaela

Avaliação de atividade antirretroviral de extratos e substâncias isoladas de *Hypericum connatum* frente ao vírus da imunodeficiência felina (FIV) como modelo experimental para o HIV / Rafaela Wachholz Hepp. -- 2020.

65 f.

Orientadora: Gilsane Lino von Poser.

Coorientadora: Ana Paula Ravazzolo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. *Hypericum*. 2. FIV. 3. Atividade antiviral. 4. Fracionamento bioquímico. I. von Poser, Gilsane Lino, orient. II. Ravazzolo, Ana Paula, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Farmacognosia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular na Faculdade de Veterinária da UFRGS, na cidade de Porto Alegre.

Agradecimento ao CNPq, CAPES e FAPERGS pelo suporte financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, pela vida.

Aos meus pais e a minha irmã, por terem iluminado o meu caminho até aqui, pelo apoio incondicional, amor e carinho em todas as etapas da minha vida.

A minha orientadora, Profª Gilsane, por estar sempre disponível e disposta a ajudar. Muito obrigada pela confiança e pelos ensinamentos, os levarei por toda minha vida profissional.

Aos meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado e tornam a caminhada mais leve.

Aos colegas de trabalho, nos laboratórios de Farmacognosia e Virologia, meu agradecimento por terem me auxiliado sempre que necessitei.

Às ICs Jéssica e Letícia, pela amizade, companheirismo e dedicação durante o tempo que estiveram comigo.

À Profª Fabiana Horn, que muito gentilmente cedeu espaço em seu laboratório para ser possível a continuidade dos experimentos.

À UFRGS e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela infraestrutura, excelência de ensino e por abrirem as portas para que mais uma realização na minha vida fosse possível.

Um agradecimento especial à minha co-orientadora, Profª Ana Paula, que nos últimos quatro anos nunca mediu esforços para me ajudar. Me apoiou, me incentivou e me fez crescer como pessoa. Muito obrigada por toda a jornada.

Resumo

O vírus da imunodeficiência felina (FIV), do gênero *Lentivirus*, foi descoberto em 1986 e, desde então, tem sido um modelo experimental promissor para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) devido à similaridade estrutural, genômica e patogênica entre os vírus, já demonstrada por diversos autores. O FIV torna-se uma ferramenta para a avaliação de novos fármacos antirretrovirais. A necessidade de encontrar terapias alternativas ao HIV direcionou diversos autores a buscar novas moléculas, em diferentes organismos vivos, principalmente em vegetais superiores. Diversos estudos demonstram atividades biológicas de espécies do gênero *Hypericum*, como por exemplo, a atividade antidepressiva e a antiviral. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antirretroviral de extrato proveniente de *H. connatum* frente ao FIV e buscar a substância ativa responsável pela atividade. Para tanto, foram avaliados frente ao FIV: o extrato metanólico bruto, obtido das partes aéreas de *H. connatum*, frações obtidas por solventes de polaridade crescente e substâncias isoladas, majoritárias na fração de maior atividade antiviral. A composição química das frações foi determinada por HPLC e a fração acetato de etila foi submetida ao isolamento da substância quercitrina por coluna cromatográfica. A avaliação da atividade antiviral foi realizada pela quantificação do número de cópias de FIV no sobrenadante de cultivo celular infectado por PCR em tempo real (qPCR). O extrato metanólico bruto reduziu em 2431 × a carga viral de FIV em comparação ao controle viral. Das frações avaliadas, a fração acetato de etila foi a mais eficiente na inibição da replicação viral, tendo reduzido em 7809 × o número de cópias do vírus. A fração metanol também apresentou atividade antiviral (1466 ×). Os compostos majoritários encontrados em ambas frações por HPLC foram quercitrina e hiperosídeo, sendo a primeira a mais abundante na fração acetato de etila e isolada a partir dessa fração. Quercitrina e hiperosídeo foram testados frente ao FIV, e reduziram parcialmente a carga viral, apresentando resultado comparável ao fármaco Zidovudina (AZT).

Palavras-chaves: *Hypericum connatum*, FIV, atividade antiviral, quercitrina, hiperosídeo

Abstract

The feline immunodeficiency virus (FIV), from the *Lentivirus* genus, was discovered in 1986 and, since then, it has been a promising experimental model for the human immunodeficiency virus (HIV) due to the structural, genomic and pathogenic similarity between the viruses, already evidenced by many authors. FIV becomes a tool to evaluate new antiretrovirals drugs. The necessity of finding new therapies against HIV has influenced many researchers to search new molecules in different living organisms, mainly in superior plants. Several studies demonstrate biologicals activities of species from the *Hypericum* genus, for instance, antidepressant and antiviral activity. The aim of this study was to evaluate the antiretroviral activity of the extract from *H. connatum* against FIV and to search for the active substance responsible for the activity. Therefore, it was evaluated against FIV: the crude methanolic extract, obtained from the aerial parts of *H. connatum*, fractions of the extract obtained using increasing polarity solvents and major compounds isolated in the fraction with the best antiviral activity. The chemical composition was determined by HPLC and the ethyl acetate fraction was submitted to the isolation of the compound quercitrin by chromatographic column. The evaluation of the antiviral activity was performed by the quantification of viral particles by real time PCR (qPCR). The crude methanolic extract was able to reduce in 2431 × the viral load of FIV comparing to viral control. Of the evaluated fractions, the ethyl acetate fraction was the most efficient inhibiting the viral replication, reducing in 7809 × the number of viral copies. The methanolic fraction also showed antiviral activity (1466 ×). The major compounds found in both fractions were quercitrin and hyperoside, the former being the most abundant in the ethyl acetate and isolated from it. Quercitrin and hyperoside were tested against FIV, partially decreasing the viral load, showing comparable results to the zidovudine (AZT) drug.

Key-words: *Hypericum connatum*, FIV, antiviral activity, quercitrin, hyperoside

Lista de figuras

Figura 1. Organização genômica do DNA proviral de FIV e HIV	28
Figura 2. Representação da replicação viral de FIV.....	29
Figura 3. Estrutura básica de flavonoide e suas diferentes classes	41
Figura 4. Estrutura da quercitrina.	42
Figura 5. Estrutura do hiperosídeo.	43
Figura 6. <i>Hypericum connatum</i>	44
Figura 7. Perfis cromatográficos representativos dos principais compostos avaliados na fração acetato de etila	52
Figura 8. Cromatogramas do composto isolado e dos compostos padrão.....	53
Figura 9. Fotos representativas da citotoxicidade das substâncias frente às CrFKs	55
Figura 10. Curva padrão da PCR em tempo real.....	57
Figura 11. Efeito citopático causado pelo vírus nas CrFKs.....	58

Lista de tabelas

Tabela 1. Conteúdo dos compostos avaliados nas frações acetato de etila e metanol	52
Tabela 2. Citotoxicidade das amostras vegetais	56
Tabela 3. PCR em tempo real do extrato metanólico bruto.....	59
Tabela 4. PCR em tempo real da fração hexano	60
Tabela 5. PCR em tempo real das frações diclorometano e metanol.....	61
Tabela 6. PCR em tempo real da fração acetato de etila	61
Tabela 7. PCR em tempo real das substâncias isoladas.....	62

Lista de abreviaturas e siglas

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
3TC	Lamivudina
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ART	Terapia Antirretroviral
AZT	Zidovudina
CA	Proteína do Capsídeo
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CD4/CD8	<i>Cluster of Differentiation</i> : marcadores de superfície celular de linfócitos T
cDNA	DNA complementar
CMT	Concentração Máxima Tolerada
CO ₂	Dióxido de Carbono
CPE	Efeito Citopático
CrFKs	<i>Crandell Rees Feline Kidney</i> (células de linhagem de rim felino)
C _t	<i>Cycle Threshold</i> (Ciclo Limiar)
DMEM	Meio Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNT	Deoxinucleotídeos
DTG	Dolutegravir
dTTP	Trifosfato de Desoxitimidina
DU	dUTPase
dUTP	Desoxiuridina Trifosfato
EMB	Extrato Metanólico Bruto
FA	Fração Acetato
FAIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida Felina
FD	Fração Diclorometano
FeLV	Vírus da Leucemia Felina
FIV	Vírus da Imunodeficiência Felina
FH	Fração Hexano
FM	Fração Metanol
<i>g</i>	Força da gravidade
gp	Glicoproteína
h	Horas
H ₂ O	Água
HBV	Vírus da Hepatite B
HCMV	Citomegalovírus
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HSV-1	Vírus do Herpes Simples tipo 1
IBV	Vírus da Bronquite Infeciosa
IC50	Metade da concentração inibitória máxima

IN	Integrase
LTR	<i>Long Terminal Repeats</i> (Sequências Longas Terminais Repetidas)
MA	Proteína da Matriz
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mRNA	RNA mensageiro
nm	Nanômetros
NNRTI	Inibidor da RT não nucleosídeo
NRTI	Inibidor da RT nucleosídeo
NtRTI	Inibidor da RT nucleotídeo
OH	Hidroxila
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Fase de Leitura Aberta)
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (Solução salina tamponada com fosfatos)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polymerase)
pFIV	Plasmídeo contendo o provírus do FIV
PR	Protease
qPCR	PCR em Tempo Real
r^2	Coefficiente de determinação
rFeIFN- ω	Interferon Ômega Felino Recombinante
RNA	Ácido Ribonucleico
RT	Transcriptase Reversa
SFB	Soro Fetal Bovino
SU	Superfície
TDF	Tenofovir Disoproxil Fumarato
Th	T helper (Linfócito T auxiliar)
TM	Transmembrana
t_R	Tempo de Retenção
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UI	Unidades Internacionais
UNAIDS	Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS
V	Volume

Sumário

1. Introdução.....	21
2. Objetivos.....	23
2.1. Objetivo geral.....	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
3. Revisão da literatura.....	25
3.1. Vírus da Imunodeficiência Felina.....	25
3.1.1. Partícula viral e genoma.....	26
3.1.2. Ciclo de replicação viral.....	28
3.1.3. Patogenia FIV.....	29
3.2. FIV como modelo para HIV.....	30
3.3. Terapia antirretroviral.....	32
3.3.1. Fármacos já existentes.....	33
3.3.2. Desenvolvimento de resistência.....	36
3.4. Uso de plantas medicinais.....	38
3.4.1. Produtos naturais frente ao FIV e HIV.....	39
3.4.2. Flavonoides.....	40
3.4.3. Atividades biológicas de espécies do gênero <i>Hypericum</i>	43
3.4.3.1. <i>Hypericum connatum</i>	44
4. Materiais e métodos.....	45
4.1. Material Vegetal.....	45
4.1.1. Coleta e preparação do material vegetal de <i>Hypericum connatum</i>	45
4.1.2. Caracterização química das frações por HPLC.....	45
4.2. Atividade antiviral.....	47
4.2.1. Preparação das soluções para testes.....	47
4.2.2. Cultivo celular e vírus.....	47
4.2.3. Avaliação da citotoxicidade.....	48

4.2.4.	Avaliação da atividade antiviral.....	49
4.2.4.1.	Extração do RNA total e produção do cDNA (RT).....	49
4.2.4.2.	Quantificação por PCR em tempo real (qPCR).....	50
5.	Resultados.....	51
5.1.	Análise química.....	51
5.1.1.	Análise cromatográfica das frações.....	51
5.1.2.	Isolamento de compostos.....	53
5.2.	Análise biológica.....	54
5.2.1.	Ensaio de citotoxicidade.....	54
5.2.1.1.	Coloração.....	54
5.2.1.2.	Contagem de células.....	55
5.2.2.	RT-qPCR a partir do sobrenadante.....	56
5.2.2.1.	Extrato metanólico bruto.....	58
5.2.2.2.	Frações.....	59
5.2.2.3.	Substâncias isoladas.....	62
6.	Discussão.....	63
7.	Referências.....	69

1. Introdução

De acordo com dados da UNAIDS (Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS), aproximadamente 37,9 milhões de pessoas no mundo estão vivendo com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). É um vírus conhecido por sua patogenicidade e pela capacidade em levar o paciente a ser propenso a diversas outras doenças devido à deficiência do sistema imune. Atualmente, ainda não há vacina para o HIV. A natureza da infecção do vírus, pela sua habilidade em invadir o sistema imune, e a sua propensão para gerar variantes, constituem as maiores dificuldades no desenvolvimento de uma vacina contra o HIV. Os medicamentos já existentes não eliminam por completo o vírus do organismo e precisam ser administrados durante toda vida, além de apresentarem uma série de efeitos colaterais prejudiciais ao paciente.

A necessidade da descoberta de tratamentos alternativos tem levado pesquisadores à busca por novas moléculas, cada vez mais constante, em diferentes organismos vivos, principalmente nos vegetais superiores. Plantas de caráter medicinal ainda foram pouco exploradas quanto a sua capacidade em fornecer compostos que possuam atividade antiviral. *Hypericum connatum* demonstrou possuir efeito inibitório frente ao vírus da imunodeficiência felina (FIV) (SCHMITT; RAVAZZOLO; VON POSER, 2001) tornando-se um importante objeto de estudo.

FIV apresenta similaridades relativas à estrutura molecular, propriedades de replicação viral e à patogenicidade do HIV, e devido a isso foi utilizado neste estudo como modelo experimental para o HIV. Este trabalho propõe a avaliação da atividade antiviral de *Hypericum connatum* através da quantificação de carga viral por PCR em tempo real, complementando estudos anteriores do grupo de pesquisa. Para tanto, foram analisados o extrato metanólico bruto e frações obtidas em solventes de polaridades crescentes e, a partir disso, compostos isolados das frações que demonstraram resultados positivos, em busca da(s) substância(s) ativa(s) de *Hypericum connatum* que apresente(m) atividade inibitória da replicação viral de FIV.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade de extratos e substâncias isoladas de *Hypericum connatum* frente ao FIV como modelo experimental para o HIV.

2.2. Objetivos específicos

- I. Análise química de *Hypericum connatum*.
- II. Caracterizar as frações obtidas por HPLC.
- III. Isolamento de substâncias presentes na fração mais ativa.
- IV. Avaliar a toxicidade de extratos, frações e substâncias isoladas nas células permissíveis ao vírus.
- V. Quantificar a inibição da replicação viral em células infectadas pelo FIV e tratadas com os extratos, frações e substâncias isoladas, através da técnica de Transcriptase Reversa seguida de PCR em tempo real (RT-qPCR).

3. Revisão da literatura

3.1. Vírus da Imunodeficiência Felina

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) pertence à família *Retroviridae*, e ao gênero *Lentivirus*. Foi isolado e descrito pela primeira vez, em 1986, na Califórnia, de gatos domésticos (*Felis catus*) que exibiam sinais de imunodeficiência e eram soronegativos para o vírus da leucemia felina (FeLV) (TANIWAKI; FIGUEIREDO; ARAUJO JR, 2013). O FIV é um patógeno de gatos domésticos, também encontrado em outras espécies da família *Felidae* (O'BRIEN et al., 2012) e causa uma infecção similar a causada pelo HIV em humanos, podendo induzir a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (KENYON; LEVER, 2011).

Atualmente, as variantes de FIV estão agrupadas em sete subtipos (A-F, U-NZenv), baseados na análise da sequência de nucleotídeos do gene *gag* e do gene *env* das regiões variáveis 3-5 (BACHMANN et al., 1997; HAYWARD; TAYLOR; RODRIGO, 2007; SZILASI et al., 2019). Os subtipos A, B e C são encontrados em todos os continentes. A maior parte dos isolados obtidos até hoje são categorizados como subtipos A ou B. No Brasil, o subtipo B é o mais frequentemente identificado (MARTINS et al., 2018). Desde a descoberta, estudos mostraram que a prevalência mundial da infecção por FIV varia de 1% a 44%, determinada através de avaliações sorológicas, sendo a mais alta encontrada no Japão (ISHIDA et al., 1989). No Brasil, existem poucos estudos relacionados à prevalência de FIV. Nos estados analisados, a prevalência está entre 2% e 37,5% (CALDAS et al., 2000; TEIXEIRA et al., 2007). Os gatos infectados não exibem sinais clínicos específicos e alguns podem se manter assintomáticos por toda a vida (TANIWAKI; FIGUEIREDO; ARAUJO JR, 2013).

Os *Lentivirus* são envelopados, possuem genoma de RNA fita simples e, como todos os retrovírus, possuem uma enzima denominada transcriptase reversa (RT), a qual gera um DNA a partir do genoma viral – o provírus – e este se integra no genoma do hospedeiro (STICKNEY; DUNOWSKA; CAVE, 2013). A ampla

heterogeneidade molecular do FIV, relatada nos subtipos do vírus identificados ao redor do mundo, e a alta capacidade de promover mutações sob pressões imunológicas, farmacológicas ou ambientais são características inerentes aos lentivírus (TEIXEIRA; JUNIOR; HAGIWARA, 2010).

FIV e HIV são os dois únicos lentivírus que causam perda seletiva de células T CD4⁺, conseqüentemente levando à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (LECOLLINET; RICHARDSON, 2008).

3.1.1. Partícula viral e genoma

O FIV é um vírus envelopado, com aproximadamente 100 nm de diâmetro, esférico e seu genoma contém duas fitas simples de RNA não complementares. Possui um comprimento de aproximadamente 9.400 pares de bases e contém três grandes fases de leitura aberta (ORFs) que são características dos retrovírus, sendo estas correspondentes aos genes *gag*, *pol* e *env*, além de diversas pequenas ORFs contendo genes regulatórios e acessórios. Os retrovírus são capazes de integrar seu material genético no genoma do hospedeiro, gerando o DNA proviral, o qual ainda possui duas longas repetições terminais (LTR) contendo elementos indispensáveis para a iniciação da transcrição viral e replicação. As poliproteínas Gag, Pol e Env, são processadas por proteases, dando origem às principais proteínas do capsídeo, enzimas virais e glicoproteínas do envelope, respectivamente (MILLER et al., 2018; STICKNEY; DUNOWSKA; CAVE, 2013).

A montagem do FIV, como todos os outros lentivírus, ocorre na membrana plasmática de células infectadas como o resultado da multimerização da poliproteína Gag em vírions, e então são liberados no meio extracelular por brotamento. Simultaneamente à produção do vírion, a poliproteína Gag do FIV é processada pela protease viral codificada por *pol* (PR) gerando proteínas estruturais do interior das partículas maduras, como a matriz (MA), capsídeo (CA) e nucleocapsídeo (NC).

A proteína Pol do FIV inclui as enzimas virais: protease (PR), transcriptase reversa (RT), responsável por transcrever o RNA genômico em DNA proviral, e a integrase (IN), enzima que irá integrar o DNA proviral no genoma da célula hospedeira. No entanto, *pol* também codifica uma proteína adicional, a Pirofosfatase desoxiuridina (DU). A DU reduz o dUTP intracelular, prevenindo a incorporação errada de dUTP ao invés de dTTP durante o processo de transcrição reversa, o que minimiza a acumulação de mutações no DNA proviral. A protease de FIV é um homodímero funcional que processa os precursores de Gag e Gag-Pol em proteínas estruturais e enzimas do vírion maduro (GONZÁLEZ; AFFRANCHINO, 2018).

O gene *env* codifica proteínas glicosiladas de superfície (SU) e transmembrana (TM), que envolvem a partícula viral. Exibem uma variação considerável na sequência de aminoácidos, com 5 regiões principais variáveis em SU (V1-V5) e 3 em TM (V6-V8). As glicoproteínas Env dos retrovírus são importantes porque estão envolvidas em interações do receptor com as células, portanto determinando o tropismo do vírus. Além disso, exerce atividade de fusão da membrana, envolvida na penetração do vírus, e são os primeiros alvos para anticorpos e outros efetores de função imune. Por estarem envolvidas no reconhecimento do vírus pelo sistema imune do hospedeiro, estão sujeitas à seleção positiva, o que resulta na ampla variabilidade na sequência de nucleotídeos. (BENDINELLI et al., 1995; ELDER et al., 2008).

FIV e HIV codificam os mesmos três genes principais, descritos acima, além dos genes acessórios *vif* (fator de infectividade viral) e *rev* (regulador da expressão viral). Além destes, HIV-1 codifica quatro proteínas acessórias não encontradas em FIV através dos genes: *tat*, *vpr*, *vpu* e *nef*. No entanto, o FIV codifica um gene acessório único: *orf-A*, que pode ter funções reguladoras e transreguladoras da expressão viral como as descritas para *vpr*, *vpu* e *nef* do HIV (MCDONNELL; SPARGER; MURPHY, 2013). A comparação entre os genomas de FIV e HIV está representada na figura 1.

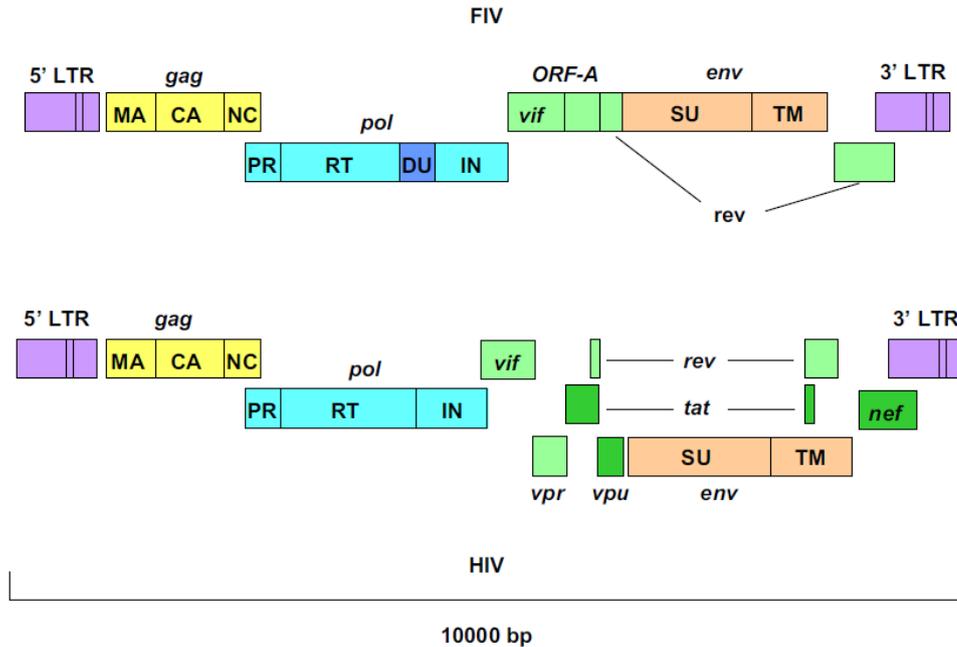


Figura 1. Organização genômica do DNA proviral de FIV e HIV. Fonte: Lecollinet, Richardson, (2008)

3.1.2. Ciclo de replicação viral

FIV tem a capacidade de infectar linfócitos, células da linhagem dos monócitos/macrófagos e células do sistema nervoso central. O vírus entra na célula através da glicoproteína do envelope viral, interagindo com receptor celular CD134 (no caso do HIV, o receptor primário é o CD4). Ocorre a exposição de um epítipo do envelope viral, o qual se ligará com alta afinidade ao co-receptor CXCR4, causando uma fusão na membrana celular e subsequentemente, o nucleocapsídeo viral será liberado para o interior do citoplasma hospedeiro. Após a entrada e o desenrolamento, o RNA fita simples é transcrito em DNA dupla fita pela enzima transcriptase reversa (RT). A atividade RNase H da RT catalisa a remoção do RNA. A RT de FIV compartilha 63% de identidade dos nucleotídeos e 67% de similaridade de aminoácidos com a RT do HIV-1.

O DNA dupla fita gerado é então transportado para o núcleo, onde irá ocorrer a integração no genoma do hospedeiro pela enzima viral Integrase (IN). O DNA proviral é, então, transcrito em mRNA e transportado para o citoplasma a fim de que ocorra a tradução do mRNA em proteínas virais. A proteína Rev irá auxiliar através do transporte do mRNA viral, e a proteína Orf A pode contribuir para a

liberação viral das células infectadas. O vírion imaturo se desloca até a membrana celular, adquire o envelope viral e as glicoproteínas e, então, é liberado da célula infectada por brotamento (KENYON; LEVER, 2011; MOHAMMADI; BIENZLE, 2012). O esquema geral de replicação viral do FIV pode ser visualizado na Figura 2.

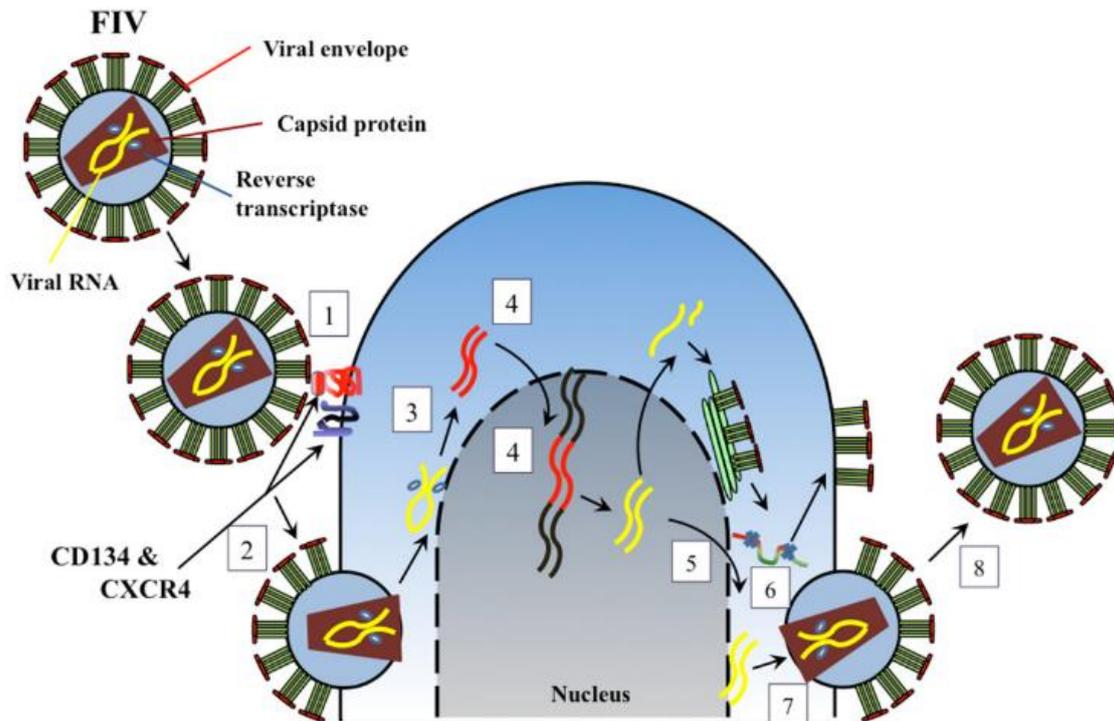


Figura 2. Representação da replicação viral de FIV; (1) Ligação do vírus aos receptores celulares; (2) Fusão viral com a membrana celular; (3) Transcrição reversa; (4) Translocação ao núcleo e integração no genoma do hospedeiro; (5) Transcrição do DNA proviral e exportação nuclear; (6) Protease viral e processamento proteico; (7) Montagem do vírion e maturação; (8) Liberação do vírion. Fonte: Mohammadi, Bienzle, (2012).

3.1.3. Patogenia FIV

Após a infecção, a replicação viral ocorre em células dendríticas, macrófagos, e linfócitos T CD4⁺. Os linfócitos T CD4⁺, também conhecidos como células T *helper* (Th) ou auxiliares, desenvolvem um papel central na função imune, tanto na resposta humoral, através da produção de anticorpos, quanto na resposta celular (TEIXEIRA; JUNIOR; HAGIWARA, 2010). A viremia é geralmente detectada na segunda semana após a infecção, com um pico entre 8 e 12 semanas, quando o vírus se espalha pelo organismo inteiro e anticorpos específicos contra as

proteínas do gene *env* (SU e TM), e as proteínas do gene *gag* (CA e MA) podem ser identificados (TANIWAKI; FIGUEIREDO; ARAUJO JR, 2013). A fase aguda da infecção por FIV dura 4 semanas aproximadamente, e é caracterizada por um aumento no número de linfócitos T CD4⁺ em circulação, assim como de RNA viral e DNA proviral.

Durante as primeiras semanas da infecção observa-se sinais clínicos leves a moderados, como febre, letargia e linfadenopatia periférica. A partir disso, se inicia uma fase assintomática prolongada, na qual os níveis de vírus circulantes permanecem estáveis e o provírus integrado estabelece um reservatório de células infectadas latentes. Gatos infectados permanecem no estágio assintomático por muitos anos, ou até mesmo pela vida inteira, com alguns sinais clínicos. Após a fase assintomática, ocorre um declínio progressivo de linfócitos T CD4⁺ com inversão na taxa CD4⁺/CD8⁺ (MILLER et al., 2018). Durante as fases terminais da infecção, os animais apresentam a síndrome da imunodeficiência adquirida felina (FAIDS), e estão sujeitos a diversas infecções oportunistas, linfomas, transtornos neurológicos, síndrome debilitante e morte (MCDONNEL; SPARGER; MURPHY, 2013). A escala de tempo da progressão da doença ocorre de forma similar à infecção por HIV-1 em humanos (KENYON; LEVER, 2011).

A prevalência do FIV varia dependendo do estado de saúde dos gatos em estudo, sendo influenciada pelo comportamento do animal. Felinos machos, com livre acesso a ambientes externos em áreas de alta densidade populacional, constituem o grupo de maior risco por estarem mais expostos a mordidas, que é a principal forma de transmissão, em brigas por demarcação territorial (BIEZUS et al., 2019; TANIWAKI; FIGUEIREDO; ARAUJO JR, 2013). A infecção do FIV também pode ocorrer por transmissão pré e pós-natal, pela mucosa através do contato sexual, e por transferência de sangue (BIENZLE et al., 2004).

3.2. FIV como modelo para HIV

FIV e HIV possuem diversas características em comum que permitem a comparação genômica, estrutural e patogênica entre ambos. Embora FIV e HIV se diferenciem em algumas características moleculares, os vírus induzem

imunopatologias semelhantes no hospedeiro natural, e portanto FIV representa um importante, e ainda subutilizado modelo animal na avaliação completa da resposta imune durante a infecção pelo *Lentivirus* (MILLER et al., 2018).

FIV e HIV compartilham um mesmo receptor utilizado para a entrada nas células alvos, o CXCR4, que, para o HIV, funciona como um co-receptor, e o torna um importante alvo para novos tratamentos (ELDER et al., 2010). Seus genomas codificam os mesmos três genes principais, *gag*, *pol* e *env*, assim como parte dos genes acessórios, como *rev* e *vif* (MCDONNELL; SPARGER; MURPHY, 2013). O alvo dos antirretrovirais são, principalmente, as enzimas codificadas pelo gene *pol*, responsáveis pela replicação viral, sendo elas a transcriptase reversa (RT), a protease (PR) e a integrase (IN) (ELDER et al., 2010).

Diversos fármacos aprovados para o tratamento de HIV foram também avaliados frente ao FIV. O mais conhecido e utilizado, zidovudina (AZT), inibe a atividade da enzima Transcriptase Reversa (RT), e quando avaliado frente ao FIV também inibiu a replicação do vírus *in vitro* e *in vivo*, aumentando a taxa de CD4/CD8 em gatos infectados experimentalmente (HARTMANN; WOODING; BERGMANN, 2015).

Uma classe de compostos antivirais chamada biciclams, vem sendo utilizada em gatos infectados por FIV e impedem a entrada do HIV ou do FIV na célula. Os fármacos aprovados para HIV didanosine (ddI) e adefovir (PMEA) também já demonstraram inibir a replicação viral de FIV, agindo sob a RT, tanto *in vitro* como *in vivo* (HARTMANN; WOODING; BERGMANN, 2015). Tenofovir foi efetivo contra o FIV *in vitro* e demonstrou menor citotoxicidade em relação a outros fármacos. Zidovudina (AZT) e lamivudina (3TC) demonstraram efeito sinérgico em cultivo celular frente ao FIV. Para fins terapêuticos, a utilização de interferon ômega recombinante de felinos (rFelFN- ω) resultou numa atenuação dos sintomas. O IFN- ω também foi descrito como um forte inibidor de infecção por HIV *in vitro*, embora o ensaio *in vivo* para pacientes humanos ainda não tenha sido avaliado (HARTMANN; WOODING; BERGMANN, 2015; MILLER et al., 2018).

Através de estudos em gatos infectados experimentalmente, é possível avaliar a eficácia de um fármaco em modelos pré-expostos, em infecções recentes, assim como em infecção crônica. Sob condições naturais, os sinais clínicos relacionados à infecção pelo FIV, assim como para o HIV, se desenvolvem após um longo período de latência que dura anos (HARTMANN; STENGEL, 2006). FIV é o único vírus de não-humanos que causa depleção progressiva das células T CD4⁺, levando a infecções oportunistas e outras manifestações, como definhamento e desordens neurológicas (ECKSTRAND; SPARGER; MURPHY, 2017).

3.3. Terapia antirretroviral

Antivirais são compostos que interferem em uma ou mais etapas do ciclo de replicação viral. Após estudos descrevendo a interação entre o vírus e a célula, foram identificadas as diversas etapas em que o ciclo viral pode ser interrompido (HARTMANN; STENGEL, 2006). De acordo com a UNAIDS, 24,5 milhões de pessoas tem acesso à terapia antirretroviral (ART) (UNAIDS, 2019).

Entre os principais objetivos da terapia antirretroviral estão: alcançar e manter a supressão da viremia no plasma a um nível menor do que o encontrado na detecção dos testes atuais; potencializar a função imune em geral, aumentando a quantidade de células T CD4⁺; reduzir morbidades associadas ao HIV; melhorar a qualidade de vida e reduzir o risco de transmissão (PAU; GEORGE, 2014).

O controle da infecção pelo HIV ocorre somente em indivíduos que seguem ininterruptamente a terapia, pois a pausa na medicação leva a uma retomada da viremia (MUKHTAR et al., 2008). Um tratamento combinado deve consistir de no mínimo dois, mas preferencialmente três agentes ativos (PAU; GEORGE, 2014).

O tratamento atual utilizado no Brasil para pessoas que estão iniciando a terapia antirretroviral preconiza o uso combinado de tenofovir (TDF - inibidor de transcriptase reversa) associado à lamivudina (3TC – inibidor de transcriptase reversa) e dolutegravir (DTG – inibidor de integrase) numa dose de 300 mg/300

mg (2 em 1) e 50 mg, respectivamente, uma vez ao dia. O tratamento pode ser alterado devido a contraindicações (BRASIL, 2018).

Não existe tratamento específico para gatos portadores de FIV e geralmente se dá por conforto paliativo ao animal. O tratamento que pode ser utilizado em gatos acometidos por infecções recorrentes é o uso de análogos nucleosídeos como a zidovudina (AZT – inibidor de transcriptase reversa), que pode ser utilizado sozinho ou em combinação com outros fármacos (HARTMANN; WOODING; BERGMANN, 2015).

De acordo com a mais recente estimativa da UNAIDS, das 37,9 milhões de pessoas vivendo com HIV, apenas 79% foram diagnosticadas e apenas 53% estão em terapia efetiva. É estimado que 1% estejam vivendo sem sintomas na ausência de terapia, e apenas dois indivíduos foram curados (NDUNG; MCCUNE; DEEKS, 2019).

Embora os tratamentos atuais sejam, de forma geral, seguros, não são benignos. Risco intensificado de doenças cardiovasculares, renais e ósseas tem sido associado ao uso dos medicamentos mais comuns. Além dos efeitos adversos, o desenvolvimento de resistência e o uso ininterrupto da terapia por toda a vida são argumentos para a busca de terapias alternativas (NDUNG; MCCUNE; DEEKS, 2019).

3.3.1. Fármacos já existentes

3.3.1.1. Inibidores da entrada celular

Homólogos/antagonistas de receptores se ligam ao vírus ou ao receptor celular, levando à inibição da adsorção viral à superfície da célula. A maior parte destes é altamente seletiva para HIV, e não são utilizados pela medicina veterinária. Uma exceção é a classe de compostos antivirais biciclams, a qual vem sendo utilizada em gatos infectados por FIV. Biciclams atuam como antagonistas seletivos ao receptor CXCR4 e, ao se ligarem ao receptor, previnem a interação com outros

ligantes, impedindo a entrada do HIV ou FIV no interior celular (HARTMANN; WOODING; BERGMANN, 2015).

3.3.1.2. Inibidores de transcriptase reversa

Inibidores de transcriptase reversa são divididos em três categorias: inibidores de transcriptase reversa nucleosídeo (NRTIs), nucleotídeo (NtRTIs) e não-nucleosídeo (NNRTIs). Cada grupo de compostos bloqueia a atividade catalítica da RT viral por mecanismos levemente diferentes. Devido a seu papel essencial no ciclo de vida viral, a transcriptase reversa vem sendo um alvo bastante estudado na terapia antiviral desde a descoberta de que NRTIs são análogos aos deoxinucleotídeos (dNT), porém não possuem o grupo 3' – hidroxila (MOHAMMADI; BIENZLE, 2012).

3.3.1.2.1. NRTIs

NRTIs são metabolizados em sua forma ativa tri-fosforilada por quinases e, então, competem com dNTs para a incorporação nas fitas de DNA que estão sendo sintetizadas pela RT viral. No entanto, por não possuírem o grupo 3'- hidroxila, o próximo dNT não consegue formar ligação fosfodiéster, resultando no término da elongação do DNA. Zidovudina, mais conhecida como AZT, foi o primeiro agente NRTI aprovado para o tratamento de HIV e, desde então, outros sete NRTIs foram aprovados (HARTMANN; WOODING; BERGMANN, 2015). Estes compostos vêm sendo avaliados também *in vitro* e *in vivo* para a inibição da replicação do FIV. Zidovudina preveniu mais de 95% da replicação de FIV em células CrFKs (NORTH; NORTH; PEDERSEN, 1989). Também foi avaliada em gatos infectados, e foi relativamente bem tolerada; porém, pôde-se observar o surgimento de anemia, impedindo de ser utilizada em altas dosagens (MOHAMMADI; BIENZLE, 2012). A suscetibilidade de FIV para AZT permitiu que o modelo felino fosse utilizado para identificar a primeira mutação resistente a fármaco em lentivírus (REMINGTON et al., 1991). A fozivudina, composto precursor da zidovudina, não induziu anemia mesmo em alta dosagem, diferentemente do AZT. O fármaco apresentou efeito supressor da carga viral na fase aguda da infecção pelo FIV, mas em um período superior a quatro semanas foi associado ao desenvolvimento de resistência

(FOGLE et al., 2011). Outros fármacos inibidores de RT aprovados para o tratamento da infecção por HIV são: abacavir, stavudina, emtricitabine, lamivudine e didanosine (HARTMANN; WOODING; BERGMANN, 2015). Embora a monoterapia utilizada com NRTI tenha demonstrado redução na carga viral, e sobrevivência prolongada, o uso de apenas um agente não forneceu uma supressão viral contínua (PAU; GEORGE, 2014).

3.3.1.2.2. NtRTIs

NtRTIs são estruturalmente similares aos NRTIs, porém contêm um grupo fosfonato e não requerem fosforilação por enzimas celulares. Portanto, NtRTIs já se encontram em sua forma ativa para a incorporação na fita do DNA proviral e seu mecanismo é similar ao dos NRTIs. Tenofovir Disoproxil Fumarato (TDF) é a única droga NtRTI aprovada para pacientes com HIV (AMMARANOND; SANGUANSITTIANAN, 2012; MOHAMMADI; BIENZLE, 2012).

3.3.1.2.3. NNRTIs

NNRTIs são pequenas moléculas que não são análogas a nucleosídeos naturais e se diferenciam estruturalmente de NRTIs e NtRTIs. O sítio de ligação na enzima RT é diferente dos outros tipos de inibidores. Este se liga ao domínio perto do sítio ativo da enzima e muda sua conformação, o qual vai resultar em uma inibição não-competitiva da ação catalítica (MOHAMMADI; BIENZLE, 2012). Há três fármacos aprovados para uso clínico, sendo eles, nevirapina, delavirdina e efavirenz, inibindo somente HIV (AMMARANOND; SANGUANSITTIANAN, 2012). Outros retrovírus, como o FIV, não foram suscetíveis a esta inibição, possivelmente devido às diferenças estruturais no sítio de ligação da enzima (MOHAMMADI; BIENZLE, 2012).

3.3.1.3. Inibidores de integrase

Inibidores de integrase agem através da inibição da integração do DNA proviral, que é produzido pela transcrição reversa do RNA genômico do vírus. Raltegravir é utilizado como composto anti-HIV e mostrou também ser ativo contra

o FIV, *in vitro*. Porém, o lentivírus felino foi menos suscetível ao fármaco (HARTMANN; WOODING; BERGMANN, 2015).

3.3.1.4. Inibidores de protease

Inibidores de protease se ligam especificamente no sítio ativo da protease e, portanto, previnem a replicação viral. Tipranavir é um medicamento aprovado em 2005, e utilizado como composto anti-HIV. O fármaco se mostrou ativo contra o FIV *in vitro*, prevenindo completamente a replicação do vírus. Lopinavir e atazanavir são outros compostos anti-HIV; porém, apesar de se mostrarem ativos contra o FIV *in vitro*, não impediram completamente a replicação viral. (HARTMANN; WOODING; BERGMANN, 2015). Até o ano de 2019, não houve estudos *in vivo* de inibidores de protease em gatos infectados por FIV.

3.3.2. Desenvolvimento de resistência

A extensa variabilidade genética de FIV e HIV, constitui um mecanismo de escape viral que permite sua rápida adaptação ao sistema imunológico e aos antirretrovirais (SILVA et al., 2016). As variações das cepas surgem no estágio do ciclo de replicação dos vírus e é dada pela natureza errática da transcriptase reversa dos lentivírus (LECOLLINET; RICHARDSON, 2008). Apesar da eficácia dos regimes antirretrovirais, alguns pacientes podem enfrentar falha de tratamento pela resistência do HIV às substâncias. Transmissão de HIV resistente a fármacos pode ocorrer, sendo recomendável um teste genotípico de resistência antes do início da terapia (PAU; GEORGE, 2014).

Há, aproximadamente, 25.000 pacientes vivendo com HIV nos Estados Unidos infectados com cepas resistentes a múltiplos fármacos, incluindo uma estimativa de 12.000 pacientes em necessidade vital de novas opções de tratamento devido à falha de regimes anteriores (BECCARI et al., 2019). Em um estudo realizado pela OMS, em 2012, foram coletados dados de diversas pesquisas realizadas sobre a resistência viral a medicamentos anti-HIV. Nos 4.248 pacientes avaliados, o tratamento em 573 falhou no período de 12 meses, representando 13,5% do total de pacientes. Entre os casos que falharam, 60% foram documentados como

resistentes ao HIV originário da infecção inicial e 40% apresentaram resistência a vírus de reinfecções. As mutações mais comuns encontradas foram aos NRTI (detectadas em 55% dos pacientes avaliados) e aos NNRTI (46%) (HOSSEINIPOUR et al., 2013).

Nos medicamentos NRTI, a baixa fidelidade da enzima RT e a alta taxa de replicação viral permite o aumento de mutações. A maior limitação ao tratamento com NNRTIs é o rápido desenvolvimento de mutantes resistentes. Uma única mutação poderá causar um alto nível de resistência, podendo ser cruzada entre todos os medicamentos NNRTIs (AMMARANOND; SANGUANSITTIANAN, 2012).

O escape viral a fármacos inibidores de protease é mediado por mutações ocorridas pela substituição de aminoácidos, as quais irão resultar em uma diminuição da ligação ao inibidor de protease (AMMARANOND; SANGUANSITTIANAN, 2012).

O desenvolvimento de resistência pode estar relacionado a diversos fatores. Se a produção viral não está suprimida pela ação dos fármacos antivirais, qualquer erro ocorrido no genoma do HIV pode resultar numa ampla população de quasiespécies, algumas resistentes. Também pode ocorrer através da desaminação da citidina (que limita a replicação viral) e resistência a múltiplas drogas por recombinação *de novo* do genoma do vírus. A negligência por parte do paciente durante a terapia devido a descontinuidade, pela absorção ou metabolismo inadequado do fármaco ou ainda, por interações com outros fármacos, contribuem para o desenvolvimento de resistência. A estimativa da probabilidade em acumular resistência na terapia antiviral num período de seis anos é de 27% (WAHEED; TACHEDJIAN, 2016).

O desenvolvimento de resistência pode ser avaliado por teste fenotípico *in vitro*, medindo a suscetibilidade do antirretroviral em cultivo celular (concentração que inibe a replicação de HIV-1 em 50% - IC50) e por teste genotípico, através de sequenciamento dos genes da protease, RT e/ou integrase, provenientes de produtos de PCR amplificado (CLUTTER et al., 2016).

3.4. Uso de plantas medicinais

Plantas medicinais vêm sendo utilizadas desde a origem da civilização humana. O primeiro interesse reconhecido no desenvolvimento de agentes antivirais ocorreu pela companhia Boots, em 1952, na Inglaterra, onde 288 plantas foram analisadas quanto à atividade anti-influenza (MUKHTAR et al., 2008).

Diversos compostos naturais demonstraram possuir ação inibitória em transcriptase reversa, protease e integrase. Estes são representados principalmente por flavonoides, alcaloides, taninos, cumarinas, terpenoides e outros, sendo a maior parte destes os flavonoides, seguidos pelos terpenoides. Muitos deles apresentam inibição eficiente em RT, PR e IN ao mesmo tempo (JIANG et al., 2010). Metabólitos secundários constituem quase 50% dos novos fármacos introduzidos no mercado farmacêutico de 1981 até 2010 e, aproximadamente, 75% dos agentes anti-infecciosos são produtos naturais ou derivados (ALVES et al., 2014).

O estudo de plantas medicinais é bastante promissor, porém enfrenta alguns desafios. A acessibilidade da planta em questão, a coleta, documentação correta, e a identificação botânica são alguns deles. Enquanto que uma pequena quantidade da planta é suficiente para uma avaliação farmacológica inicial, quantidades muito maiores são necessárias para a caracterização completa da atividade farmacológica e de seus constituintes, principalmente em posteriores ensaios clínicos e comercialização. Além disso, a composição química da planta pode variar em relação à estação do ano, composição do solo, altitude, clima, entre outros, e pode haver alterações pelas condições de armazenamento, método de extração e isolamento (ATANASOV et al., 2015).

Alguns dos fármacos derivados de plantas aprovados para uso mais conhecidos são: a artemisinina, lactona sesquiterpênica isolada de *Artemisia annua* para tratamento da malária; a galantamina, alcaloide isolado de *Galanthus caucasicus* para tratamento da doença de Alzheimer; o paclitaxel (Taxol), diterpeno isolado de *Taxus brevifolia* para tratamento do câncer (ATANASOV et al., 2015; KOEHN; CARTER, 2005).

3.4.1. Produtos naturais frente ao FIV e HIV

O caráter terapêutico de plantas tem sido atribuído aos extratos das plantas, e às substâncias isoladas e caracterizadas através de análises fitoquímicas.

Os extratos aquosos brutos das espécies *Parietaria difusa*, *Urtica dioica* e *Sambucus nigra* foram testados frente ao FIV em células CrFKs. Os resultados obtidos utilizando o extrato de *Urtica dioica* e princípios ativos derivados da mesma planta foram similares (UNCINI MANGANELLI; ZACCARO; TOMEI, 2005). A Lectina N-acetilgalactosamina de *Urtica dioica* inibiu a formação de sincício em células HUT-78 e células CD4⁺ Molt/4 infectadas por HIV-1 e HIV-2 (BALZARINI et al., 1992). O extrato bruto aquoso de *U. dioica*, em concentrações não tóxicas, apresentou atividade anti-FIV. O extrato bruto aquoso de *Sambucus nigra* também apresentou atividade anti-FIV, diferente de duas lectinas isoladas da mesma planta que foram testadas frente ao HIV, indicando que no extrato há diferentes compostos que podem levar à inibição de FIV (BALZARINI et al., 1992; UNCINI MANGANELLI; ZACCARO; TOMEI, 2005).

O extrato clorofórmico bruto da alga verde *Caulerpa taxifolia* foi testado por sua atividade antiviral. O extrato demonstrou atividade frente ao FIV *in vitro*, reduzindo o sincício induzido pelo vírus em CrFKs, a atividade da transcriptase reversa e a expressão da proteína do capsídeo viral P24 (NICOLETTI et al., 1999).

Um alcaloide indólico diprenilado, isolado de *Glycosmis montana*, exibiu atividade anti-HIV e indicou que esses alcaloides podem ser candidatos para estudos futuros como agentes anti-HIV (SINGH; BODIWALA, 2010). Taninos também demonstraram possuir atividade frente ao HIV. Punicalina, isolada do extrato aquoso de *Terminalia triflora*, apresentou atividade inibitória na transcriptase reversa de HIV-1 (MARTINO et al., 2004). O ácido mussaenosídico (2'-O-(4-methoxycinnamoyl), um terpenoide da classe dos iridoides, isolado de *Avicenna marina*, mostrou efeito inibitório na ligação de HIV-1 na membrana celular *in vitro* (BEHBAHANI, 2014).

Compostos promissores como agentes anti-HIV são os calanolídeos. Calanolídeo A e cumarinas relacionadas isoladas de diversas espécies de *Calophyllum*, representam um subgrupo de não-nucleosídeos inibidores de transcriptase reversa (NNRTI) (JIANG et al., 2010). Calanolídeos (A, B e C) são dipiranocumarinas que possuem três centros de carbonos quirais. Estudos com transcriptases reversas purificadas de bactérias recombinantes revelaram que esses calanolídeos são inibidores da RT de HIV-1, inclusive para resistentes a AZT, incluindo a cepa A17, conhecida pela resistência a diversos medicamentos (HASSAN et al., 2016). Calanolídeo A completou a fase I/II do teste clínico em combinação com outros agentes anti-HIV, não apresentando atividade contra HIV-2, tipo encontrado principalmente na África. O estudo mostrou que o calanolídeo A possui um perfil seguro para animais e humanos, pois os efeitos adversos observados foram de leves a moderados em intensidade, como tonturas e náuseas (HASSAN et al., 2016; JIANG et al., 2010).

Piranocumarinas, como a pseudocordatoídeo C e calanolídeo F, outros compostos isolados de *Calophyllum*, também apresentaram atividade anti-HIV (VENUGOPALA; RASHMI; ODHAV, 2013). Cordatolide A e B apresentam estrutura similar aos Calanolídeos, inibindo a replicação viral de HIV-1. Além destes, suksdorfin, um composto derivado de pirocumarina, apresentou efeitos inibitórios à replicação viral (KURAPATI et al., 2016).

3.4.2. Flavonoides

Flavonoides compreendem um grande grupo de metabólitos secundários amplamente distribuído na natureza, sendo comumente encontrados em vegetais, frutas, sementes, temperos, troncos, assim como em vinhos e chás. Esses compostos são sintetizados em resposta a condições de estresses abióticos, como a radiação ultravioleta, e possuem um importante papel na defesa contra patógenos de plantas e insetos (ZAKARYAN et al., 2017).

A primeira evidência de atividade biológica foi reportada por Albert Szent-Gyorgyi em 1938, mostrando que flavonoides de cascas de frutos cítricos preveniam sangramento capilar e sua fragilidade associada ao escorbuto. Nas

últimas décadas, houve um aumento pelo interesse nos flavonoides (PEREZ-VIZCAINO; FRAGA, 2018). Pesquisas envolvendo flavonoides foram principalmente baseadas na capacidade antioxidante desses compostos e a relevância pressuposta da deterioração de radicais livres de sistemas biológicos e sua associação com doenças (PEREZ-VIZCAINO; FRAGA, 2018).

Existem mais de 6000 diferentes estruturas de flavonoides identificados até o momento. Estes são divididos em diversas classes como as antocianidinas, flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonoides, etc, como mostra a figura 3. A variedade de classes dos flavonoides difere no nível de oxidação e no padrão de substituição do anel pireno, e compostos individuais entre as classes se diferem pelo padrão de substituição de anéis benzenos (ZAKARYAN et al., 2017).

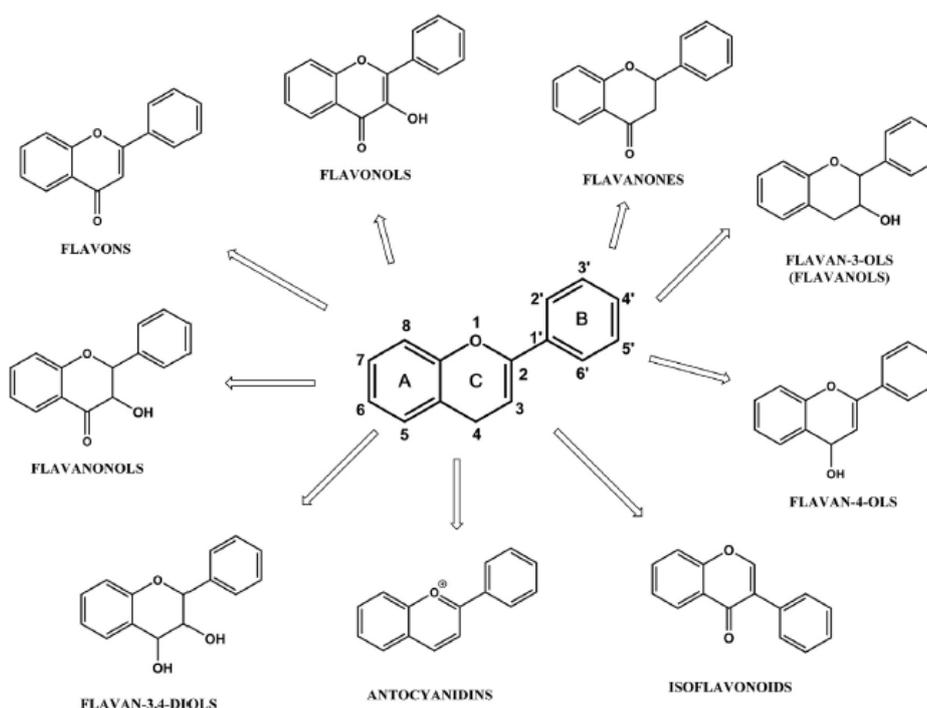


Figura 3. Estrutura básica de flavonóide e suas diferentes classes. Fonte: Raffa et al., (2017)

Flavanonóis, compostos que apresentam um grupo OH na posição C-3', como a taxifolina, mostraram atividade anti-HIV-1 inibindo protease, RT e a interação CD4/gp120, se ligando ao loop V3 da gp120. Flavanonas, que não possuem o grupo OH na posição C-3', como aromadendrina, são mais específicas

e inibem somente a interação CD4/gp120 (JIANG et al., 2010; KURAPATI et al., 2016).

Flavanóis são uma família de flavonoides cujos principais representantes são as catequinas e as epicatequinas. Estão presentes em grandes quantidades em plantas de alto consumo como o chá verde, o chá preto, uvas e vinhos, cacau e chocolate. Baicalina, uma flavona isolada de *Scutellaria baicalensis*, inibiu a infecção e replicação de HIV-1. Outros flavonoides como a robustaflavona e a hinokiflavona também demonstraram atividade contra a transcriptase reversa de HIV-1 (KUMAR; PANDEY, 2013). Outro estudo relatou a inibição da entrada de HIV-1 nas células e atividade contra a RT pela flavona O-glicosilada baicalina (LI et al., 2000).

Já entre os flavonóis, a quercetina foi a que mais atraiu atenção entre a comunidade científica devido a sua ampla distribuição no reino vegetal e sua variedade de aplicações (PEREZ-VIZCAINO; FRAGA, 2018). Entre as atividades já estudadas, quercetina possui efeito antiproliferativo *in vitro* contra diversas células de câncer de próstata (RAFFA et al., 2017), fazendo parte de ensaios clínicos para o tratamento de câncer de próstata, de doença pulmonar obstrutiva crônica, de diabetes mellitus, obesidade, entre outros (ATANASOV et al., 2015). A quercitrina (quercetina-3-O-ramnosídeo) (Figura 4), glicosídeo formado a partir da quercetina e do açúcar desoxi-ramnose, demonstrou atividade frente à RT de HIV-1 (YU et al., 2007). Outro derivado de quercetina, o hiperosídeo (Figura 5) também demonstrou atividade antiviral *in vitro* e *in vivo* frente ao vírus da hepatite B (HBV) (WU et al., 2007).

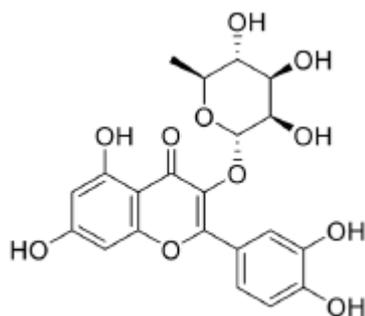


Figura 4. Estrutura da quercitrina.

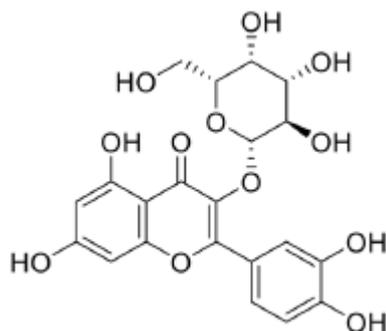


Figura 5. Estrutura do hiperosídeo.

3.4.3. Atividades biológicas de espécies do gênero *Hypericum*

O gênero *Hypericum*, da família *Hypericaceae*, inclui aproximadamente 500 espécies de ervas, arbustos e árvores com numerosos efeitos positivos na saúde (DRESLER et al., 2018). Apesar do amplo número de espécies do gênero, *H. perforatum* tem sido a espécie mais estudada quanto a seus constituintes químicos e suas atividades farmacológicas.

São relatados diversos membros da família *Hypericaceae* que são utilizados na medicina tradicional para tratar, por exemplo, feridas, hepatite, caxumba, distúrbios gastrointestinais e tumores. Muitos compostos desta família já foram isolados para o estudo de suas atividades antivirais (FRITZ et al., 2007). O efeito terapêutico de plantas *Hypericum* está relacionado à presença de diversos compostos bioativos, incluindo os derivados de floroglucinol (como, por exemplo, hiperforina) (BRIDI; MEIRELLES; VON POSER, 2018), flavonoides (como a rutina, hiperosídeo, quercetina, quercitrina), ácidos fenólicos (como o ácido clorogênico), taninos, xantonas, naftodiantronas (hipericina e *pseudo*-hipericina) e constituintes do óleo essencial (VELINGKAR; GUPTA; HEGDE, 2017).

A atividade antidepressiva de algumas espécies de *Hypericum* é bastante conhecida e relatada por diversos autores. Estudos *in vitro* e *in vivo* apontam a hiperforina, como o principal responsável por essa atividade (TIAN et al., 2014).

Extratos metanólicos provenientes de *H. mysorense* e *H. hookerianum* eliminaram a infecção por HSV-1 *in vitro* (VIJAYAN et al., 2004). Hipericina e *pseudo*-hipericina são antraquinonas isoladas do gênero *Hypericum*, e

demonstraram ação antiviral em vírus de RNA e DNA envelopados e não envelopados (HUDSON; LOPEZ-BAZZOCCHI; TOWERS, 1991; TANG et al., 1990). Quercitrina isolada de *H. scruglii* também demonstrou ação frente à RT e atividade da RNase H de HIV-1 *in vitro* (SANNA et al., 2018).

3.4.3.1. *Hypericum connatum*

Hypericum connatum (Figura 6), conhecida popularmente como “orelha-de-gato”, é uma erva ou subarbusto, que possui ocorrência natural no sul e sudeste do Brasil, sul da Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai (FRITZ, 2006). É utilizado tradicionalmente como “tônico” e adstringente e também no tratamento de lesões orais, as quais são frequentemente causadas pelo vírus da Herpes. Alguns dos princípios ativos são os flavonoides, luteoforol, guaijaverina, hiperosídeo e amentoflavona (AKRAM et al., 2018).

O extrato metanólico de *H. connatum*, assim como frações e substâncias isoladas, como o luteoforol, demonstraram ação frente ao vírus do herpes simples (HSV-1) (FRITZ et al., 2007). A atividade antiviral do extrato metanólico de *Hypericum connatum* frente ao FIV foi demonstrada por SCHMITT e colaboradores (SCHMITT; RAVAZZOLO; VON POSER, 2001).



Figura 6. *Hypericum connatum*. Fonte: Jiménez, (1980).

4. Materiais e métodos

4.1. Material Vegetal

4.1.1. Coleta e preparação do material vegetal de *Hypericum connatum*

As partes aéreas (ramos e flores) de *H. connatum* foram coletadas em São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, no mês de novembro de 2017. A planta foi identificada por Dr. Sergio Bordignon (UNILASSALE, Brasil) e um comprovante foi depositado no herbário ICN da UFRGS (comprovante: Bordignon et al. 3317). Após a coleta, o material vegetal foi separado de impurezas, seco em temperatura ambiente por sete dias e em ambiente arejado, e triturado em moinho de facas.

Primeiramente, foi obtido um extrato metanólico bruto. Para tanto, foram pesados 30 g da planta e imersos em 100 mL de metanol. A cada 24 horas o extrato obtido era filtrado para um balão e o solvente evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotativo (Fisatom model 802), e o solvente do recipiente renovado. Assim foi repetido até não haver aumento de massa extraída pelo metanol. Os extratos foram reunidos e levados à secura em evaporador rotativo.

O fracionamento bioguiado foi realizado utilizando solventes de polaridade crescente, sendo eles: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Foram pesados 30 g de *H. connatum* e imersos em 100 mL do solvente, pelo mesmo método extrativo descrito acima.

4.1.2. Caracterização química das frações por HPLC

A análise das frações acetato de etila e metanol (que resultaram ativas no fracionamento bioguiado) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi realizada seguindo o método descrito em Tatsis et al. (2007) e Ccana-Ccpatinta et al. (2014) com algumas modificações. As separações foram executadas utilizando um cromatógrafo líquido Shimadzu (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) e os dados cromatográficos processados por LC solution software versão 1.24 SP2. Antes da análise, os extratos foram dissolvidos em metanol (grau HPLC) e filtrados

em membrana 0,22 µm. As separações foram executadas em uma coluna C 18 Waters Nova-Pack (4 µm, 3.9 mm x 150 mm) adaptadas a uma coluna de guarda C 18 60 A (3.9 mm x 20 mm) (Waters, Milford, MA, USA). As fases móveis consistiram de uma mistura de água (A) e uma mistura 8:2 de acetonitrila e metanol (B), ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico. O gradiente de eluição foi executado da seguinte forma: gradiente linear de 10% de B a 100% de B por 30 minutos, seguido por reequilíbrio por 20 minutos. Todas as separações foram realizadas a 25 °C com uma taxa de fluxo de 1.0 mL/min com detecção executada a 220 e 350 nm, em triplicata. Uma alíquota de 10 µL por amostra foi injetada. Os compostos foram identificados comparando o tempo de retenção (t_R) de picos dos padrões e picos das amostras. Em casos de dúvida, amostras foram co-eluídas com os compostos padrão a fim de confirmar a identidade das amostras. Curvas de calibração foram preparadas utilizando o composto hiperosídeo, cobrindo no mínimo cinco pontos de dados na concentração variando de 1 – 250 µg/mL ($r^2 = 0.9989$). As soluções foram injetadas em triplicata, em três dias diferentes e cada curva foi obtida traçando o pico da área do composto a cada nível versus a concentração da amostra.

4.1.3. Isolamento de substâncias

Para o isolamento da substância desejada, uma nova fração acetato de etila foi extraída de *H. connatum*, a fim de obter maior quantidade da mesma. A extração foi realizada a partir de 150 g das partes aéreas, eluídas em 500 mL de diclorometano, para remoção de substâncias indesejáveis. Posteriormente, foram adicionados 500 mL de acetato de etila. O processo foi repetido, renovando-se o solvente até o esgotamento. Os extratos provenientes de acetato de etila foram reunidos e levados à secura no evaporador rotativo. A fração acetato de etila foi submetida a uma cromatografia em coluna de gel de sílica (0.060 - 0.200 mm; Merck) como fase estacionária. A fração foi adicionada sobre o topo da coluna e em seguida eluída empregando uma mistura de solventes com polaridade crescente, iniciando por diclorometano e terminando em uma mistura de acetato de etila e metanol (80:20) gerando 50 frações (Fr. 1-50). As frações 21 a 40 foram agrupadas (265 mg) e submetidas à purificação cromatográfica por coluna, nas mesmas condições descritas acima. As frações obtidas em ambos processos foram

monitoradas por cromatografia em camada delgada, sendo a fase móvel uma mistura de acetato de etila: metanol: H₂O (100: 13,5: 10, V/V/V). A detecção dos compostos foi realizada mediante observação sob lâmpada de luz ultravioleta com comprimentos de onda de 254 e 365 nm e visualização após reação com agente cromogênico anisaldeído-sulfúrico, com posterior aquecimento a 100 °C, utilizando padrão para comparação. A identidade do composto isolado foi confirmada por análise de HPLC, nas mesmas condições do item 4.1.2, comparando o tempo de retenção com uma amostra padrão de quercitrina (Sigma).

4.2. Atividade antiviral

4.2.1. Preparação das soluções para testes

A solubilização do extrato e das frações foi realizada pela adição de DMSO em uma concentração máxima de 0,06%, como descrita anteriormente como concentração máxima não tóxica, e completada pela adição fracionada de meio de cultivo celular DMEM (descrito no item 4.2.2.) sem adição de soro fetal bovino (SFB). A concentração-mãe para todas as solubilizações foi 10 mg/mL. As soluções foram filtradas em membrana 0,22 µm e conservadas em alíquotas à – 20°C.

Foram pesados 50 mg do extrato metanólico bruto, adicionados 10 µL de DMSO e quantidades fracionadas (500 µL) de DMEM sem SFB até atingir 5 mL, gerando a concentração final de 10 mg/mL. As frações foram solubilizadas em 300 µL de DMSO para 50 mg de cada fração e adicionados 5 mL de forma fracionada à solução. A solubilização dos compostos isolados foi realizada a partir de 5 mg da substância, adicionando 30 µL de DMSO e 500 µL de DMEM sem SFB.

4.2.2. Cultivo celular e vírus

Foram utilizadas células da linhagem CrFK (ATCC/CCL-94 - células provenientes de rim felino *Felis catus*) permissíveis ao vírus, as quais foram cultivadas em frascos de cultivo celular de 25 cm² contendo meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - Sigma Chemical Co. St. Louis, USA), suplementadas com

5% SFB, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, em uma atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, a 37 °C. Após serem tripsinizadas e contadas, foram congeladas em nitrogênio líquido, a fim de obter um estoque de células.

O vírus utilizado neste trabalho (clone infeccioso de FIV Petaluma – 34TF10) foi transfectado anteriormente em CrFKs pelo reagente Lipofectamina (HEPP, 2017). Os estoques do vírus foram preparados a partir da infecção de culturas de células CrFK, incubadas com o vírus por 5 dias a 37 °C, congeladas a – 80 °C, descongeladas e centrifugadas para clarificação. O sobrenadante foi filtrado, dividido em alíquotas e congelado a – 80 °C.

4.2.3. Avaliação da citotoxicidade

Para avaliar a toxicidade dos extratos e das substâncias isoladas frente às CrFKs, as células foram tripsinizadas e semeadas em uma placa de cultivo celular contendo 96 poços em uma quantidade de 10⁴ células por poço. A placa foi então armazenada a 37 °C por 24 horas. Após o período, o meio de cultivo da placa foi retirado e foram adicionados 200 µL de meio DMEM por poço contendo as concentrações do material vegetal. Como controle do ensaio foram mantidas células apenas com DMEM 5% SFB. A avaliação inicial foi realizada nas concentrações de 100; 75; 50 e 25 µg/mL de meio e a placa incubada a 37 °C por 72 h. O teste foi realizado em quadruplicata. Passadas 72 h, o sobrenadante foi retirado e feita a coloração do tapete celular pelo kit Panótico Rápido (LABORCLIN) a fim de visualizar o efeito citotóxico frente às CrFKs, com o auxílio de um microscópio ótico. A citotoxicidade foi avaliada quanto à integridade do tapete celular e eventuais alterações fenotípicas. As duas maiores concentrações que apresentaram pouca ou nenhuma citotoxicidade, foram submetidas a um novo teste, realizado em placas de 24 poços a fim de se obter um resultado quantitativo. Nas placas de 24 poços, foram adicionadas 4x10⁴ células por orifício. Após 24 horas a 37 °C, o meio de cultivo da placa foi retirado e foram adicionados 1 mL de meio DMEM por poço contendo as concentrações do material vegetal. Como controle do ensaio foram mantidas células apenas com DMEM 5% SFB e o teste realizado em quadruplicata. Após transcorridas as 72 h a 37 °C, a placa foi

tripsinizada, e as células contadas, comparando com a quantidade obtida no controle do ensaio.

4.2.4. Avaliação da atividade antiviral

A avaliação da atividade antiviral dos extratos e substâncias isoladas foi realizada em placas de cultivo celular de 24 poços, onde em cada orifício foram semeadas 4×10^4 células em meio de cultivo DMEM 5% SFB. Após 24 horas mantida a 37 °C, em 5% CO₂, o meio de cultivo do sobrenadante foi descartado e a placa lavada com PBS. Então foram adicionados 150 µL do sobrenadante do estoque viral + 300 µL de DMEM em cada poço, exceto nos designados para o controle de células, onde foram adicionados somente 450 µL de DMEM. A placa foi mantida por 2 horas a 37 °C para a adsorção viral. Após decorrido o tempo, o sobrenadante foi descartado e adicionado 1 mL de DMEM contendo os extratos e substâncias isoladas com as concentrações definidas para cada ensaio. No controle viral e no controle de células foi adicionado 1 mL de DMEM sem a adição do material vegetal. As concentrações utilizadas para cada ensaio são provenientes da maior concentração que não apresentou toxicidade no teste de citotoxicidade em placas de 24 poços. As concentrações foram: para o extrato metanólico bruto – 25; 12,5; 6,25 e 3,12 µg/mL; para a fração hexano – 75; 50; 25 e 12,5 µg/mL; fração acetato de etila – 25 e 12,5 µg/mL; fração diclorometano e fração metanólica – 75 e 50 µg/mL; quercitrina – 25 µg/mL e hiperosídeo – 50 µg/mL. O teste foi realizado em quadruplicata. Para os ensaios com as substâncias isoladas, foi utilizado como controle positivo o AZT, em uma concentração de 5 µM, como descrito por BISSET *et al.* (2002). As placas foram mantidas por 4 dias a 37 °C. Após o período, o sobrenadante da placa foi coletado em microtubos mantidos refrigerados para posterior quantificação viral. A placa foi corada e avaliada qualitativamente quanto à presença de efeito citopático e morte celular, e se houve diminuição do efeito do vírus quando adicionado o material vegetal.

4.2.4.1. Extração do RNA total e produção do cDNA (RT)

Após o período de incubação, o sobrenadante da placa foi retirado, e realizada a etapa de clarificação. Os tubos foram centrifugados a 8.500 g por 20

minutos e, após transferir o sobrenadante para novos tubos, novamente centrifugado a 12.500 g por 60 minutos em centrífuga refrigerada. Os pellets obtidos pela centrifugação foram submetidos à extração do RNA viral pelo reagente Fastzol (Quatro G), utilizando 500 µL do reagente para cada *pool* de quatro poços. O RNA viral foi ressuspendido em 12,5 µL de H₂O e armazenado em – 80 °C. O RNA foi transcrito para cDNA pela técnica de RT, na qual em cada reação foram adicionados 5 µL do RNA viral obtido na extração, *primers* de sequências aleatórias e os demais reagentes seguindo o protocolo do fabricante (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Applied Biosystems). A RT foi realizada nas seguintes condições: um ciclo de 10 minutos a 25 °C, um ciclo de 2 horas a 37 °C, e, logo após, mais 5 minutos a 80 °C, seguido pela etapa de resfriamento.

4.2.4.2. Quantificação por PCR em tempo real (qPCR)

Após a obtenção do cDNA, o mesmo foi quantificado pela técnica de PCR em tempo real (qPCR), sendo o SYBR™ Green a plataforma utilizada para a detecção. Para isto, foram feitas reações contendo 1 µL do produto da RT, juntamente com 1 µL de uma solução a 10 µM de cada *primer* senso (5'- GAA AGA ATT CGG GAA ACT GGA A-3') e antisense (5'- TGG AGG TGC AGA TGG CAT TA-3') específicos para o gene *gag*, projetados com o *software* Primer Express, versão 3.0 (Applied Biosystems) e 1 µL de H₂O. O restante da reação de qPCR foi realizada de acordo com o protocolo (Power SYBR™ Green PCR Master Mix, Applied Biosystems) para reações de 20 µL. Todas as reações foram realizadas em duplicatas. Para a quantificação, foi utilizada uma curva padrão representando o número de cópias de pFIV. O pFIV, já quantificado anteriormente, foi diluído até se obter uma concentração de 10⁶ cópias/µL, a partir de cálculo realizado através do site da Thermo Fisher (THERMO FISHER, 2017) e, a partir disso, foram obtidas diluições de base 10 e acrescentados 2 µL na reação de qPCR. Para o experimento, foram utilizadas as diluições de 10¹ a 10⁶ cópias/µL. No controle negativo da reação, foram acrescentados 2 µL de H₂O. A PCR em tempo real foi realizada nas seguintes condições: 10 minutos a 95 °C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C, finalizando pela curva de *melting*: 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C e 15 segundos a 95 °C.

5. Resultados

Após a obtenção do extrato metanólico bruto, o mesmo foi avaliado quanto a sua atividade antiviral. O fracionamento bioguiado, como será descrito em detalhes a seguir, indicou as frações acetato de etila e metanólica como as mais promissoras quanto à atividade antiviral, determinada após a quantificação de partículas virais no sobrenadante do cultivo celular infectado, por PCR em tempo real (qPCR). Análises cromatográficas mostraram a quercitrina como composto majoritário das frações e, por isso, foi isolada e avaliada quanto a sua capacidade de inibir a replicação viral *in vitro*. Hiperosídeo, um dos compostos presentes nas frações, também foi avaliado frente ao FIV, utilizando uma amostra da substância disponível no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia – UFRGS.

5.1. Análise química

5.1.1. Análise cromatográfica das frações

A observação do comportamento cromatográfico da fração acetato de etila indica um acúmulo de compostos fenólicos. Por CCD, foi possível observar a presença de compostos com características semelhantes a flavonoides, principalmente pelo aparecimento de coloração amarelo-esverdeada, após revelação com o agente cromogênico anisaldeído-sulfúrico. As frações acetato de etila (FA) e metanol (FM) foram submetidas a análises por HPLC, a fim de quantificar o conteúdo de flavonoides e obter o perfil cromatográfico de cada fração. Os compostos quercitrina e hiperosídeo foram majoritários em ambas frações, como mostram a tabela 1 e a figura 7. Na FA, a quercitrina foi o composto majoritário, abrangendo 11,22% do conteúdo da fração. Na FM, quercitrina também foi o composto mais abundante, porém em uma quantidade menor, 2,45% do conteúdo da fração, enquanto que o hiperosídeo representou 1,51%. Esses resultados indicam que a quercitrina é mais solúvel no acetato de etila do que o hiperosídeo, que foi mais abundante na fração metanol. Também foi caracterizada, por comparação com amostras autênticas, a presença dos compostos isoquercitrina, quercetina e ácido clorogênico em ambas frações. Por ser o

composto mais abundante em ambas as frações, quercitrina foi submetida ao isolamento da fração acetato de etila para posterior avaliação da atividade antiviral.

Tabela 1. Conteúdo dos compostos avaliados nas frações acetato de etila e metanol

	HPLC t_R (min)	Conteúdo (%) ^a	
		FA	FM
Ácido clorogênico	4.83	+	+
Rutina	12.23	nd	nd
Hiperosídeo	12.35	0.96 ± 0.02	1.51 ± 0.10
Isoquercitrina	12.54	1.00 ± 0.05	0.60 ± 0.05
Guajaverina	13.13	nd	nd
Quercitrina	13.53	11.22 ± 0.86	2.45 ± 0.16
Quercetina	16.20	1.17 ± 0.10	0.26 ± 0.02
Luteolina	16.80	nd	nd

^a - mg do composto / 100 mg do extrato seco;
Nd - não detectado; + - presença.

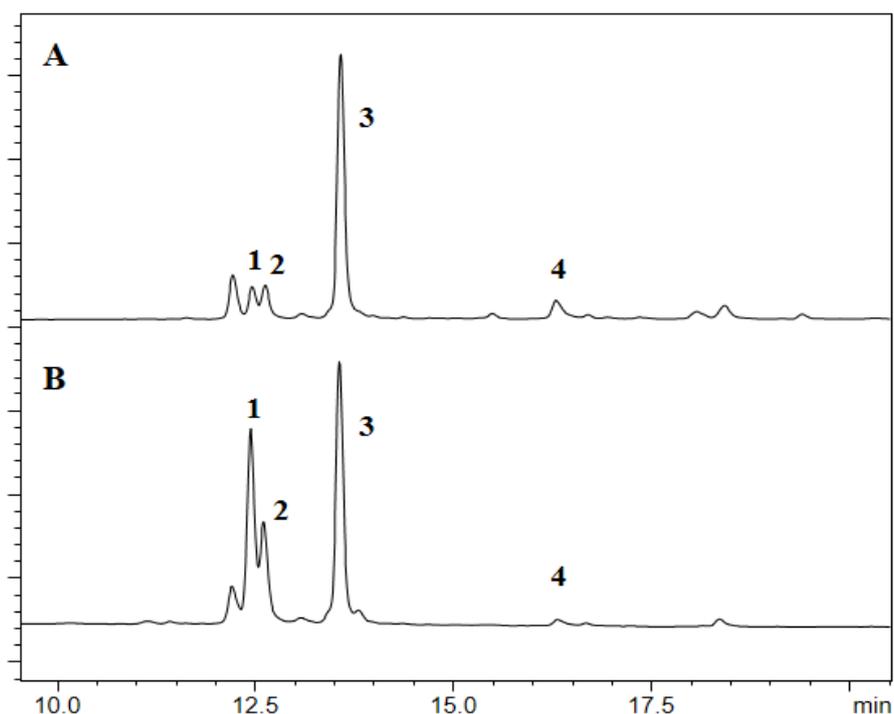


Figura 7. Perfis cromatográficos representativos dos principais compostos avaliados na fração acetato de etila (A) e fração metanol (B). 1 – hiperosídeo; 2 – isoquercitrina; 3 – quercitrina; 4 – quercetina.

5.1.2. Isolamento de compostos

Da fração acetato de etila obtida de *Hypericum connatum*, 1,3 g foram submetidos à coluna cromatográfica a fim de isolar o composto quercitrina, que demonstrou ser o composto majoritário da fração. Ao total, foram obtidas 50 frações utilizando misturas de solventes de polaridade crescente, sendo eles: diclorometano, acetato de etila e metanol. A separação dos compostos foi realizada até a mistura de acetato de etila: metanol estar 80: 20. Por CCD, as amostras foram sendo monitoradas quanto a presença de quercitrina, comparando ao padrão. Das 50 frações, foram agrupadas a fração 21 até a fração 40 (265 mg). Uma nova coluna cromatográfica foi realizada a fim de purificar a substância. Foram obtidas 20 frações, que foram analisadas por CCD, comparando ao padrão de quercitrina. As frações 6-9 apresentaram, de forma aparente, a maior pureza. Por análise de HPLC, foi confirmado a presença de apenas quercitrina, como demonstrado na figura 8, utilizando padrões de diferentes flavonoides. A fração 7 (7 mg) foi a que se mostrou mais pura, sendo então, submetida aos ensaios de atividade antiviral.

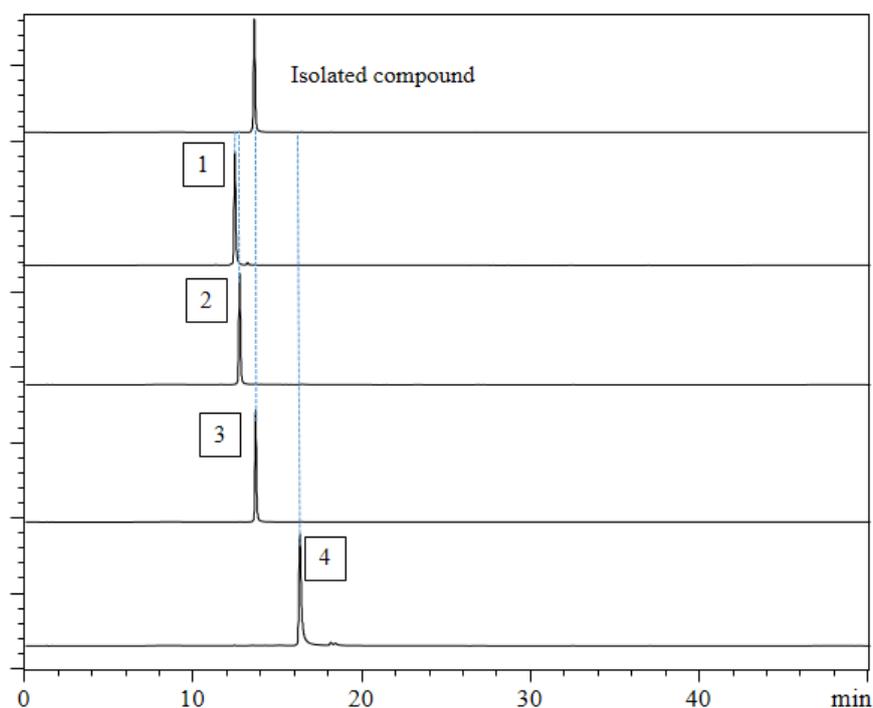


Figura 8. Cromatogramas do composto isolado e dos compostos padrão. 1 - hiperosídeo; 2 - isoquercitrina; 3 - quercitrina; 4 - quercetina.

5.2. Análise biológica

5.2.1. Ensaios de citotoxicidade

Transcorridas 72 horas da inoculação das amostras em estudo, a citotoxicidade frente às CRFKs foi avaliada pela visualização de alteração na morfologia e morte celular, e ainda pela contagem de células.

5.2.1.1. Coloração

Um ensaio piloto de citotoxicidade foi realizado utilizando 4 concentrações (100; 75; 50 e 25 µg/mL) de cada amostra em uma placa de 96 poços. Visualmente a menor concentração, 25 µg/mL, do extrato metanólico bruto (EMB) apresentava certa toxicidade para as CrFKs, então as concentrações 25 e 12,5 µg/mL foram submetidas ao novo ensaio para determinar a concentração máxima tolerada (CMT). Nos ensaios utilizando as frações, as concentrações que apresentaram pouca, ou nenhuma toxicidade foram: 50 e 75 µg/mL para a fração hexano (FH) 75 e 50 µg/mL para a fração diclorometano (FD), 25 e 12,5 µg/mL para a fração acetato de etila (FA) e 75 e 50 µg/mL para fração metanólica (FM). E no caso das substâncias isoladas, as concentrações foram 50 e 25 µg/mL para quercitrina e para o hiperosídeo, respectivamente. A coloração de todas as placas foi realizada pelo kit panótipo e a figura 9 representa os níveis de toxicidade dos materiais vegetais frente às CrFKs. As concentrações que apresentaram pouca, ou nenhuma toxicidade foram submetidas a novos ensaios para determinar a CMT.

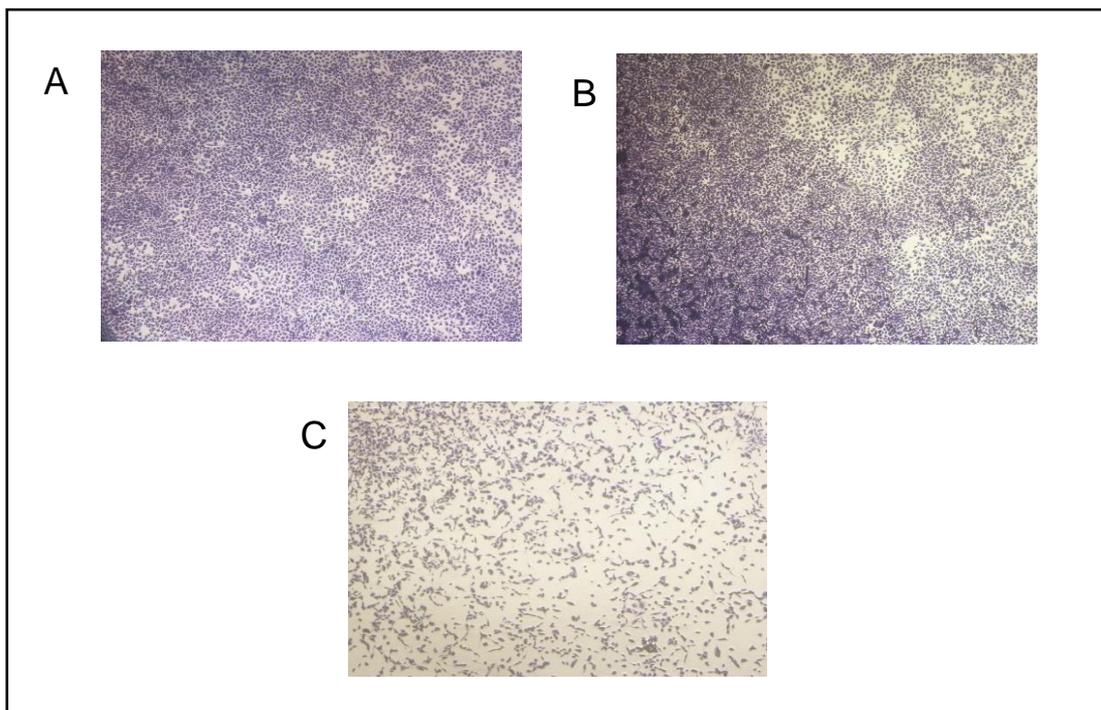


Figura 9. Fotos representativas da citotoxicidade das substâncias frente às CrFKs. A – Controle; B – Citotoxicidade intermediária; C – Citotóxico.

5.2.1.2. Contagem de células

Um novo teste com os materiais vegetais foi realizado utilizando placas de 24 poços, a fim de avaliar quantitativamente a toxicidade e determinar a CMT a ser utilizada na avaliação da atividade antiviral. A quantidade de células obtida para cada extrato, fração e substância isolada estão na tabela 2. Deste modo, a concentração 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de EMB foi submetida aos ensaios de avaliação da atividade antiviral. Da mesma forma, as CMTs obtidas para as frações foram: 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para a FA e 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para FH, FD e FM e para as substâncias isoladas foram: 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para quercitrina e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para hiperosídeo.

Tabela 2. Citotoxicidade das amostras vegetais. EMB = extrato metanólico bruto; FH = fração hexano; FD = fração diclorometano; FA = fração acetato de etila; FM = fração metanol.

Material vegetal	Concentração	Quantidade de células	Quantidade de células do controle da placa
EMB	25 µg/mL	1×10 ⁶	1,1×10 ⁶
EMB	12,5 µg/mL	1×10 ⁶	1,1×10 ⁶
FH	50 µg/mL	8×10 ⁵	9,8×10 ⁵
FH	75 µg/mL	9,2×10 ⁵	9,8×10 ⁵
FD	50 µg/mL	9×10 ⁵	8,7×10 ⁵
FD	75 µg/mL	8,4×10 ⁵	8,7×10 ⁵
FA	12,5 µg/mL	8,5×10 ⁵	8,7×10 ⁵
FA	25 µg/mL	8,9×10 ⁵	8,7×10 ⁵
FM	50 µg/mL	9,6×10 ⁵	9,5×10 ⁵
FM	75 µg/mL	9,3×10 ⁵	9,5×10 ⁵
Quercitrina	25 µg/mL	5,5×10 ⁵	5,3×10 ⁵
Quercitrina	50 µg/mL	3,8×10 ⁵	5,3×10 ⁵
Hiperosídeo	25 µg/mL	5,8×10 ⁵	5×10 ⁵
Hiperosídeo	50 µg/mL	5,1×10 ⁵	5×10 ⁵

5.2.2. RT-qPCR a partir do sobrenadante

A finalidade do ensaio é avaliar a inibição da replicação viral e para isso, quantificar a liberação de partículas virais no sobrenadante do cultivo celular infectado. Transcorridos os 4 dias de incubação com os extratos, frações e substâncias à 37 °C, o sobrenadante foi coletado e clarificado. Após a extração do RNA viral, o mesmo foi submetido à transcrição reversa (RT) para gerar o cDNA. A fim de quantificar o número de partículas virais em cada amostra, estas foram submetidas à PCR em tempo real (qPCR), e comparadas ao controle viral obtido em cada ensaio (células infectadas e não tratadas). Para a quantificação, foi utilizada uma curva padrão equivalente ao número de cópias de pFIV, representando diluições de 10⁶ a 10¹ cópias/µL. A curva padrão obtida está representada na figura 10.

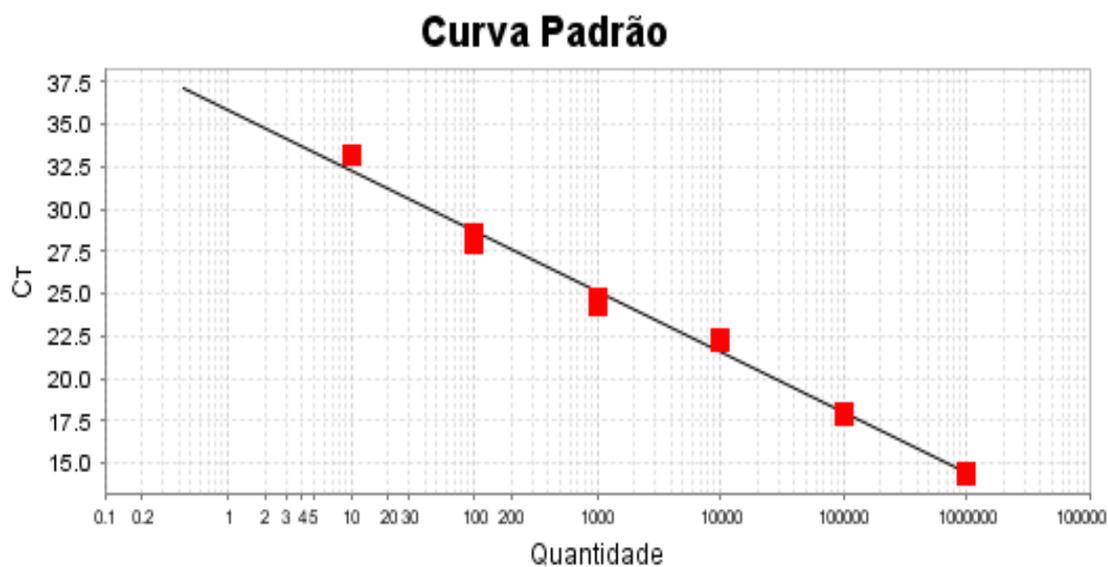


Figura 10. Curva padrão da PCR em tempo real. Valor de $R^2 = 0,991$; Slope = $-3,574$.

Além da quantificação de partículas virais do sobrenadante, também foi avaliada a presença de efeito citopático (CPE) causado pelo FIV e a possível redução do mesmo devido à adição do material vegetal. A figura 11 traz a comparação entre o tapete celular do controle de células e o tapete celular após a inoculação do vírus.

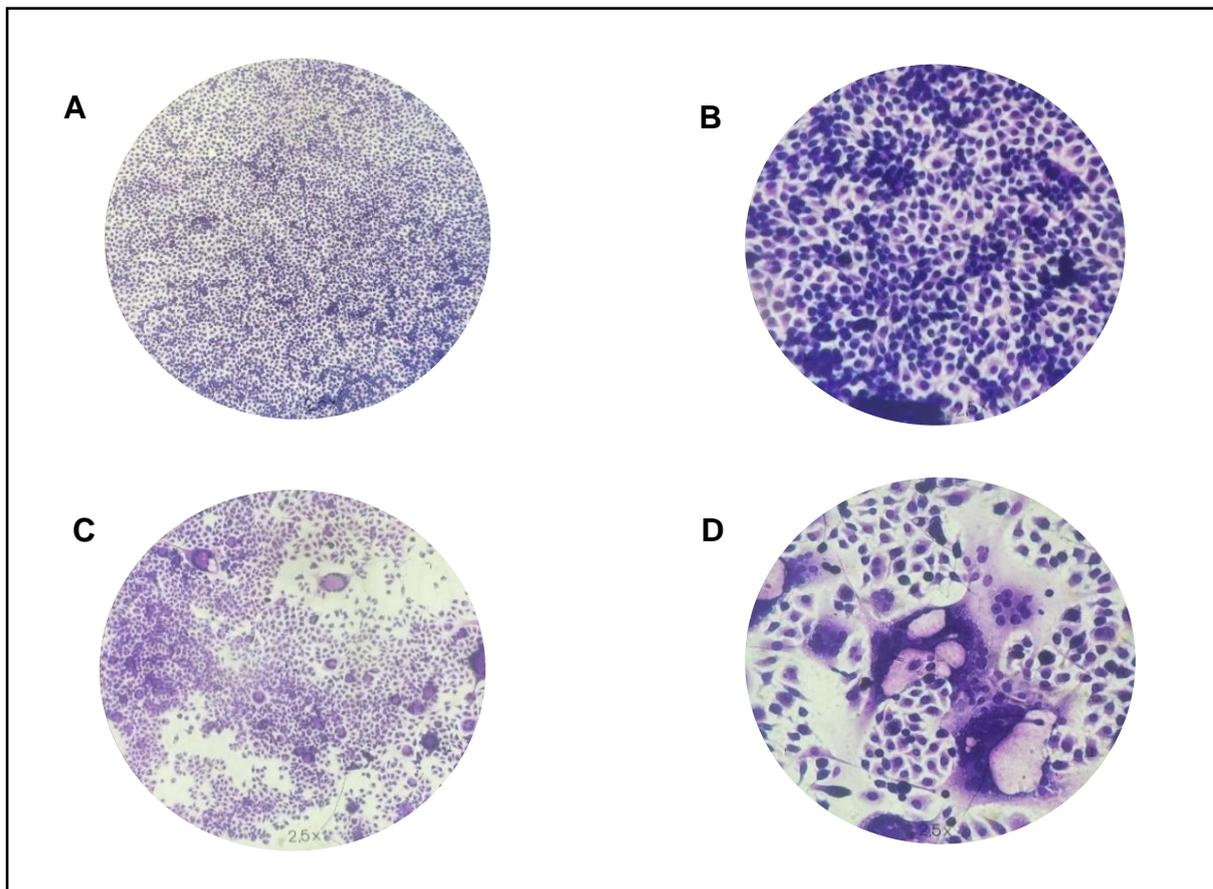


Figura 11. Efeito citopático causado pelo vírus nas CrFKs. A/B – Controle de células (aumento 100 x /400 x). C/D – CrFKs inoculadas com FIV (aumento 100 x /400 x).

5.2.2.1. Extrato metanólico bruto

O extrato metanólico bruto foi submetido à avaliação da atividade antiviral nas concentrações de 25; 12,5; 6,25 e 3,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As quantidades médias de partículas virais, o C_t e a redução do número das partículas em relação ao controle viral estão na tabela 3. Na concentração de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ houve uma redução de 2431 x em relação ao controle viral. À medida que a concentração do extrato diminuía, a quantidade do número de cópias de FIV aumentava. Na concentração de 3,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pôde-se observar uma redução de 3 x em relação ao controle viral. A avaliação qualitativa da inibição da replicação viral foi realizada através da visualização de CPE da placa corada, caracterizado por formação de sincício e morte celular. Pôde ser visualizado o aparecimento de células multinucleadas em todas as concentrações do extrato, porém houve uma aparente diminuição de CPE. Este resultado demonstra que EMB foi capaz de reduzir a replicação viral, sendo um potencial agente frente ao FIV. Deste modo, suas frações correspondentes foram avaliadas em novos ensaios antivirais.

Tabela 3. PCR em tempo real do extrato metanólico bruto.

Concentração	Quantidade de partículas virais (média)	C_t (média)	Redução em comparação ao controle viral
25 µg/mL	22	34	2431 x
12,5 µg/mL	77	32	695 x
6,23 µg/mL	2914	27	18 x
3,12 µg/mL	15911	24	3 x
Controle viral	53495	22	-
Controle células	54	33	-

5.2.2.2. Frações

A fração hexano foi submetida à avaliação da atividade antiviral nas concentrações de 75; 50; 25 e 12,5 µg/mL. As quantidades médias de partículas virais, o C_t e a redução do número das partículas em relação ao controle viral estão na tabela 4. De forma geral, o tratamento com a fração não demonstrou atividade inibitória da replicação viral. A maior redução ocorreu na concentração de 12,5 µg/mL, sendo ela de 1,3 x. Não houve redução aparente do efeito citopático do vírus nas células tratadas pelo extrato. Devido a isto, FH não foi submetida a novos ensaios antivirais.

Tabela 4. PCR em tempo real da fração hexano

Concentração	Quantidade de partículas virais (média)	C_t (média)	Redução em comparação ao controle
75 µg/mL	15037	24	-
50 µg/mL	1305	28	1,1 ×
25 µg/mL	19507	24	-
12,5 µg/mL	1167	28	1,3 ×
Controle viral	1497	28	-
Controle células	-	-	-

As frações diclorometano (FD) e metanol (FM) foram avaliadas em um mesmo ensaio antiviral. As quantidades médias de partículas virais, o C_t e a redução do número das partículas em relação ao controle viral estão na tabela 5. FD, avaliada nas concentrações de 50 e 75 µg/mL, foi capaz de reduzir em 12 × a carga viral em relação ao controle na concentração de 50 µg/mL. Em concentração maior, de 75 µg/mL, foi observado menor redução. Ao final do experimento, as células foram contabilizadas e, na concentração de 75 µg/mL, foram contadas 13,8×10⁵ células, enquanto que no controle viral foram contadas 16,5×10⁵ células. Na concentração de 50 µg/mL foram contabilizadas 14,8×10⁵ células. FM foi avaliada nas concentrações de 50 e 75 µg/mL. Em sua maior concentração, de 75 µg/mL, pôde-se constatar uma diminuição de 1466 × em relação ao controle viral, sendo detectadas apenas 4 partículas. Na menor concentração, 50 µg/mL, houve detecção de 7 partículas virais, o que representou uma redução de 838 × em relação ao controle viral. A fração metanol, apesar da inibição viral, também apresentou toxicidade frente às CrFKs no experimento em questão. Na concentração de 75 µg/mL foram contabilizadas 10,4×10⁵ células ao final do experimento. Na concentração de 50 µg/mL foram contabilizadas 12,6×10⁵ células, devendo ser considerado a citotoxicidade em relação ao controle de células, que apresentou 20,4×10⁵ células, e ao controle viral, que apresentou 16,5×10⁵ células ao final do experimento.

Tabela 5. PCR em tempo real das frações diclorometano (FD) e metanol (FM).

Concentração	Quantidade de partículas virais (média)	C_t (média)	Redução em comparação ao controle
FD – 75 µg/mL	1911	25	3 x
FD – 50 µg/mL	487	28	12 x
FM – 75 µg/mL	4	36	1466 x
FM – 50 µg/mL	7	35	838 x
Controle viral	5866	24	-
Controle células	-	-	-

A fração acetato de etila (FA) foi avaliada nas concentrações de 25 e 12,5 µg/mL. No mesmo ensaio, o extrato metanólico bruto também foi incluído, nas concentrações de 25 e 12,5 µg/mL, como um controle positivo da reação, pois anteriormente demonstrou atividade inibitória. Os resultados estão na tabela 6. Em sua maior concentração, de 25 µg/mL, FA foi capaz de reduzir em 7809 x a carga viral em relação ao controle, sendo detectadas apenas 6 partículas virais. Na concentração de 12,5 µg/mL constatou-se uma redução de 414 x na quantidade de partículas virais. Este resultado foi maior do que o encontrado pelo tratamento com EM que, neste experimento, reduziu em 318 x a carga viral. De forma aparente, houve redução de CPE causado pelo FIV nas CrFKs, quando comparado ao controle. Ao final do experimento, FA não apresentou citotoxicidade em relação aos controles, como foi verificado na FM.

Tabela 6. PCR em tempo real da fração acetato de etila (FA)

Concentração	Quantidade de partículas virais (média)	C_t (média)	Redução em comparação ao controle
FA – 12,5 µg/mL	113	30	414 x
FA – 25 µg/mL	6	35	7809 x
EMB – 12,5 µg/mL	147	29	318 x
EMB – 25 µg/mL	206	29	227 x
Controle viral	46852	21	-
Controle células	-	-	-

5.2.2.3. Substâncias isoladas

As substâncias isoladas, quercitrina e hiperosídeo, foram avaliadas nas concentrações de 25 e 50 µg/mL, respectivamente. Neste ensaio, foram utilizados como controle positivo o AZT, que já demonstrou possuir atividade frente ao FIV em CrFKs, e FA, que anteriormente apresentou atividade inibitória da replicação viral. O tratamento com AZT foi realizado na concentração de 5 µM, concentração não tóxica de acordo com o estudo feito por BISSET *et al.* (2002), e a concentração de 25 µg/mL para FA. A maior redução da replicação viral foi verificada no tratamento com a quercitrina, que reduziu em 9 x a quantidade de partículas virais no sobrenadante. Hiperosídeo reduziu em 6 x e o AZT em 4 x. Visualmente, AZT apresentou toxicidade frente às CrFKs. Não foi possível notar uma redução de CPE em nenhum dos tratamentos.

Tabela 7. PCR em tempo real das substâncias isoladas – quercitrina e hiperosídeo

Concentração	Quantidade de partículas virais (média)	C_t (média)	Redução em comparação ao controle
Hiperosídeo – 50 µg/mL	356	28	6 x
Quercitrina – 25 µg/mL	213	28	9 x
AZT – 5 µM	491	27	4 x
FA – 25 µg/mL	248	28	8 x
Controle viral	1997	25	-
Controle células	-	-	-

6. Discussão

A atividade antiviral de diversos extratos vegetais já foi demonstrada em estudos *in vitro* (UNCINI MANGANELLI; ZACCARO; TOMEI, 2005) (NICOLETTI et al., 1999) (VIJAYAN et al., 2004) (FRITZ et al., 2007). Frações do extrato metanólico de *Hypericum perforatum* demonstraram ação antiviral frente ao citomegalovírus (HCMV) *in vitro* (AXARLIS et al., 1998), assim como frente ao HIV-1 (BIRT et al., 2009). A maior parte dos estudos com *Hypericum* atribui sua atividade antiviral à hipericina e *pseudo*-hipericina, visto que estas substâncias se mostraram ativas frente a vírus de RNA e DNA, envelopados e não envelopados (HUDSON; LOPEZ-BAZZOCCHI; TOWERS, 1991; TANG et al., 1990). Entretanto, esse grupo de compostos não está presente nas espécies de *Hypericum* nativas do Brasil. Assim, a atividade antiviral determinada para *H. connatum* pode ser atribuída a outros compostos, como flavonoides e taninos (SCHMITT; RAVAZZOLO; VON POSER, 2001).

Espécies do gênero *Hypericum* são caracterizadas pela ocorrência de compostos fenólicos, incluindo substâncias apolares (floroglucínóis, xantonas, benzopiranos), bem como substâncias polares (flavonoides, taninos, ácidos fenólicos) (BERNARDI, 2007; DALL'AGNOL et al., 2003; NÖR et al., 2004). Observa-se, no gênero *Hypericum*, um acúmulo de flavonoides, principalmente dos derivados de quercetina, podendo estar associados as suas atividades biológicas. Os mais comuns detectados são rutina, hiperosídeo, isoquercitrina, quercitrina e quercetina. As flores foram identificadas como um dos principais locais de acúmulo destes compostos (AYAN; ÇIRAK; YANAR, 2006; BERNARDI et al., 2008).

Este trabalho apresenta um fracionamento bioguiado de *Hypericum connatum* a partir dos ensaios antivirais com o extrato metanólico bruto, ou seja, diferentes frações foram testadas e selecionadas a partir dos resultados obtidos em bioensaios. O método escolhido para a determinação da inibição da replicação viral de FIV foi a PCR em tempo real (qPCR), uma ferramenta quantitativa que é eficientemente utilizada para pesquisa e diagnóstico, pois fornece o número absoluto de cópias para um alvo específico, através do uso de uma curva padrão

com quantidades conhecidas do vírus (Figura 10). É uma técnica de alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade (NAVARRO et al., 2015).

Diversos trabalhos utilizando CrFKs como alvo de estudo para antirretrovirais frente ao FIV já foram publicados (BALZARINI et al., 1992; NICOLETTI et al., 1999; UNCINI MANGANELLI; ZACCARO; TOMEI, 2005). A ação de FIV frente às CRFKs, na infecção viral, mostrou formação de grandes sincícios, com núcleos aglomerados no centro do citoplasma, além da característica morte celular (Figura 11). Também foi observada uma pequena formação de sincício no controle de células sem vírus, como já descrita a possibilidade por Tozzini et al (1992).

Como citado anteriormente, o extrato metanólico de *H. connatum* já demonstrou possuir atividade frente ao FIV em células CrFK (SCHMITT; RAVAZZOLO; VON POSER, 2001). O propósito deste trabalho, então, foi solidificar os resultados obtidos utilizando qPCR, a fim de obter o número absoluto de cópias de FIV para cada ensaio e compará-los ao controle viral. Para tanto, o extrato metanólico bruto foi obtido e avaliado em quatro concentrações (diluições seriadas), de 25 a 3 µg/mL, quanto à sua atividade viral. Em sua maior concentração EMB foi capaz de reduzir em 2431 x a carga viral. Em menores concentrações houve um declínio da inibição de replicação viral, como era esperado (efeito dose).

A partir do resultado anterior, se sucedeu o fracionamento bioguiado. Quatro frações de *H. connatum* foram obtidas utilizando solventes de polaridade crescente. Teoricamente, essas frações apresentam o conteúdo do extrato metanólico bruto. A primeira fração, a mais apolar, obtida com hexano, é estudada por sua abundância de floroglucinois, compostos polifenólicos e lipofílicos que possuem atividade biológica bastante elucidada e estão presentes no gênero *Hypericum* (BRIDI; MEIRELLES; VON POSER, 2018). No entanto, frente ao FIV, esta não demonstrou atividade antiviral. Além disto, foi encontrado resultados atípicos entre as concentrações, já que o C_t obtido para o controle viral foi menor do que o obtido para duas concentrações. Essa divergência pode ser causada por alguma imprecisão na solubilização, na extração do RNA, ou ainda FH pode favorecer a replicação do vírus. A fração diclorometano, na concentração de 50 µg/mL reduziu em 12 x a carga viral, indicando que pode conter algum composto, em pequena

quantidade, ou com fraca atividade inibitória frente ao vírus. A inibição foi maior na concentração de 50 µg/mL ao invés na de 75 µg/mL, possivelmente ocorrida porque a concentração de 75 µg/mL apresentou maior toxicidade às células ao final do experimento, o que pode afetar a inibição viral.

A fração acetato de etila, de *H. connatum*, foi descrita por Fratianni e colaboradores anteriormente como altamente ativa frente a bactérias gram-positivas e negativas, possivelmente pela presença de ácido cafeico no extrato (FRATIANNI et al., 2013). Em outro estudo, a fração acetato de etila de *H. perforatum*, composta por hiperosídeo, quercitrina, isoquercitrina e hipericina, inibiu o vírus da bronquite infecciosa (IBV) (CHEN et al., 2019). Frente ao FIV, na concentração de 25 µg/mL, FA foi capaz de reduzir em 7809 x a carga viral em relação ao controle, e foram detectadas apenas 6 cópias do vírus. Este resultado mostra FA como a fração mais promissora para evidenciar a substância ativa da planta contra o vírus. A fração metanol também foi ativa frente ao FIV, reduzindo em 1466 x o número de cópias do vírus e sendo detectadas somente 4 partículas virais. Apesar do número de partículas detectadas ser menor do que a encontrada pelo tratamento por FA, a carga viral total detectada no controle de FIV também foi menor, o que explica a diferença no valor de redução. Neste ensaio porém, de forma inesperada, FM apresentou toxicidade às células ao final do experimento em relação aos controles, o que pode ter afetado na inibição viral.

Por CCD, foi possível visualizar um acúmulo de compostos fenólicos e com características semelhantes a flavonoides, através do aparecimento de coloração amarelo-esverdeada. Sendo as frações acetato de etila e metanol as mais promissoras frente ao FIV, ambas foram submetidas a análise por HPLC. Os perfis cromatográficos obtidos das frações indicam a presença dos seguintes flavonoides: hiperosídeo, quercitrina, isoquercitrina e quercetina. Além destes, a presença de ácido clorogênico pôde ser detectada, porém, pela falta de um padrão, não foi quantificado. Quercitrina e hiperosídeo foram os compostos majoritários de ambas frações, sendo que a quercitrina representou mais de 11% do conteúdo da fração acetato de etila, o que indica uma maior solubilidade de quercitrina por um solvente mais apolar que o metanol, no caso o acetato de etila, ao contrário do hiperosídeo.

A análise química das frações metanol e acetato de etila corrobora outros trabalhos de *H. connatum* (BARROS et al., 2013; DALL'AGNOL et al., 2003; SANTOS et al., 2016), porém Barros e colaboradores, encontraram apenas traços de quercitrina, em um estudo utilizando apenas as flores da planta, e Dall'agnol et al. não detectaram a presença de hiperosídeo na fração metanol, ambas sendo os compostos majoritários encontrados em FM e FA neste trabalho. A divergência de resultados pode ser devido a diferenças nos parâmetros da técnica utilizada, à baixa concentração do composto, à região da planta estudada e às mudanças edafoclimáticas, alterando o perfil fitoquímico da planta. Hiperosídeo é frequentemente isolado de espécies de *Hypericum*. Em um estudo realizado por Crockett e colaboradores, foi analisado o extrato metanólico de diversas espécies de *Hypericum* e obtiveram a presença de hiperosídeo na grande maioria, sendo o flavonoide mais repetidamente encontrado (CROCKETT; SCHANEBERG; KHAN, 2005).

Visto que houve uma maior inibição da replicação viral em FA do que em FM, a abundância de quercitrina na fração acetato de etila indica a possibilidade desta substância ser a responsável pela atividade antiviral da fração, uma vez que esta está mais presente em FA do que em FM. Em outros estudos, foi verificada a ação de quercitrina frente a funções da RT e à integrase de HIV-1 (ONO et al., 1990; SANNA et al., 2018; YU et al., 2007). Hiperosídeo não demonstrou atividade frente ao HIV-1 (SHAHAT et al., 1998).

A partir da fração acetato de etila foi isolada a quercitrina por coluna cromatográfica e sua identidade confirmada por HPLC, em comparação com uma amostra autêntica. A seguir, um ensaio antiviral foi realizado utilizando a quercitrina, uma amostra de hiperosídeo disponível no laboratório, o fármaco AZT como agente positivo da reação e a fração acetato de etila, também considerada como controle positivo. A maior inibição viral foi atribuída à quercitrina, que reduziu em 9 x a carga viral. A fração acetato de etila não repetiu os resultados obtidos anteriormente, o que pode ser devido às condições de armazenamento e manipulação da amostra ao longo do tempo. AZT era esperado que reduzisse a carga viral efetivamente da mesma forma como foi demonstrado por Bisset e colaboradores na mesma concentração de 5 µM em CrFKs (BISSET et al., 2002). Porém, foi observado uma

redução de 4 x em relação ao controle viral e apresentou toxicidade às células. Sendo assim, o teste com as substâncias isoladas será repetido utilizando novas solubilizações das amostras.

Os resultados obtidos servem como base para uma análise mais aprofundada do efeito antiviral que as partes aéreas de *H. connatum* demonstraram possuir. Testes mais específicos podem ser realizados para determinar em qual fase do ciclo de replicação viral do FIV a fração acetato de etila está atuando e qual a substância, ou substâncias, responsável pela atividade. Ensaio que quantifiquem a carga de DNA proviral e o RNA intracelular, comparando ao RNA do sobrenadante, podem ajudar a elucidar como a substância está agindo.

Em suma, *H. connatum* demonstrou uma interessante atividade antirretroviral, assim como sua fração acetato de etila, sendo um potencial objeto de estudo para novas pesquisas associadas à inibição de FIV e HIV, assim como futuras terapias alternativas para o tratamento dos vírus.

7. Referências

AKRAM, M. et al. Antiviral potential of medicinal plants against HIV, HSV, influenza, hepatitis, and coxsackievirus: A systematic review. **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 32, n. 5, p. 811–822, 2018.

ALVES, A. C. S. et al. Aspectos botânicos, químicos, farmacológicos e terapêuticos do *Hypericum perforatum* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Guarapuava, v. 16, n. 3, p. 593–606, 2014.

AMMARANOND, P.; SANGUANSITTIANAN, S. Mechanism of HIV antiretroviral drugs progress toward drug resistance. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, Bangkok, v. 26, n. 1, p. 146–161, 2012.

ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products : A review. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 33, n. 8, p. 1582–1614, 2015.

AXARLIS, S. et al. Antiviral In vitro Activity of *Hypericum perforatum* L . Extract on the Human Cytomegalovirus (HCMV). **Phytotherapy Research**, Athens, v. 12, n. July, p. 507–511, 1998.

AYAN, A. K.; ÇIRAK, C.; YANAR, O. Variations in total phenolics during ontogenetic, morphogenetic, and diurnal cycles in *Hypericum* species from Turkey. **Journal of Plant Biology**, [s. l.], v. 49, n. 6, p. 432–439, 2006.

BACHMANN, M. H. et al. Genetic Diversity of Feline Immunodeficiency Virus : Dual Infection , Recombination , and Distinct Evolutionary Rates among Envelope Sequence Clades. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 71, n. 6, p. 4241–4253, 1997.

BALZARINI, J. et al. The mannose-specific plant lectins from *Cymbidium* hybrid and *Epipactis helleborine* and the (N-acetylglucosamine)n-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication . **Antiviral Research**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 191–207, 1992.

BARROS, F. M. C. et al. Determination of phenolic compounds in flowers of *Hypericum* species native to South Brazil and Peruvian Páramos. **Plant Systematics and Evolution**, [s. l.], v. 299, n. 10, p. 1865–1872, 2013.

BECCARI, M. V et al. crossm Ibalizumab , a Novel Monoclonal Antibody for the Management of Multidrug-Resistant HIV-1 Infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 63, n. 6, p. 1–12, 2019.

BEHBAHANI, M. Evaluation of anti-HIV-1 activity of a new iridoid glycoside isolated from *Avicenna marina*, in vitro. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 262–266, 2014.

BENDINELLI, M. et al. Feline immunodeficiency virus: An interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, Pisa, v. 8, n. 1, p. 87–112, 1995.

BERNARDI, A. P. M. Análise química, avaliação da atividade antioxidante e obtenção de culturas in vitro de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul. [s. l.], p. 342, 2007.

BERNARDI, A. P. M. et al. Phenolic compounds profiles during ex vitro acclimatization of micropropagated *Hypericum polyanthemum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 46, n. 7, p. 694–700, 2008.

BIENZLE, D. et al. The variability of serological and molecular diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. **Canadian Veterinary Journal**, [s. l.], v. 45, p. 753–757, 2004.

BIEZUS, G. et al. Prevalence of and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) in cats of the state of Santa Catarina , Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, [s. l.], v. 63, n. June 2018, p. 17–21, 2019.

BIRT, D. F. et al. *Hypericum* in infection: Identification of anti-viral and anti-inflammatory constituents. **Pharmaceutical Biology**, Ames, v. 47, n. 8, p. 774–782, 2009.

BISSET, L. R. et al. Combined effect of zidovudine (ZDV), lamivudine (3TC) and abacavir (ABC) antiretroviral therapy in suppressing in vitro FIV replication. **Antiviral Research**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 35–45, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos**. Brasília, DF, 2018.

BRIDI, H.; MEIRELLES, G. C.; VON POSER, G. L. Structural diversity and biological activities of phloroglucinol derivatives from *Hypericum* species. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 155, n. July, p. 203–232, 2018.

CALDAS, A. P. F. et al. Detecção do provírus da Imunodeficiência Felina em gatos domésticos pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 20–25, 2000.

CHEN, H. et al. Antiviral activity against infectious bronchitis virus and bioactive components of *Hypericum perforatum* L. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 10, n. OCT, p. 1–22, 2019.

CLUTTER, D. S. et al. HIV-1 Drug Resistance and Resistance Testing. **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 46, p. 292–307, 2016.

CROCKETT, S. L.; SCHANEBERG, B.; KHAN, I. A. Phytochemical profiling of new and old world *Hypericum* (St. John's Wort) species. **Phytochemical Analysis**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 479–485, 2005.

DALL'AGNOL, R. et al. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 10, p. 511–516, 2003.

DRESLER, S. et al. Methodological aspects of biologically active compounds quantification in the genus *Hypericum*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 155, p. 82–90, 2018.

ECKSTRAND, C. D.; SPARGER, E. E.; MURPHY, B. G. Central and peripheral reservoirs of feline immunodeficiency virus in cats: A review. **Journal of General Virology**, Davis, v. 98, n. 8, p. 1985–1996, 2017.

ELDER, J. H. et al. Molecular Mechanisms of FIV Infection. **Vet Immunol Immunopathol**, [s. l.], v. 123, n. 1–2, p. 3–13, 2008.

ELDER, J. H. et al. Feline immunodeficiency virus (FIV) as a model for study of lentivirus infections: parallels with HIV. **Current HIV research**, La Jolla, v. 8, n. 1, p. 73–80, 2010.

FOGLE, J. E. et al. Fozivudine Tidoxil as Single-Agent Therapy Decreases Plasma and Cell-Associated Viremia during Acute Feline Immunodeficiency Virus Infection. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 413–418, 2011.

FRATIANNI, F. et al. Biochemical composition, antimicrobial activities, and anti-quorum-sensing activities of ethanol and ethyl acetate extracts from *hypericum connatum* lam. (guttiferae). **Journal of Medicinal Food**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 454–459, 2013.

FRITZ, D. **Análise química e avaliação da atividade antiviral de *Hypericum connatum* Lam.** 2006. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [s. l.], 2006.

FRITZ, D. et al. Herpes virus inhibitory substances from *Hypericum connatum* Lam., a plant used in southern Brazil to treat oral lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, Porto Alegre, v. 113, n. 3, p. 517–520, 2007.

GONZÁLEZ, S. A.; AFFRANCHINO, J. L. Properties and Functions of Feline Immunodeficiency Virus Gag Domains in Virion Assembly and Budding. **Viruses**, [s. l.], v. 10, n. 261, p. 12–14, 2018.

HARTMANN, K.; STENGEL, C. FIV as a Model for HIV Treatment. In: FRIEDMAN, H.; SPECTER, S.; BENDINELLI, M. (Eds.). **In vivo Models of HIV Disease and Control**. Munich: Springer, 2006. p. 333–364.

HARTMANN, K.; WOODING, A.; BERGMANN, M.. Efficacy of Antiviral Drugs against Feline Immunodeficiency Virus. **Veterinary Sciences**, Munich, v. 2, n. 4, p. 456–476, 2015.

HASSAN, M. Z. et al. Therapeutic potential of coumarins as antiviral agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Penang, v. 123, p. 236–255, 2016.

HAYWARD, J. J.; TAYLOR, J.; RODRIGO, A. G. Phylogenetic Analysis of Feline Immunodeficiency Virus in Feral and Companion Domestic Cats of New Zealand. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 81, n. 6, p. 2999–3004, 2007.

HEPP, R. W. **Avaliação de atividade antirretroviral de extratos e substâncias isoladas de plantas frente ao vírus da imunodeficiência felina (FIV) como modelo experimental para o HIV**. 2017. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [s. l.], 2017.

HOSSEINIPOUR, M. C. et al. Emergence of HIV drug resistance during first- and second-line antiretroviral therapy in resource-limited settings. **Journal of Infectious Diseases**, Lilongwe, v. 207, n. SUPPL.2, p. 49–56, 2013.

HUDSON, J. B.; LOPEZ-BAZZOCCHI, I.; TOWERS, G. H. N. Antiviral activities of hypericin. **Antiviral Research**, Vancouver, v. 15, n. 2, p. 101–112, 1991.

ISHIDA, T. et al. Feline immunodeficiency virus infection in cats of Japan. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [s. l.], v. 194, n. 2, p. 221–225, 1989.

JIANG, Y. et al. Inhibitors from natural products to HIV-1 reverse transcriptase, protease and integrase. **Mini reviews in medicinal chemistry**, Tianjin, v. 10, n. 14, p. 1331–44, 2010.

JIMÉNEZ, C. R. Hipericáceas. **Flora Ilustrada Catarinense**. Florianópolis:IOESC, 1980.

KENYON, J. C.; LEVER, Andrew M. L. The molecular biology of feline immunodeficiency virus (FIV). **Viruses**, Cambridge, v. 3, n. 11, p. 2192–2213, 2011.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. THE EVOLVING ROLE OF NATURAL PRODUCTS IN DRUG DISCOVERY. **Nature Reviews**, [s. l.], v. 4, n. February, p. 206–220, 2005.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, [s. l.], v. 2013, n. 4, p. 1–16, 2013.

KURAPATI, K. R. V. et al. Natural products as Anti-HIV agents and role in HIV-associated neurocognitive disorders (HAND): A brief overview. **Frontiers in Microbiology**, Miami, v. 6, n. JAN, p. 1–14, 2016.

LECOLLINET, S.; RICHARDSON, J. Vaccination against the feline immunodeficiency virus: The road not taken. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Maisons-Alfort, v. 31, n. 2–3, p. 167–190, 2008.

LI, B. Q. et al. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 276, n. 2, p. 534–538, 2000.

MARTINO, V. et al. Two ellagitannins from the leaves of *Terminalia triflora* with inhibitory activity on HIV-1 reverse transcriptase. **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 667–669, 2004.

MARTINS, N. S. et al. Feline immunodeficiency virus subtypes B and A in cats from São. **Archives of Virology**, [s. l.], v. 163, n. 2, p. 549–554, 2018.

MCDONNELL, S. J.; SPARGER, E. E.; MURPHY, B. G. Feline immunodeficiency virus latency. **Retrovirology**, Davis, v. 10, n. 1, p. 69, 2013.

MILLER, C. et al. Applications of the FIV Model to Study. **Viruses**, [s. l.], v. 10, n. 206, p. 11–21, 2018.

MOHAMMADI, H.; BIENZLE, D. Pharmacological inhibition of feline immunodeficiency virus (FIV). **Viruses**, Ontario, v. 4, n. 5, p. 708–724, 2012.

MUKHTAR, M. et al. Antiviral potentials of medicinal plants. **Virus Research**, Philadelphia, v. 131, n. 2, p. 111–120, 2008.

NAVARRO, E. et al. Real-time PCR detection chemistry. **Clinica Chimica Acta**, [s. l.], v. 439, p. 231–250, 2015.

NDUNG, T.; MCCUNE, J. M.; DEEKS, S. G. Why and where an HIV cure is needed and how it might be achieved. **Nature**, [s. l.], v. 576, n. December, p. 397–405, 2019.

NICOLETTI, E. et al. Antiviral properties of a crude extract from a green alga *Caulerpa taxifolia* (Vahl) C. Agardh. **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 245–247, 1999.

NÖR, C. et al. Phloroglucinol derivatives from four *Hypericum* species belonging to the Trigynobrathys section. **Biochemical Systematics and Ecology**, [s. l.], v. 32, n. 5, p. 517–519, 2004.

NORTH, T. W.; NORTH, G. L. T.; PEDERSEN, N. C. Feline Immunodeficiency Virus, a Model for Reverse Transcriptase- Targeted Chemotherapy for Acquired Immune Deficiency Syndrome. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 33, n. 6, p. 915–919, 1989.

O'BRIEN, S. J. et al. Emerging Viruses in the *Felidae*: Shifting Paradigms. **Viruses**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 236–257, 2012.

ONO, K. et al. Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. **European Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 190, n. 3, p. 469–476, 1990.

PAU, A. K.; GEORGE, J. M. Antiretroviral therapy: Current Drugs. **Infectious Disease Clinics of NA**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 371–402, 2014.

PEREZ-VIZCAINO, F.; FRAGA, C. G. Research trends in flavonoids and health. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 646, p. 107–112, 2018.

RAFFA, D. et al. European Journal of Medicinal Chemistry Recent discoveries of anticancer flavonoids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 142, p. 213–228, 2017.

REMLINGTON, K. M. et al. Mutants of Feline Immunodeficiency Virus Resistant to 3'-Azido-3'-Deoxythymidine. **Journal of Virological Methods**, [s. l.], v. 65, n. 1, p. 308–312, 1991.

SANNA, C. et al. Prenylated phloroglucinols from *Hypericum scruglii*, an endemic species of Sardinia (Italy), as new dual HIV-1 inhibitors effective on HIV-1 replication. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 1–19, 2018.

SANTOS, M. Z. et al. Chemical Composition and Inhibitory Effects of *Hypericum brasiliense* and *H. connatum* on Prolyl Oligopeptidase and Acetylcholinesterase Activities. **Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 457–463, 2016.

SCHMITT, A. C.; RAVAZZOLO, A. P.; VON POSER, G. L. Investigation of some *Hypericum* species native to Southern of Brazil for antiviral activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Porto Alegre, v. 77, n. 2–3, p. 239–245, 2001.

SHAHAT, A. A. et al. Anti-HIV activity of flavonoids and proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 133–136, 1998.

SILVA, F. S. e et al. Terapia antirretroviral no controle da infecção pelo vírus da imunodeficiência felina: revisão e perspectivas. **Science and animal health**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 268–282, 2016.

SINGH, I. P.; BODIWALA, H. S. Recent advances in anti-HIV natural products. **Natural Product Reports**, [s. l.], v. 27, n. 12, p. 1781–1800, 2010.

STICKNEY, A. L.; DUNOWSKA, M.; CAVE, N. J. Sequence variation of the feline immunodeficiency virus genome and its clinical relevance. **Veterinary Record**, Palmerston North, v. 172, n. 23, p. 607–614, 2013.

SZILASI, A. et al. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in domestic cats in Hungary. **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 1–7, 2019.

TANG, J. et al. Virucidal activity of hypericin against enveloped and non-enveloped DNA and RNA viruses. **Antiviral Research**, Indiana, v. 13, n. 6, p. 313–325, 1990.

TANIWAKI, S. A.; FIGUEIREDO, A. S.; ARAUJO JR, J. P. Virus – host interaction in feline immunodeficiency virus (FIV) infection. “**Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**”, São Paulo, v. 36, n. 6, p. 549–557, 2013.

TEIXEIRA, B. M. et al. Ocorrência do vírus da imunodeficiência felina e do vírus da leucemia felina em gatos domésticos mantidos em abrigos no município de Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s. l.], v. 59, n. 4, p. 939–942, 2007.

TEIXEIRA, B. M.; JUNIOR, A. R.; HAGIWARA, M. K. Vírus da imunodeficiência felina - uma atualização Vírus da imunodeficiência felina - uma atualização. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 88, p. 54–66, 2010.

THERMO FISHER. **DNA Copy Number and Dilution Calculator**. 2017. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/dna-copy-number-calculator.html>.

TIAN, J. et al. Antidepressant-like activity of adhyperforin, a novel constituent of *Hypericum perforatum* L. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1–6, 2014.

TOZZINI, F. et al. Simple in vitro methods for titrating Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and FIV neutralizing antibodies. **Journal of Virological Methods**, Pisa, v. 37, n. 3, p. 241–252, 1992.

UNAIDS. **Estatísticas Globais sobre HIV-Unaid**s. [s.l: s.n.].

UNCINI MANGANELLI, R. E.; ZACCARO, L.; TOMEI, P. E. Antiviral activity in vitro of *Urtica dioica* L., *Parietaria diffusa* M. et K. and *Sambucus nigra* L. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 98, n. 3, p. 323–327, 2005.

VELINGKAR, V. S.; GUPTA, G. L.; HEGDE, N. B. A current update on phytochemistry , pharmacology and herb – drug interactions of *Hypericum perforatum*. **Phytochemistry Reviews**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 725–744, 2017.

VENUGOPALA, K. N.; RASHMI, V.; ODHAV, B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. **BioMed Research International**, Durban, v. 2013, p. 1–14, 2013.

VIJAYAN, P. et al. Antiviral activity of medicinal plants of Nilgiris. **Indian Journal of Medical Research**, [s. l.], v. 120, p. 24–29, 2004.

WAHEED, A. A.; TACHEDJIAN, G. Why Do We Need New Drug Classes for HIV Treatment and Prevention? **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 16, n.12, p.1343-1349,2016.

WU, L. et al. In vivo and in vitro antiviral activity of hyperoside extracted from *Abelmoschus manihot* (L) medik. **Acta Pharmacologica Sinica**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 404–409, 2007.

YU, Y. et al. Effects of Triterpenoids and Flavonoids Isolated from *Alnus firma* on HIV-1 Viral Enzymes. **Archives of Pharmacal Research**, [s. l.], v. 30, n. 7, p. 820–826, 2007.

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