

FERNANDA SOUZA DE OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DA QUERCETINA SOBRE ALGUNS
VÍRUS DE IMPORTÂNCIA VETERINÁRIA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2007

FERNANDA SOUZA DE OLIVEIRA

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DA QUERCETINA SOBRE ALGUNS
VÍRUS DE IMPORTÂNCIA VETERINÁRIA**

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

APROVADA: 7 de maio de 2007.

Prof^ª. Marlene Isabel Vargas
Vilória
(Co-Orientadora)

Prof^ª. Tânia Toledo de Oliveira
(Co-Orientadora)

Prof. Joaquín Hernán Patarroyo
Salcedo

Prof. João Paulo Viana Leite

Prof^ª. Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo
(Orientadora)

“Aos meus pais, Mário e Maria,
pelo amor incondicional, renúncia
e dedicação”.

“Aos meus irmãos, Luciana e
Paulo, por alegrarem minha vida,
pela amizade e amor”.

“À minha querida Vó Quininha, pelo
exemplo de vida”.

In memoriam

*“Não basta dar os passos que nos devem
levar um dia ao objetivo, cada passo deve ser ele
próprio um objetivo em si mesmo, ao mesmo
tempo em que nos leva para adiante”.*

Von Goethe

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa.

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade.

À minha querida orientadora Márcia Rogéria, pelos bons anos de convivência, pelo carinho, amizade e por sempre desejar o melhor para mim.

À Prof.^a Maria Cristina Baracat, pela co-orientação e pelo carinho.

A todos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, professores e funcionários, e em especial ao Eduardo e Reginaldo, por toda a ajuda.

À Prof.^a Tânia Toledo, pela co-orientação, por me disponibilizar o Laboratório de Biofármacos para realização dos experimentos *in vivo* e, principalmente, pelo carinho, generosidade e por me apoiar em momentos difíceis.

A todos do Laboratório de Biofármacos, especialmente à Virgínia, Gabrielle, Rafael, Mary Hellen, Carlos, Luís Eugênio, e Cida que trabalharam comigo e me ajudaram durante a realização dos experimentos.

Ao José Geraldo, técnico do Laboratório de Biofármacos, pela ajuda nas análises hematológicas.

A todos do Departamento de Veterinária, em especial aos técnicos do setor de Medicina Veterinária Preventiva, que sempre fizeram de tudo para me ajudar. Quero agradecer ao Luís Carlos e ao Marquinhos por toda a colaboração.

À Prof.^a Marlene, pela co-orientação, por me disponibilizar o Laboratório de Histopatologia e por todo o carinho, paciência e pelos ensinamentos.

Ao Adão e ao Cláudio pela colaboração no preparo das lâminas de histopatologia.

Ao Prof.^o Joaquín Patarroyo, por toda a ajuda desde o período de graduação, pelos conselhos e pelo carinho.

Ao Marcinho, por toda a ajuda, disponibilidade, preocupações e grande apoio durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof.^o Luís Peternelli pela colaboração nas análises estatísticas.

Ao Prof.^o Mauro Pires, pelos ensinamentos e por sempre acreditar em mim e em meu trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Virologia Molecular Animal, por tão boa convivência, pela força e torcida de todos.

Aos colegas Abelardo, Orlando e Humberto pelos conselhos e pelo enorme auxílio.

Aos colegas de laboratório Patrícia, Elisa, Monique, Flávio, Vivian e Fernanda Faria, que trabalharam comigo e me ajudaram na realização deste trabalho.

À Shenia e Adairton, pelo grande apoio e amizade que me possibilitou realizar e concluir meus experimentos.

Ao querido Sr. Valdir pela valiosa ajuda, essencial para o desenvolvimento deste trabalho, e por toda a amizade e carinho.

À grande amiga Camila, por tudo que fez por mim durante a realização dos experimentos, pelos ensinamentos e por toda amizade.

Aos meus pais, Mário e Maria, por todo amor a mim oferecido, pela força nos momentos difíceis e por serem exatamente como são. Amo vocês!!!

Ao meu irmão Paulo, por alegrar a minha vida com sua alegria de viver, pelos ensinamentos e por ser exemplo de vida para mim.

Às amigas, Janaína, Pri, Prescilha e Fabíola por todo o carinho dedicado a mim e pela torcida.

Às meninas da República pela boa convivência e amizade.

Às minhas irmãs de coração, Tatá, Béia e Ferdinanda, pela amizade sempre e pelo apoio nos momentos difíceis.

Ao meu grande amigo Kaabah, por toda ajuda, torcida e amizade.

À minha irmã, Luciana, que sempre zela por mim, por toda ajuda, por todo o seu amor e dedicação mais do que eu mereço. Amo muito você! Obrigada por tudo.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço a Deus, por todas as oportunidades, por olhar por mim e por toda a minha família. Obrigada Senhor por colocar tantas pessoas boas em meu caminho que me fizeram ter forças para chegar até aqui.

BIOGRAFIA

FERNANDA SOUZA DE OLIVEIRA, filha de Mário José Câmara de Oliveira e Maria das Dôres Souza Oliveira, nasceu em 20 de abril de 1981, em Janaúba – Minas Gerais. Em julho de 2005 graduou-se em Bioquímica, pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais – Brasil.

Em agosto do mesmo ano ingressou no curso de Mestrado em Bioquímica Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação em Maio de 2007.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. Flavonóides	3
2.2. Herpesvírus	11
2.3. Parvovírus Canino (CPV)	19
3. Referências Bibliográficas	22
Capítulo 1	
Resumo	38
Abstract	39
1. Introdução	40
2. Materiais e Métodos	42
3. Resultados e Discussão	46
4. Conclusão	52
5. Referências Bibliográficas	53
Capítulo 2	
Resumo	56
Abstract	58
1. Introdução	60
2. Materiais e Métodos	62
3. Resultados e Discussão	62
4. Conclusão	89
5. Referências Bibliográficas	90
Capítulo 3	
Resumo	94
Abstract	95
1. Introdução	96
2. Materiais e Métodos	98
3. Resultados e Discussão	105
4. Conclusão	117
5. Referências Bibliográficas	118
Conclusões Gerais	121
Perspectivas Futuras	123
Apêndice	124

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1: Diferentes classes de flavonóides	4
Capítulo 1	
Tabela 1: Análise de parâmetros indicadores de nefro e hepatotoxicidade	51
Capítulo 2	
Tabela 1: Dados da análise hematológica para contagem de células brancas sanguíneas (WBC)	75
Tabela 2: Dados da análise hematológica para contagem de linfócitos (LYM)	77
Tabela 3: Dados da análise hematológica para % de linfócitos (%LY)	78
Tabela 4: Dados da análise hematológica para contagem de monócitos (MID).	79
Tabela 5: Dados da análise hematológica para porcentagem de monócitos (% MI)	80
Tabela 6: Dados da análise hematológica para contagem de granulócitos (GRA)	81
Tabela 7: Dados da análise hematológica para porcentagem de granulócitos (%GR)	82
Tabela 8: Dados da análise hematológica para contagem de eritrócitos (RBC)	84
Tabela 9: Dados da análise hematológica para concentração de hemoglobina (HGB)	85
Tabela 10: Dados da análise hematológica para o hematócrito (HCT)	86
Capítulo 3	
Tabela 1: Apresentações clínicas observadas nos animais inoculados com o BoHV-5 tratados e não tratados	109

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Rotas de sinalização celular onde atuam os flavonóides	8
Figura 2: Mecanismo de ação do aciclovir	13
Capítulo 1	
Figura 1: Ensaio de Inativação Direta (AID) para CPV	47
Figura 2: Ensaio <i>End Point</i> para CPV	48
Figura 3: Ensaio <i>Timing of addition</i> para CPV	49
Capítulo 2	
Figura 1: Ensaio de Inativação Direta (AID) para EHV-1	69
Figura 2: Ensaio <i>End Point</i> para EHV-1	70
Figura 3: Ensaio <i>Timing of addition</i> para EHV-1	71
Figura 4: Ensaio de linfoproliferação das células esplênicas provenientes dos camundongos inoculados com EHV-1, tratados e não tratados com a quercetina	73
Figura 5: Ensaio de linfoproliferação comparando-se a resposta entre os grupos frente ao estímulo com o vírus e estimulados com a quercetina	74
Figura 6: Contagem de células brancas	76
Figura 7: Contagem de linfócitos	77
Figura 8: Porcentagem de linfócitos em relação às células brancas totais	78
Figura 9: Contagem de monócitos	80
Figura 10: Porcentagem de monócitos	81
Figura 11: Contagem de granulócitos	82
Figura 12: Porcentagem de granulócitos	83
Figura 13: Contagem de eritrócitos	85
Figura 14: Concentração de hemoglobina	86
Figura 15: Valores do hematócrito	87
Capítulo 3	
Figura 1: Ensaio de Inativação Direta (AID) para BoHV-5	105
Figura 2: Ensaio <i>End Point</i> para BoHV-5	106
Figura 3: Ensaio <i>Timing of addition</i> para BoHV-5	107
Figura 4: Titulação dos vírus excretados pelos animais e isolados em cultivo celular	109
Figura 5: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos da Nested-PCR	111
Figura 6: Título de anticorpos obtidos por meio da técnica de soroneutralização	111
Figura 7: Ensaio de linfoproliferação comparando-se a resposta entre os grupos frente ao estímulo com o vírus	112
Figura 8: Análise histopatológica do cérebro dos animais não inoculados e inoculados e não tratados	114
Figura 9: Análise histopatológica do cérebro dos animais inoculados e tratados com quercetina, aciclovir e com a associação aciclovir e quercetina	115

LISTA DE ABREVIATURAS

AID: Ensaio de inativação direta	LATs: Transcritos associados à latência
ALT: Alanina transaminase	L: litro
ANOVA: Análise de variância	LVMA: Laboratório de Virologia Molecular Animal
AP: Fosfatase alcalina	LY: porcentagem de linfócito
Asp: Aspartato	LYM: ontagem de linfócito
AST: Aspartato-transaminase	M: molar
BoHV-1: Herpesvírus Bovino 5 (Bovine herpesvirus 1)	MAPK: Proteína cinase ativada por mitógeno
BoHV-5: Herpesvírus Bovino 5 (Bovine herpesvirus 5)	MEM: Meio Essencial Mínimo
BSA: soro albumina bovina (bovine serum albumin)	MI: Porcentagem de monócito
COX-2: Cicloxigenase-2	MID: Contagem de Monócito
CPV: Parvovírus Canino (Canine parvovirus)	mg: miligramas
CRFK: células de rim de felino	mL: mililitros
CRIB: células de rim bovino	mRNA: RNA mensageiro
CRP: Proteína C reativa	MTT: 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,-difeniltetrazolium brometo
CT₅₀: concentração necessária para reduzir D.O. em 50%	N: normal
DMSO: dimetil sulfóxido	NK: células natural killer
DNA: Ácido desoxirribonucléico	PBMC: Células mononucleares sanguíneas periféricas
D.O.: densidade óptica	PBS: phosphate buffer solution
d.p.i.: dias após inoculação	PCR: Reação da Polimerase em Cadeia
d.p.t.: dias após tratamento	p.i.: Após inoculação
ECP: efeito citopático	PMNs: neutrófilos polimorfonucleares
EDTA: ácido etileno diamino tetracético	p/v: peso/volume
EHV-1: Herpesvírus Equino 1 (Equine herpesvirus 1)	q.s.p.: quantidade suficiente para
gB: glicoproteína B	RNA: Ácido ribonucléico
gC: glicoproteína C	RPMI: Roswell Park Memorial Institute (meio de cultura)
gE: glicoproteína E	PRV: Vírus da Pseudoraiva
gI: glicoproteína I	RK13: células de rim de coelho
gp41: glicoproteína 41	RBC: Células sanguíneas vermelhas
gp120: glicoproteína 120	RL: Radicais livres
Glu: Glutamato	RLV: Vírus da leucemia murina Rauscher
GR: Porcentagem de granulócito	ROS: Espécies reativas de oxigênio
GRA: contagem de granulócito	SNC: Sistema Nervoso Central
HCT: Hematócrito	SOD: Superóxido dismutase
HE: Hematoxilina & Eosina	SFB: soro fetal bovino
HGB: hemoglobina	TCID_{50%}: Tissue Culture Infecting Dose50%
HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana	VZV: Vírus da Varicela Zórtter
HSV: Herpesvírus simples	xg: unidade de força centrífuga relative
IL-1: Interleucina 1	WBC: Células brancas sanguíneas
IL-2: Interleucina 2	µg: microgramas
IL-6: Interleucina 6	µL: microlitros
IL-8: Interleucina 8	°C: graus Celsius
iNOS: Óxido nítrico sintase induzível	
kg: quilogramas	

RESUMO

OLIVEIRA, Fernanda Souza de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2007. **Atividade antiviral da quercetina sobre alguns vírus de importância veterinária.** Orientadora: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo. Co-Orientadores: Maria Cristina Baracat Pereira, Marlene Isabel Vargas Vilória e Tânia Toledo de Oliveira.

A busca por novas substâncias com potencial antimicrobiano se torna crescente e se faz necessário devido, principalmente, ao desenvolvimento de resistência de agentes infecciosos às drogas atuais. Compostos naturais, dentre eles os flavonóides, tem sido uma fonte particularmente rica desses agentes anti-infecciosos. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar o potencial antiviral do flavonóide quercetina contra o Parvovírus Canino (CPV), Herpesvírus Bovino 5 (BoHV-5) e Herpesvírus Equino 1 (EHV-1). Ensaio *in vitro* foram realizados, como o ensaio de Inativação Direta (AID), no qual se incubou a quercetina com o vírus antes da inoculação, ensaio *End Point* onde foi feito um pré-tratamento das células com a quercetina e o ensaio denominado de *Timing of Addition*, onde foi feito o tratamento das células em cada passo da infecção viral. Foi observado que a atividade antiviral da quercetina parece ser nos passos iniciais da infecção, principalmente no momento da adsorção viral. Nos ensaios com o Parvovírus Canino e o Herpesvírus Equino 1, a quercetina demonstrou se ligar a receptores celulares, enquanto que nos ensaios com o Herpesvírus Bovino 5, a ação da quercetina demonstrou ser na ligação a estruturas presentes no envelope viral. Nos ensaios *in vivo* realizados com os BoHV-5 e EHV-1, foi possível avaliar a ação direta da quercetina sobre a infectividade viral e a sua atuação em outros mecanismos de defesa do animal. A partir dos resultados encontrados neste trabalho, sugerimos que a quercetina possa atuar como um possível agente antiviral, não somente por atuar de forma direta no controle da infecção viral, mas também por meio da ativação de múltiplos processos que indiretamente promovem o controle da infecção viral pelo organismo.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Fernanda Souza de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, may of 2007. **Antiviral activity of the quercetin against important virus of veterinary medicine.** Adviser: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo. Co-Advisers: Maria Cristina Baracat Pereira, Marlene Isabel Vargas Vilória and Tânia Toledo de Oliveira.

The search for new substances with potential antimicrobials is growing and is necessary due, mainly, to the development of resistance of infectious agents to the current drugs. Natural compounds, among them flavonoids, have been a particularly rich source of these antimicrobial agents. The objective of this work was to evaluate the antiviral potential of flavonoid quercetin against Canine Parvovirus (CPV), Bovine Herpesvirus 5 (BoHV-5) and Equid Herpesvirus 1 (EHV-1). Assays in vitro were accomplished, as the assay inactivating direct (AID), in which the quercetin was incubated with the virus before the inoculation, assay End Point in which quercetin was incubated with the cells before viral inoculation and the assay Timing of addition, in which treatment of the cells was made in each step of infection. It was observed that the antiviral activity of quercetin seems to be in the initial steps of the viral infection, mainly at the moment of viral attachment. In the assays with Canine Parvovirus, quercetin demonstrated to bind the cellular receptors, whereas in the assays with the Herpesvirus used in this study, the performance of the quercetin demonstrated to be in the linking the structures of the viral envelope. In the assays in vivo with BoHV-5 and EHV-1, was possible to evaluate the direct action of the quercetin on the viral infectivity and its performance in other mechanisms of defense of the animal. From the results found in this work, we suggest that quercetin can act as a possible antiviral agent, not only for acting of direct form in the control of the viral infection, but also by means of the activation of multiple processes that indirectly promote the control of viral infection for the organism.

1 INTRODUÇÃO

É cada vez maior o número de pesquisas em busca de novas substâncias com potencial antimicrobiano. O desenvolvimento de resistência de agentes infecciosos às drogas atuais é um problema crescente global e, dessa maneira, investimentos substanciais e pesquisas no campo de anti-infecciosos são necessários. Um chamado tem sido feito à indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novas classes de drogas que trabalhem em sítios alvos diferentes das drogas atuais. Além disso, há uma necessidade dessas indústrias em atender a demanda de produção de fármacos comerciais para diversas enfermidades humanas e animais, que eliminem reações colaterais e atuem especificamente no agente patológico ou no organismo de forma direta, eficaz e sem toxicidade.

O desenho racional de drogas nem sempre rende antimicrobianos eficazes. No passado, inibidores de enzimas foram desenhados e sintetizados com sucesso, mas eles demonstraram modesta atividade antibacteriana, provavelmente devido à complexa rota de entrada dessas drogas nas células. Amplo *screening* empírico de substâncias químicas para atividades antimicrobianas representa uma estratégia alternativa para o desenvolvimento de novas drogas. Produtos naturais tem sido uma fonte particularmente rica desses agentes anti-infecciosos, gerando, por exemplo, as penicilinas em 1940, as tetraciclina em 1948 e os glicopeptídeos em 1955 (SILVER *et al.*, 1990).

Esforços têm sido feitos para avaliar a atividade antiviral de uma ampla faixa de produtos naturais a fim de se isolar e caracterizar novos compostos, os quais devem inibir a replicação ou a infecção viral, ou ainda servir como modelo para novas moléculas (HAMBURGER & HOSTETTAMNN, 1991, LEDNICER & NARAYANAN, 1993, ELISABETSKY *et al.*, 1997). A prevenção e o tratamento das infecções virais ainda é um grande desafio para a indústria farmacêutica, pois muitas dessas infecções não possuem tratamento apropriado e eficiente.

A quimioterapia antiviral confronta 3 maiores obstáculos: uma possível interferência com o metabolismo celular normal, levando a efeitos

citotóxicos, a variabilidade genética viral que produz mutantes resistentes a drogas e a inabilidade de alguma quimioterapia de erradicar infecções virais latentes (HURAUX *et al.*, 1990). O desenvolvimento da terapia antiviral tem como desafio desenvolver drogas com um bom perfil farmacocinético e farmacodinâmico, os quais incluem não-toxicidade, não mutagenicidade e carcinogenicidade e serem inibidores específicos das funções virais (SELWAY, 1986).

Crescentemente, os flavonóides estão sendo alvos de muitas pesquisas médicas. Eles possuem muitas propriedades úteis, incluindo atividade antiinflamatória, inibição de enzimas, atividade antimicrobiana (HAVSTEEN, 1983; HARBORNE, 1999), atividade antialérgica, antioxidante (MIDDLETON & CHITHAN, 1993), atividade vascular e antitumoral citotóxica (HARBORNE & WILLIAMS, 2000). Devido à ampla existência dos flavonóides, todos os animais que se alimentam de plantas são influenciados por esses produtos naturais. Os flavonóides também são usados em formas mais purificadas como drogas e suplementos alimentares (WANG *et al.*, 1998).

Diversos trabalhos têm demonstrado o potencial antiviral dessa classe de substâncias. A quercetina é um dos flavonóides mais bem estudados e com ação antiviral já relatada. Estudos anteriores realizados no Laboratório de Virologia Molecular Animal (LVMA) forneceram indícios da ação da quercetina contra vírus animais (BRUM, 2006). Dessa maneira, buscou-se avaliar neste trabalho a atividade antiviral da quercetina sobre alguns vírus de importância veterinária. Dentre esses vírus, estão os Herpesvírus Bovino 5 (BoHV-5) e Herpesvírus Equino 1 (EHV-1), que além da importância na área animal, servem ainda de modelo para pesquisas em busca de medicamentos no tratamento de infecções herpéticas humanas, as quais são causadas por vírus da mesma subfamília. O potencial antiviral da quercetina também foi avaliado contra o Parvovírus Canino (CPV), uma das principais doenças que acomete cães.

Assim, espera-se que este trabalho contribua não só no desenvolvimento de um possível medicamento para o tratamento de infecções animais como, também para o tratamento de infecções herpéticas humanas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Flavonóides

2.1.1 Estrutura e função

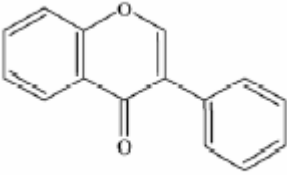
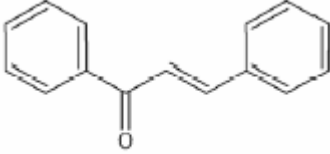
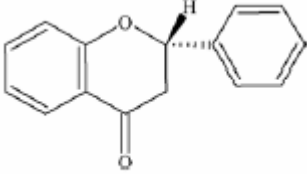
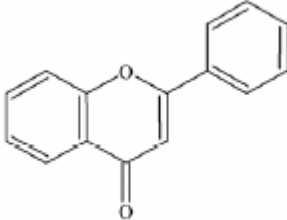
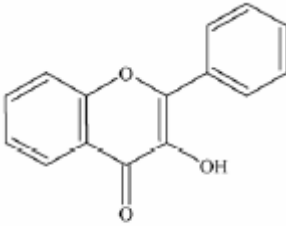
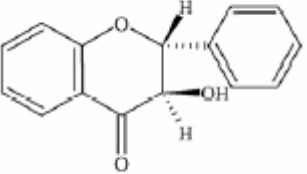
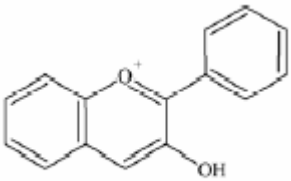
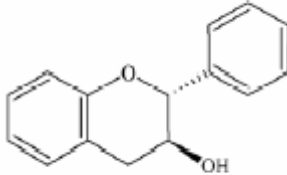
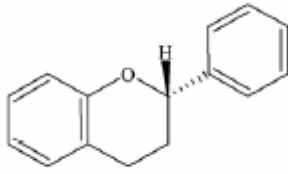
Os compostos polifenólicos, como os ácidos fenólicos e os flavonóides são grupos de substâncias presentes na natureza em diversos vegetais, frutas e bebidas. Esses compostos são, na maioria, potentes agentes antioxidantes necessários para o funcionamento das células vegetais (KINSELLA, 1993).

Os flavonóides fazem parte de uma classe de compostos fenólicos resultantes do metabolismo secundário de plantas, derivados de uma rota biossintética mista, via chiquimato e acetato, e são amplamente distribuídos nas plantas superiores, em caules, folhas e frutos. Quimicamente, o núcleo fundamental dos flavonóides apresenta um esqueleto de quinze carbonos unidos em dois anéis fenólicos e um terceiro não fenólico (C_6 C_3 C_6). Compostos secundários são cruciais na resposta da planta a estresses, tais como mudanças na luz ou temperatura, competição, pressão herbívora e ataques patogênicos (GOTTILIEB *et al.*, 1995, BERHOW, 1998).

Os flavonóides podem estar presentes nas plantas na forma glicosilada, sendo a glicose o carboidrato mais freqüente, embora a forma aglicona (sem açúcar) também ocorra. Os carboidratos podem estar na forma de 8 diferentes monossacarídeos simples e na forma de oligossacarídeos que podem estar ligados a diferentes carbonos e grupos hidroxila dos flavonóides aglicona nas posições C-3 ou C-7 (WILLIAMS & HARBORNE, 1994).

A classificação dos flavonóides pode ser feita de acordo com sua origem biossintética. Algumas classes, por exemplo, chalconas, flavanonas, flavan-3-óis e flavan-3,4-dióis, são tanto intermediários na biossíntese quanto produtos finais que podem acumular nos tecidos das plantas. Outras classes são somente conhecidas como produtos finais da biossíntese, por exemplo, antocianidinas, flavonas e flavonois (CUSHNIE & LAMB, 2005). As diferentes classes dos flavonóides estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1: Esqueleto estrutural das principais classes de flavonóides. (CUSHNIE & LAMB, 2005).

 <p style="text-align: center;">Isoflavona</p>	 <p style="text-align: center;">Chalcona</p>	 <p style="text-align: center;">Flavanona</p>
 <p style="text-align: center;">Flavona</p>	 <p style="text-align: center;">Flavonol</p>	 <p style="text-align: center;">Flavanon-3-ol</p>
 <p style="text-align: center;">Antocianinas</p>	 <p style="text-align: center;">Flavan-3-ol (Também conhecida como catequinas)</p>	 <p style="text-align: center;">Flavana</p>

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

2.1.2 Atividades Biológicas

Os flavonóides são metabólitos secundários comuns em plantas, considerados compostos bioativos relativamente não-tóxicos e possuem uma ampla variedade de funções biológicas (GARCÍA-MEDIAVILLA et al., 2007). Os flavonóides e outros compostos fenólicos derivados da via biossintética mista chiquimato e acetato, têm sido relatados como possuidores de efeitos fisiológicos em plantas e animais, pois servem como inibidores e ativadores de enzimas, quelante de metais, antioxidantes, recrutadores de radicais livres, reguladores da transcrição, fitohormônios e como substâncias mutagênicas, antimutagênicas, carcinogênicas, anticarcinogênicas, citotóxicas, antiinflamatórias e antialergênicas (BERHOW, 1998).

Existe um interesse crescente no estudo da atividade biológica dos flavonóides. Muitas pesquisas estão buscando determinar o mecanismo de ação desses compostos para definir os efeitos *in vivo* e em diversos tipos celulares, interferências no ciclo celular bem como a influência desses no metabolismo, fisiologia e efeitos dos seus metabólitos resultantes (SPENCER *et al.*, 2003). De acordo com Soobrattee *et al.* (2005), os compostos fenólicos, como os flavonóides, são agentes profiláticos atraentes devido a sua alta prevalência na dieta e seus efeitos plurifarmacológicos.

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

Embora o mecanismo de ação antioxidante dos flavonóides não esteja totalmente esclarecido e possa variar de acordo com a estrutura

química do composto, de modo geral, os flavonóides são capazes de doar hidrogênio para os radicais livres, estabilizando-os e impedindo o estresse oxidativo capaz de gerar danos tissulares ou morte celular (SAIJA *et al.*, 1995; GUO *et al.*, 1999). Em estudos realizados *in vitro*, muitos compostos polifenólicos naturais pareceram ser melhores antioxidantes que as vitaminas C e E, pois além de terem a capacidade de quelar metais, especialmente cobre e ferro, esses compostos podem atuar indiretamente como antioxidantes já que inibem a ação desses metais como catalisadores na formação de radicais livres (CAMPOS & LISSI 1996; CAMPOS *et al.*, 1996).

Estudos farmacocômicos mostraram que flavonóides presentes na espécie do gênero *Byrsonima*, apresentaram atividades antibacteriana, antioxidante, antiinflamatória e analgésica (SANNOMIYA *et al.*, 2003). Em pacientes durante o período de pós-menopausa, observou-se que os flavonóides são capazes de reduzir os sintomas e que poderiam prevenir algumas doenças crônicas que ocorrem no climatério, como a osteoporose (HAN *et al.*, 2002).

Lahouel *et al.* (2004) relataram a citoproteção dos flavonóides (quercetina e diosmina) por meio da inibição da peroxidação lipídica em homogenatos de fígado de camundongos tratados com paracetamol, ciclofosfamida e vimblastina (hepatotóxicos), todos metabolizados no fígado pela enzima citocromo P450.

Diferentes tipos de compostos fenólicos, incluindo os flavonóides, podem demonstrar efeitos imunomodulatórios diferenciados, tais como aumento ou diminuição da proliferação de esplenócitos. Segundo Lin & Tang (2007), uma correlação foi observada entre o conteúdo total fenólico ou de flavonóides nas frutas e vegetais selecionados para o estudo e seu efeito estimulatório na proliferação de esplenócitos. A magnitude da resposta imune celular (tal como a proliferação de esplenócitos) é geralmente dependente da dose estimulante administrada, portanto, doses muito baixas ou muito altas poderiam induzir um estado específico não responsivo. De acordo com Chang *et al.* (2007), os flavonóides baicalina e baicaleína podem modular a ativação de leucócitos periféricos pela inibição da interação destas células com células fagocíticas, o que confere efeito antiinflamatório a

essas drogas. Eles demonstraram que isquemia multiorgão ou disfunção, inflamação sistêmica e hiperpirexia ocorridas durante um ataque de calor pode ser significativamente suprimida pelo tratamento com baicalina.

Os flavonóides são conhecidos por estimular a resposta imune tanto celular quanto humoral. Embora o preciso mecanismo ainda seja desconhecido, é possível que os flavonóides estimulem a produção de citocinas, particularmente as interleucinas 1 e 2 (IL-1 e IL-2), as quais possuem ação mitogênica para linfócitos T e B (HAVSTEEN, 2002). Outros compostos fenólicos, tais como os derivados do ácido cinâmico, também induzem a produção e liberação de citocinas como IL-1, IL-6 e IL-8 pela ativação de macrófagos, estimulando a produção de anticorpos (ORSOLIC *et al.*, 2005).

De acordo com Fisher *et al.* (2007), a associação de 40 mg/dose de extrato etanólico de própolis verde com uma vacina oleosa inativada contra BoHV-5 aumentou a resposta imune humoral medida pelo título de anticorpos neutralizantes. Os compostos da própolis responsáveis pela atividade imunoestimuladora não foram ainda determinados, no entanto, os autores verificaram elevado teor de flavonóides e compostos fenólicos nas amostras de própolis estudadas e sugerem que estes compostos tenham sido as principais substâncias que agiram no sistema imune.

A atividade antiinflamatória, exercida pelos flavonóides, também é amplamente estudada. Os efeitos dos flavonóides em uma variedade de processos inflamatórios e funções imunes têm sido descritas e já se sabe que eles potencialmente inibem várias enzimas que são ativadas em certas condições inflamatórias (KWON *et al.*, 2005). De acordo com García-Mediavilla *et al.* (2007), o flavonóide caenferol produz uma redução, dependente de concentração, nos níveis de expressão das enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS), cicloxigenase-2 (COX-2) e proteína C reativa (CRP), as quais estão envolvidas na produção da resposta inflamatória. A quercetina também reduziu o nível de expressão dessas proteínas, porém, em altas concentrações.

A maioria das atividades biológicas exercidas pelos flavonóides é devida às suas propriedades de receptores de radicais livres e atividade antioxidante. Além disso, os flavonóides e outros compostos fenólicos

podem exercer ações modulatórias nas células pela interação com um amplo espectro de alvos moleculares centrais da maquinaria de sinalização celular (SOBRATTEE *et al.*, 2005). Para Bito *et al.* (2002), a atividade biológica dos flavonóides é atribuída às suas propriedades moduladoras redox e inibidoras de proteínas cinases. Na Figura 1 se encontram algumas das rotas de sinalização celular em que os flavonóides podem atuar.

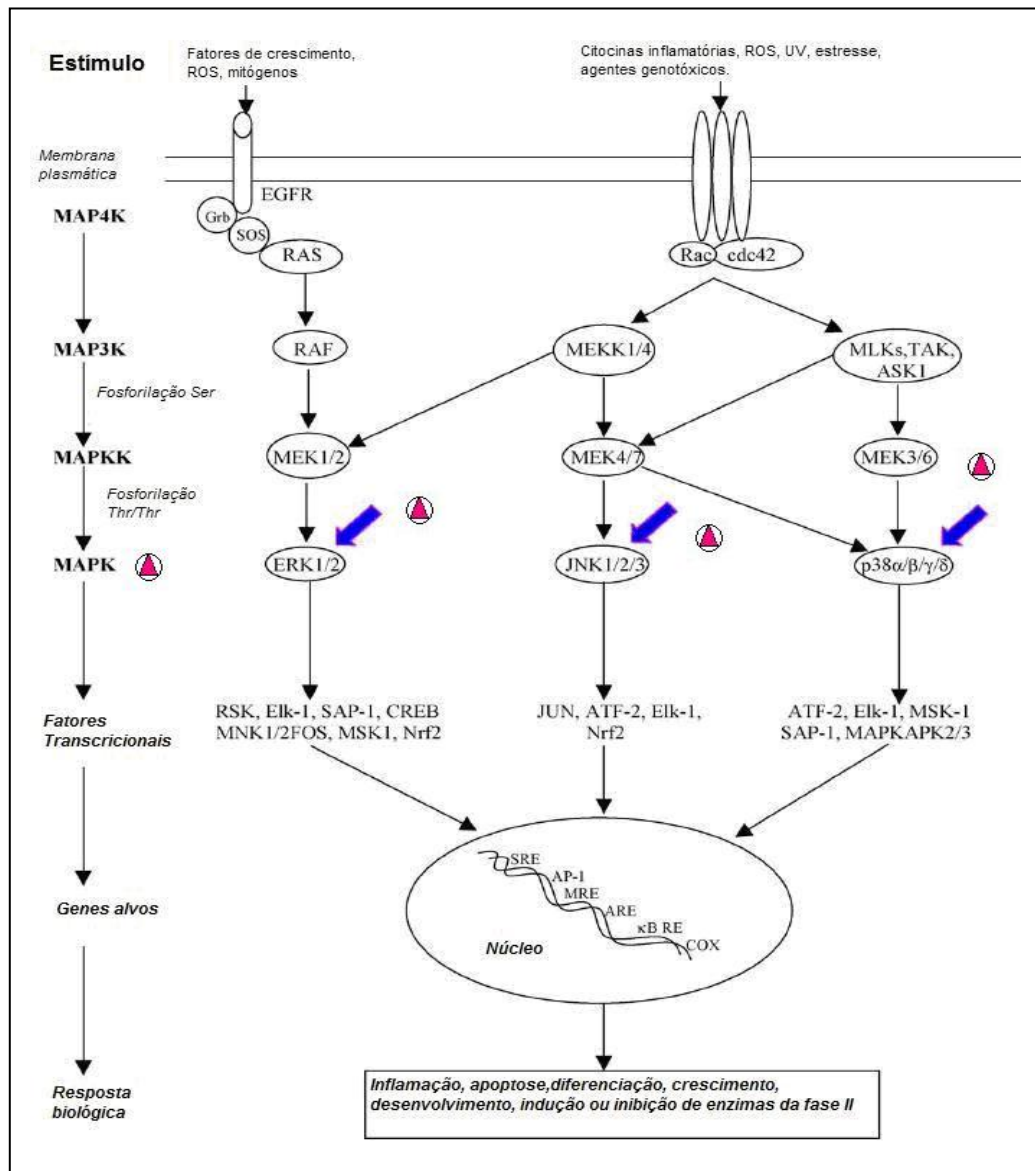


Figura 1: Cascata de sinalização da proteína-quinase ativada por mitógeno (MAPK). Os flavonóides podem modular a ativação da MAPK (setas) direta ou indiretamente pela interação com moléculas alvo *upstream* (SOBRATTEE *et al.*, 2005).

🔺 Ativação

2.1.2.1. Atividade antiviral dos flavonóides

As propriedades antivirais dos flavonóides foram primeiramente descobertas na década de 40, quando a quercetina apresentou um efeito profilático após ter sido administrada na dieta de ratos infectados intracerebralmente com o vírus da raiva. Posteriormente, uma grande quantidade de flavonóides tais como a rutina e morina, dentre muitos outros, tem apresentado atividade contra vários vírus, incluindo parainfluenza, adenovirus, poliovirus, rhinovirus, Sindbis vírus, herpes vírus humano, entre outros (WANG *et al.*, 1998).

Há relatos sobre o efeito antireplicativo de flavonóides sobre vírus animais desde 1975. De acordo com Sá Filho (1995), os flavonóides que possuem atividade antiviral, atuam principalmente sobre a DNA polimerase viral. Muitos estudos já relataram, entretanto, os efeitos de alguns flavonóides sobre a replicação de vírus em animais, onde podem atuar na inativação direta ou podendo afetar a entrada do vírus na célula (SELWAY, 1986; HUDSON, 1990; VISON, 1998).

Já é conhecida a capacidade de alguns flavonóides de se ligarem a proteínas do envelope viral como a gp120 do HIV, dificultando a entrada na célula (adsorção), principalmente a ligação do vírus a receptores CD4+, além de promoverem a regulação negativa dessa célula (LI *et al.*, 2000; DE CLERCQ, 2000). A interação de compostos polifenólicos (dentre eles os flavonóides) com a glicoproteína do envelope viral gp41 do HIV também já foi relatada. Flavanas e catequinas se ligam à porção N-terminal, hidrofóbica e altamente conservada da gp41. Flavonóides encontrados em várias espécies de plantas incluindo o chá preto e em outras plantas utilizadas como chás terapêuticos em algumas comunidades ou regiões, possuem poder anti-HIV inibindo a entrada e replicação do vírus HIV por vários mecanismos de ação (LIU *et al.*, 2005).

Outros grupos de flavonóides como a baicalina já foram descritos também como inibidores do HIV, atenuando a capacidade do vírus de se ligar e ativar receptores celulares. Essa inibição envolve dois tipos de mecanismos, a de ligação do flavonóide a glicoproteínas do envelope e a receptores celulares, principalmente receptores CD4+, e a parada de síntese

de DNA celular que contribui para uma menor replicação viral (LI *et al.*, 2000). Um dos mecanismos antivirais dos flavonóides é também a inibição da transcriptase reversa, dificultando a síntese de DNA viral impedindo a posterior integração ao genoma do hospedeiro (SPEDDING *et al.*, 1989).

Quatro flavonóides, baicaleína, quercetina, quercetagina e miricetina são considerados potentes inibidores da transcriptase reversa do vírus da leucemia murina Rauscher (RLV) e HIV (ONO *et al.*, 1989, 1990, WANG *et al.*, 1998). Estudos comparativos entre flavonóides (hidroxiflavonas, dihidroxi e polihidroxi flavonas e flavanonas) ajudaram a clarear as relações estrutura/atividade e revelaram que a presença de ligações duplas entre as posições 2 e 3 de anel pirona e os dois grupos hidroxila introduzidos nas posições 5 e 7, são um pré-requisito para inibição da atividade de transcriptase reversa (WANG *et al.*, 1998).

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

2.1.3 Quercetina

Na maioria dos alimentos, a quercetina é um dos flavonóides encontrados em maiores concentrações (HARBORNE & WILLIAMS, 2000). Foi descrito por Erlund *et al.* (2000, 2002) que a quercetina é absorvida rapidamente pelo intestino (médio e cólon) e atinge a corrente sanguínea em 1-2 horas, permanecendo no plasma de 15-18 horas e, que, em dietas ricas em flavonóides, a ingestão habitual corresponde a uma variação plasmática entre 13-16 µg/L. Hertog *et al.* (1993) calcularam uma ingestão diária de quercetina até 16 mg/dia.

Segundo Williams *et al.* (2004), a quercetina atua no metabolismo intracelular de fibroblastos humanos levando à formação de produtos de

oxidação intracelular, geração de 2`-glutationil quercetina e a desmetilação de substâncias como a forma de quercetina-O-metilada.

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

A quercetina é um ativo agente antioxidante que reverte a neurotoxicidade induzida por D-galactose resultante de dano oxidativo através da regulação dos níveis de ROS em cérebro de camundongos (LU *et al.*, 2006). De acordo com esses autores, a neuroprotetividade da quercetina pode ser devida: 1- recrutamento de radicais livres, 2- modulação da homeostase intrasinapsomal, 3- aumento da atividade de enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase (SOD) e proteção contra a peroxidação de lipídeos, 4- promoção da expressão do mRNA GAP43.

Juzwiak *et al.* (2005) verificaram um efeito hipolipidêmico da quercetina que pode depender da ativação de algumas enzimas microssomais, evidenciado pela elevação da citocromo P450 contida no fígado de coelhos tratados com a quercetina quando comparados ao grupo de coelhos alimentados com uma dieta de alto teor de lipídeos.

Estudos realizados por Martinez-Flórez *et al.* (2005) confirmaram que a quercetina inibe a produção de óxido nítrico e a expressão de iNOS. A inibição de iNOS pela quercetina pode ser um dos mecanismos responsáveis pelo seu efeito anti-inflamatório (GARCÍA-MEDIAVILLA *et al.*, 2007).

A quercetina também tem atividade antiviral relacionada à capacidade desse composto de se ligar à glicoproteínas do envelope ou ao capsídeo viral, interferindo na ligação e penetração do vírus na célula, além da síntese de DNA (FORMICA & REGELSON, 1995).

2.2. Herpesvírus

Os herpesvirus são vírus que contém uma molécula de DNA fita dupla, circundados por uma substância amorfa denominada tegumento, e

possuem um envelope glicoprotéico. As doenças causadas pelos herpesvirus pertencentes ao gênero *Varicellovirus*, família *Herpesviridae*, subfamília *Alfaherpesvirinae* (ROIZMAN *et al.*, 1992), são as mais comumente observadas em humanos e animais. Dentre os principais representantes de doenças em humanos desta subfamília se encontram os Herpesvírus Humano 1 e 2 (HHV-1 e 2), que causam doenças epiteliais, labiais e genitais, sendo que o primeiro está associado a infecções labiais e o segundo associado a infecções genitais, ambos produzem infecções recrudescentes e casos esporádicos de encefalites (MEYER *et al.*, 2001; PEREZ *et al.*, 2002).

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

A infecção causada pelo Herpesvírus Humano (HHV) foi uma das primeiras infecções a fornecer o princípio que uma doença viral é tratada com sucesso por compostos antivirais. As infecções por herpesvírus estão presentes desde antes das divergências das espécies modernas e, naturalmente, esses vírus têm estabelecido relações extremamente complexas com seus hospedeiros (FIELD *et al.*, 2006). Isto faz com que, mesmo infectando hospedeiros diferentes, haja similaridades nas infecções entre os vírus da mesma subfamília. As similaridades entre os *alfaherpesvírus* podem corresponder ao controle temporal da expressão gênica viral, suas propriedades citolíticas em cultivo celular e sua habilidade em estabelecer latência (ROIZMAN & SEARS, 1990). Para a maioria dos herpesvírus, a glicoproteína C (gC) é considerada a proteína que mais está envolvida no ataque do vírus à célula via receptores Heparina-Like *in vitro* (LIANG *et al.*, 1992).

Vírus tais como os herpesvírus ou HIV podem estabelecer infecções latentes, capacitando os mesmos de escapar das defesas do sistema imune, assim como da terapia antiviral, pois a maioria dos agentes antivirais parece inibir somente a multiplicação viral e não erradicam o vírus (HURAUX *et al.*, 1990).

Durante a latência, todo o genoma viral está presente dentro das células hospedeiras, mas há uma transcrição limitada deste genoma. A descoberta de transcritos associadas à latência (LATs) em HHV, permitiram a identificação de transcritos de RNA específicos, no gânglio trigêmio e bulbo olfatório durante a fase latente (STOOP *et al.*, 1985).

O aciclovir foi desenvolvido na década de 70 e este foi o primeiro agente contra infecções herpéticas devido à sua eficácia e segurança. Ele é um análogo de nucleosídeo que exibe atividade anti-herpética após fosforilação pela enzima timidina cinase viral (SUZUKI *et al.*, 2006). O mecanismo de ação do aciclovir pode ser observado na Figura 2.

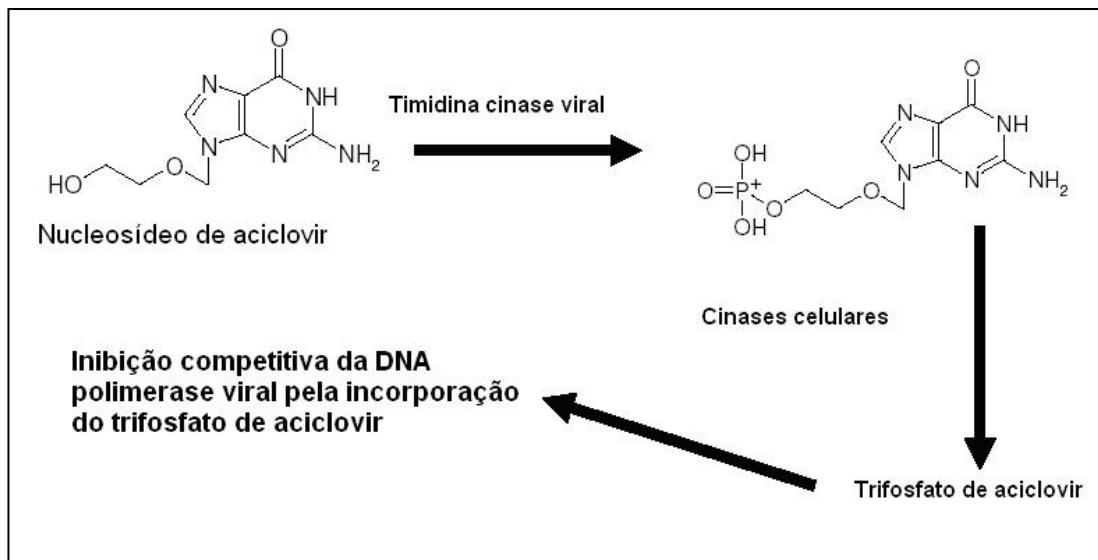


Figura 2: Mecanismo de ação do análogo de nucleosídeo, o aciclovir.

Foi demonstrado que o aciclovir é capaz de reduzir a neurotoxicidade oxidativa induzida pela infecção do HHV por meio da diminuição dos níveis de ácido quinolínico, uma neurotoxina endógena que tem sua concentração aumentada frente à infecção por este vírus (MULLER *et al.*, 2007).

2.2.1. Herpesvírus Bovino 5 (BoHV 5)

O herpesvírus bovino 5 (BoHV-5), um membro da família *Herpesviridae*, subfamília *Alfaherpesvirinae*, é um vírus neurovirulento que infecta bovinos (BELKNAP *et al.*, 1994; MEYER *et al.*, 2001). O vírus é capaz de se replicar em células da mucosa nasal e faríngea. Após infecção de células neurais em tecidos periféricos, o vírus é transportado ao sistema nervoso central (SNC) podendo causar severa encefalite (BELKNAP *et al.*, 1994; ROIZMAN, 1992). Animais que recuperam da infecção primária desenvolvem infecção latente, principalmente em neurônios do gânglio trigêmeo (ROIZMAN, 1992; HUBNER *et al.*, 2005).

Em animais, os principais representantes do gênero *Varicellovirus* são os Herpesvirus Bovino 1 (BoHV-1) que causam infecções respiratórias e genitais em bovinos e os herpesvirus bovino 5 (BoHV-5) que causam meningoencefalites não purulentas em bovinos, ambos relacionados antigenicamente e geneticamente (METZLER *et al.*, 1986; MEYER *et al.*, 2001; PEREZ *et al.*, 2002).

A habilidade para invadir, replicar e causar doença no SNC varia entre os herpesvírus neurotrópicos, como o HSV, o Vírus da Pseudorraiva (SuHV-1), o BoHV-1 e o BoHV-5 (MEYER *et al.*, 2001, PEREZ *et al.*, 2002). Ambos os vírus BoHV-1 e BoHV-5 e os HHV-1 e 2 são neurotrópicos, capazes de causar infecções latentes em seus hospedeiros naturais, preferencialmente no tecido nervoso (em gânglios de neurônios sensoriais e autonômicos e no SNC) (ROIZMAN, 1992; CARON *et al.*, 2002). Bovinos inoculados com BoHV-5 mostraram evidência de extensiva replicação do vírus no cérebro. Ao contrário, bovinos inoculados com BoHV-1 não apresentaram lesões no cérebro e pouco ou nenhum vírus foi recuperado de tecidos neurais (BELKNAP *et al.*, 1994; CHOWDHURY *et al.*, 1997).

As principais portas de entrada do vírus são as superfícies das mucosas dos tratores respiratório e genital. A transmissão é geralmente associada pelo contato íntimo com estas superfícies, mas os BoHV-1 e BoHV-5 são também propagados por aerossóis e secreções corpóreas. O vírus penetra no hospedeiro e liga-se às células epiteliais onde ocorre o

primeiro ciclo de replicação. Do sítio de infecção, o vírus é transportado pelos monócitos para outros órgãos. Em fêmeas gestantes, a viremia pode levar a uma transferência de vírus pela placenta, resultando em abortos. Em bezerros neonatos pode ocorrer a forma septicêmica da infecção, provocada pela viremia (ROIZMAN, 1992; MEYER *et al.*, 2001).

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

Hubner *et al.* (2005) demonstraram que os genes que codificam as glicoproteínas gI e gE e a proteína US9 de BoHV-5 tem um papel significativo na neuropatogenicidade do vírus, assim como para a sua capacidade de induzir latência ou a reativação da infecção em bovinos.

No Brasil, a doença afeta mais frequentemente bovinos jovens, de 6-7 meses de idade até 3 anos (SALVADOR *et al.*, 1998, RIET CORREA *et al.*, 2006). Salvador *et al.* (1998) relataram uma taxa de morbidade e mortalidade que variaram de 0,05 a 5%, caracterizando a ocorrência da enfermidade tanto na forma de surtos quanto na forma de casos isolados.

Segundo Beltrão *et al.* (2000), em uma infecção experimental de coelhos com BoHV-5, eles observaram replicação viral no bulbo olfatório em 48 h após inoculação e no córtex olfatório entre 48-72 h. Em 72 h, o vírus foi detectado no córtex cerebral. Isto demonstra que após a inoculação intranasal, o vírus atinge inicialmente o bulbo olfatório e, sugere que a invasão do SNC a partir da cavidade nasal ocorre inicialmente pela via

olfatória. A detecção de vírus no bulbo olfatório já às 48 h p.i. e a sua ampla distribuição no SNC a partir das 72-96 h p.i. indicam que a invasão e a disseminação do BoHV-5 no encéfalo de coelhos é muito rápida e eficiente. Caron *et al.* (2002) também realizaram um estudo infectando experimentalmente coelhos com o BoHV-5 e verificaram a presença de lesões inflamatórias cerebrais. As mudanças histológicas consistiam de manguitos perivasculares mononucleares, gliose focal (próxima às meninges) e congestão meningeal. Eles também verificaram a capacidade de reativação do vírus dos animais que sobreviveram à infecção aguda, pois após tratamento com dexametasona, o vírus foi detectado por isolamento viral. Animais inoculados, via rota conjuntival, excretaram mais vírus do que aqueles inoculados via intranasal.

Belák *et al.* (1999) verificaram em ovelhas inoculadas experimentalmente um aumento do título de anticorpos a partir do 15º d.p.i. De acordo Belknap *et al.* (1994), animais que não desenvolvem doença aguda após infecção podem tornar-se latentemente infectados. Similarmente a outras infecções por *alfaherpesvírus*, a latência do BoHV-5 pode ser experimentalmente reativada pela administração de corticosteróide.

Segundo Silva *et al.* (1999), ovelhas inoculadas experimentalmente com o BoHV-5 demonstraram como sinais clínicos: tremores na face, bruxismo, ptialismo, incordenação, flexão lateral das patas e cabeça. As mudanças histológicas consistiam de meningite não supurativa, manguitos mononucleares perivascular, gliose focal, necrose neuronal e inclusões intranucleares no cérebro anterior, córtex ventro-lateral e meio do cérebro. Essas ovelhas, após reativação viral, apresentaram liberação viral intermitente em menores títulos e com um menor período de incubação, quando comparado com a infecção aguda.

De acordo com Caron *et al.* (2002), as diferenças na via nervosa utilizada pelo vírus para entrar no SNC durante a reativação *versus* a infecção aguda, pode explicar as diferenças encontradas na distribuição e recuperação do vírus. Esses autores sugerem ainda, que o entendimento da patogênese da infecção latente do BoHV-5 pode contribuir para o entendimento da patogênese de infecções por outros *alfaherpesvírus*.

2.2.2. Herpesvírus Equino 1 (EHV 1)

Os Herpesvírus Equino 1 (EHV-1), um *Alfaherpesvírus*, é um importante patógeno de cavalos, responsáveis por abortos, mortes neonatais e desordens do sistema nervoso (VAN DER MEULEN *et al.*, 2006). Em 1966, o EHV-1 foi isolado pela primeira vez no Brasil por Nilson e Corrêa. Weiblen *et al.* (1994) isolaram o vírus na região sul do Brasil.

O EHV-1 causa uma viremia associada às células, tanto células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) quanto linfócitos. Desta maneira, o EHV-1 pode ser levado a células endoteliais permissivas e, subsequentemente, causar abortos ou desordens no sistema nervoso em cavalos. No entanto, o reconhecimento de PBMC infectadas por EHV-1 circulantes pelo sistema imune não é eficiente (VAN DER MEULEN *et al.*, 2006).

A infecção primária com EHV-1 ocorre via contato direto e inalação de vírus em aerossóis (HARLESS *et al.*, 2006). O EHV-1 inicialmente replica dentro das células epiteliais do trato respiratório e subsequentemente alcançam o tecido linfóide local, incluindo o submandibular, retrofaringeal e linfonodos bronquiais. A entrada dos vírus na célula, a replicação viral e a viremia célula-célula parece ser mediada pela glicoproteína K do envelope viral (VAN MAANEN *et al.*, 2002, NEUBAUER *et al.*, 2004). Linfadenopatia local ocorre quando células epiteliais do trato respiratório e tecido linfóide são destruídas após a replicação e liberação viral (HARLESS *et al.*, 2006). A infecção por EHV-1 pode espalhar sistematicamente através de disseminação hematogênica de linfócitos infectados (viremia associada à célula) para a placenta, feto e SNC. Nestes locais, a vasculite local e a trombose podem levar ao aborto, mortalidade neonatal e mieloencefalite.

Segundo Van der Meulen *et al.* (2006), ponies inoculados intranasalmente com o vírus apresentaram 98% de PBMC infectados com EHV-1 presentes no sangue sem as proteínas do envelope viral em sua superfície. Isto faz com que essas células não sejam reconhecidas pela resposta mediada por anticorpos. Essas proteínas virais não somente não foram detectadas na superfície da célula como também intracelularmente. Somente a proteína imediatamente precoce ICP 22 aparece no citoplasma.

Isto indica que as proteínas do envelope viral estão ausentes nestas células devido ao fato dessas células estarem presentes apenas nos estágios iniciais de infecção.

Os locais de latência para o EHV-1 têm sido identificados em células neuronais do gânglio trigêmio, linfócitos sanguíneos periféricos e tecidos linfóides de cavalos com recrudescência experimentalmente induzida (WELCH *et al.*, 1992; CARVALHO *et al.*, 2000).

Infecções leves ou subclínicas são comuns para o EHV-1 (FOOTE *et al.*, 2006). O tempo de incubação para a forma respiratória da doença está entre 3-10 dias. Os sinais clínicos iniciais incluem febre aguda, depressão, letargia, anorexia, inchaço de linfonodos e descarga nasal serosa profusa, que mais tarde torna-se mucopurulenta. A febre pode ser bifásica com os episódios febris correspondendo a viremia associada à célula. Uma infecção por EHV-1 vasculotrópica pulmonar fatal, causando severo edema pulmonar e hemorragia, vasculite multissistêmica e enterotiflocolitis tem sido demonstrada em cavalos jovens (DEL PIERO *et al.*, 2000; DEL PIERO & WILKINGS, 2001; PATEL & HELDENS, 2005).

Camundongos inoculados intraperitonealmente com diferentes cepas de EHV-1 mostraram diferenças quanto à neuropatogenicidade. No entanto, todas as cepas utilizadas causaram lesões no SNC quando inoculadas via intracerebral ou intranasal. As lesões encontradas apresentaram-se tanto no cérebro quanto no cordão espinhal e se caracterizavam por moderada meningite e manguitos perivascularares. O mecanismo específico para a entrada do vírus no SNC após inoculação intraperitoneal ainda não é claro. Os camundongos mostraram mielite que foi mais severa do que a encefalite. Ao contrário, após inoculação intracerebral ou intranasal com uma mesma cepa, os camundongos desenvolveram severa encefalite e menor mielite. Segundo Hasebe *et al.* (2002), o vírus pode invadir o SNC ou pela rota hematogênica ou por disseminação neural a partir dos plexos mesentéricos.

Não há tratamento específico para a doença respiratória induzida por EHV 1. O uso do aciclovir tem sido restrito a infecções neurológicas e congênitas por este vírus (MURRAY *et al.*, 1998; WILKINGS & SQUARE, 2004). O penciclovir demonstrou diminuir a replicação do EHV-1 em tecidos

respiratórios e reduziu a viremia em camundongos e em cultura de tecidos (DE LA FUENTE *et al.*, 1992).

Embora existam vacinas contra o EHV-1, elas não são muito protetoras e surtos da doença podem ocorrer em rebanhos vacinados. Assim, há uma grande necessidade de um tratamento antiviral efetivo que reduza a replicação e disseminação viral em cavalos afetados. A droga também deve ser efetiva tanto em isolados associados a surtos de aborto quanto a surtos associados a manifestações neurológicas (GARRÉ *et al.*, 2007).

2.3. Parvovírus Canino

O Parvovírus Canino (CPV) foi primeiramente identificado em 1978 nos Estados Unidos (APPEL *et al.*, 1979) e foi denominado CPV tipo 2 (CPV-2) para distingui-lo do Parvovírus canino tipo 1, anteriormente identificado e conhecido como vírus canino minute (BINN *et al.*, 1970).

O CPV-2 é um vírus não envelopado, fita simples de DNA e possui simetria icosaédrica. O seu genoma codifica duas proteínas do capsídeo (VP1 e VP2) e duas proteínas não estruturais (NS1 e NS2). A VP1 e a VP2 são traduzidas a partir de um mesmo RNA gerado por *splicing* alternativo (REED *et al.*, 1988). Geralmente, a replicação do parvovírus é restrita ao núcleo e é dependente das funções celulares. A DNA polimerase, responsável pela síntese da fita complementar desses vírus, é uma polimerase celular expressa em células de mamíferos somente durante a fase S do ciclo celular (BERNS, 1990). Assim, os parvovírus normalmente desenvolvem tropismos por tecidos altamente ativos mitoticamente, tais como epitélio intestinal, medula óssea e tecidos linfóides (URL & SCHMIDT, 2005).

O Parvovírus canino 2 é um dos vírus mais comuns causadores de enterite hemorrágica em cães (CARMICHAEL & BINN, 1981). O CPV-2 é disseminado a partir de cães infectados para cães susceptíveis pela rota fecal-oral e alcança altos títulos nas fezes dos animais infectados (POLLOCK, 1982; CARMICHAEL, 1994; DECARO *et al.*, 2005a). No

intervalo de 3-7 dias após infecção, os cães infectados desenvolvem uma gastroenterite aguda caracterizada por perda de apetite, vômitos, febre, diarreia (frequentemente sanguinolenta) e leucopenia (DECARO *et al.*, 2007a).

No Brasil, infecções causadas por Parvovírus Canino foram primeiramente observadas como casos esporádicos no sudeste do país (HAGIWARA *et al.*, 1980). Subsequentemente ocorreram surtos espalhados por todo o Brasil de enterite canina hemorrágica com alta morbidade e mortalidade (PEREIRA *et al.*, 2000).

O CPV-2 é antigênica e geneticamente relacionado a outros parvovírus de carnívoros, por exemplo, ao vírus da panleucopenia felina (FPLV) que pertence ao subgrupo de parvovírus de felinos dentro do gênero *Parvovirus* e da família *Parvoviridae* (BERNS *et al.*, 2000). Em meados da década de 70, o CPV-2 emergiu rapidamente e se espalhou por todo o mundo e entre 1979 e 1985 ele foi dividido em duas diferentes variantes antigênicas, mas estreitamente relacionadas, CPV-2a e CPV-2b (PARRISH *et al.*, 1991). Uma nova variante tem sido relatada e denominada CPV-2c. Esta variante possui uma mutação, que gera uma troca do resíduo Asp-426 para Glu da proteína do capsídeo, possivelmente conferindo um benefício evolucionário a este vírus (DECARO *et al.*, 2005b).

Decaro *et al.* (2007a) analisaram a carga viral, por PCR em tempo real, em vários tecidos (cérebro, cerebelo, bulbo cerebral, tonsilas, linfonodos retrofaringeal e mesentérico, timo, miocárdio, pulmão, fígado, baço, rins, medula óssea, jejuno, cólon e reto) de cães que haviam morrido sabidamente por parvovirose canina. Eles encontraram o DNA do vírus em todos os tecidos analisados e sugeriram que isso é devido à disseminação do vírus em altos títulos pela corrente sanguínea. Interessantemente, esses autores relataram a presença de DNA em tecido nervoso.

Em cães jovens, a maior parte da proteção contra o parvovírus é feita pela imunização passiva, fornecida pelos anticorpos maternos a prole. Assim, após o declínio do título destes anticorpos, os cães se tornam altamente susceptíveis à infecção. A prevenção da Parvovirose Canina se faz por meio da vacinação das cadelas prenhas e dos filhotes após as 6 semanas de idade. As terapias existentes servem apenas de suporte a

infecção, tais como tratamento da desidratação, por meio de administração de fluidos e eletrólitos ou prevenção de infecções bacterianas secundárias, por meio da administração de antibióticos (MARTIN *et al.*, 2002).

Além da ausência de terapia eficiente contra o parvovírus canino, a vacinação também não se mostra tão segura. Decaro *et al.* (2007b) relataram o aparecimento de sinais clínicos relacionados com a parvovirose logo após a vacinação. De acordo com esses autores, isto pode ser devido à reversão da virulência dos vírus vivos modificados contidos nas vacinas.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPEL, M.J.G., SCOTT, W. F., CARNICHAEL, L.E., 1979. Isolation and immunization studies of canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *The Veterinary Records*, 105, 156-159.
- BELÁK, K., KUCSERA, L., ROS, C., KULCSÁR, G., MAKRANSZKI, L., SOÓS, T., BELÁK, S., 1999. Studies on the pathogenicity of bovine herpesvirus type 5 in sheep. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 22, 207-220.
- BELKNAP, E.B., COLLINS, J.K., AYERS, V.K., SCHULTHEISS, P.C., 1994. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. *Veterinary Pathology*, 31, 358-365.
- BELTRÃO, N., FLORES, E.F., WEIBLEN, R., SILVA, A.M., ROEHE, P.M., IRIGOYEN, L.F., 2000. Infecção e enfermidade neurological pelo herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5): coelhos como modelo experimental. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 20, 4, 144-150.
- BERHOW, M.A., 1998. Flavonoid accumulation in tissue and cell culture. Flavonoids in the living system, Plenum Press, New York.
- BERNS, K.I., BERGOIN, M., BLOORN, M., LEDERMAN, M., MUZYEZKA, N., SIEGL, G., TAL, J., TATTERSALL, P., 2000. Family Parvoviridae. In: van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Cartens, E. B., Estes, M.k., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R., Wickner, R. B. (Eds.), *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses*. Academy Press, New York, 311-323.
- BERNS, K.I., 1990. Parvovirus replication. *Microbiological Reviews*, 54, 316-329.

- BINN, L. N., LAZAR, B. C., EDDY, G. A., KAJIMA, M., Recovery and characterization of a minute virus of canines. *Infection and Immunity*, 1: 503-508. 1970.
- BITO, T., ROY, S., SEN, C.K., SHIRAKAWA, T., GOTOH, A., UEDA, M., ICHIHASHI, M.M PACKER, L., 2002. Flavonoids differentially regulate IFN γ -induced ICAM-1 expression in human keratinocytes: molecular mechanisms of action. *FEBS Letter*, 520, 145-152.
- BRUM, L.P. Atividade antiviral dos compostos fenólicos (Ácidos ferúlico e transcinâmico) e dos flavonóides (Quercetina e kaempherol) sobre os Herpesvirus bovino 1, Herpesvirus bovino 5 e vírus da Cinomose Canina. 2006. 86 f..Dissertação (Doutorado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- CAMPOS, A.M. & LISSI, E.A., 1996. Total antioxidant potential of Chilean wines. *Nutrition Research*, 16, 385-389.
- CAMPOS, A.M., ESCOBAR, J., LISSI, E.A., 1996. The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of *Ilex paraguayensis* extracts and red wine. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 7, 43-49.
- CARMICHAEL, L.E., 1994. Canine parvovirus type-2. An evolving pathogen of dogs. *Ann. Vet. Med.* 135, 459-464.
- CARMICHAEL, L.E., BINN, L.N., 1981. New enteric virus in the dog. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*. 25, 1-27.
- CARON, L., WILKELMANN, E., FLORES, E.F, WEIBLEN, R., 2002. Latent infection by bovine herpesvirus type 5 in experimentally infected rabbits: virus reaction, shedding and recrudescence of neurological disease. *Veterinary Microbiology*, 84, 285-295.

- CARVALHO, R., OLIVEIRA, A., SOUZA, A., PASSOS, L.M.F., MARTINS, A.S., 2000. Prevalence of equine herpesvirus type 1 latency detected by polymerase chain reaction. *Archives of Virology*. 145, 1773-1787.
- CHANG, C., HUANG, W., CHENG, B., HSU, C., LIN, M., 2007. The flavonoid baicalin protects against cerebrovascular dysfunction and brain inflammation in experimental heatstroke. *Neuropharmacology*, 52, 1024-1033.
- CHOWDHURY, S.I., LEE, B.J., MOSIER, D., SUR, JH., OSORIO, F.A., KENNEDY, G., WEISS, M.L., 1997. Neuropathology of Bovine Herpesvirus Type 5 (BHV 5) Meningo-encephalitis in rabbit seizure model. *Journal Comparative Pathology*, 117, 295-310.
- CUSHNIE, T.P.T., LAMB, A.J., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343-356.
- DECARO, N., MARTELLA, V., ELIA, G., DESARIO, C., CAMPOLO, M., LORUSSO, E., COLAIANNI, M.L., LORUSSO, A., BUONAVOGLIA, C., 2007a. Tissue distribution of the antigenic variants of canine parvovirus type 2 in dogs. *Veterinary Microbiology*. 121, 39-44.
- DECARO, N., DESARIO, C., ELIA, G., CAMPOLO, M., LORUSSO, A., MARI, V., MARTELLA, V., BUONAVOGLIA, C., 2007b. Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: A clinical and laboratory diagnostic dilemma. *Vaccine*. 25, 1161-1166.
- DECARO, N., ELIA, G., MARTELLA, V., DESARIO, C., CAMPOLO, M., DI TRANI, L., TARSITANO, E., TEMPESTA, M., BUONAVOGLIA, C., 2005a. A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of

canine parvovirus type 2 DNA in the feces of dogs. *Veterinary Microbiology*, 105, 19-28.

DECARO, N., DESARIO, C., CAMPOLO, M., ELIA, G., MARTELLA, V., RICCI, D., LORUSSO, E., BUONAVOGLIA, C., 2005b. Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type-2 Glu-426 mutant. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17, 133-138.

DE CLERQ, E., 2000. Current lead natural products for the chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Medicinal Research Review*, 20, 5, 329-349.

DE LA FUENTE, R., AWAN, R., FIELD H.J., 1992. The acyclic nucleoside analogue penciclovir is a potent inhibitor of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) in tissue culture and in a murine model. *Antiviral Research*, 18, 77-89.

DEL PIERO, F., WILKINS, P., 2001. Pulmonary vasculotropic EHV-1 infection in equids. *Veterinary Pathology*. 38, 474-475.

DEL PIERO, F., WILKINS, P., TIMONEY, P., KADUSHIN, J., VOGELBACKER, H., LEE, J.W., BERKOWITZ, S.J., LA PERLE, K.M.D., 2000. Fatal nonneurological EHV-1 infection in a yearling filly. *Veterinary Pathology*. 37, 672-676.

DRÖGE W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Review*, 82, 47-95.

ELISABETSKY, E., AMADOR, T.A., LEAL, M.B., NUNES, D.S., CARVALHO, A.C.T., VEROTTA, L., 1997. Merging ethnopharmacology with chemotaxonomy: an approach to unveil bioactive natural products. The case of Psychotria alkaloids as potential analgesics. *Ciência e Cultura*, 49, 378-409.

- ERLUND, L., SILASTE, M.L., ALFTHAN, G., RANTALA, M., KESÄNIEMI, Y., ARO, A., 2002. Plasma concentrations of the flavonoids naringenin, hesperetin and quercetin in human subjects following their habitual diets, or diets high or low in fruits and vegetables. *European Journal Clinical Nutrition*, 56, 891-898.
- ERLUND, L., KOSONEM, T., ALFTHAN, G., 2000. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *European Journal Clinical Pharmacology*, 56, 545-553.
- FIELD, H.J., BISWAS, S., MOHAMMAD, I.T., 2006. Herpesvirus latency and therapy-From a veterinary perspective. *Antiviral Research*, 71, 127-133.
- FISCHER, G., CLEFF, M.B., DUMMER, L.A., PAULINO, N., PAULINO, A.S., VILELA, C.O., CAMPOS, F.S., STORCH, T., VARGAS, G.D., HUBNER, S.O., VIDOR, T., 2007. Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 116: 79-84.
- FLORES E F. Herpesvirus bovino tipo 1 (BHV-1). 1996. Anais. Encontro Internacional de Virologia Molecular Veterinária, Santa Maria, RS, 149-156.
- FOOTE, C.E., LOVE, D.N., GILKERSON, J.R., WELLINGTON, J.E., WHALLEY, J.M., 2006. EHV-1 and EHV-4 infection in vaccinated mares and their foals. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 111, 41-46.
- FORMICA, J.V., REGELSON, W., 1995. Review of biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chemical Toxicology*, 33, 1061-1080.
- GARCÍA-MEDIAVILLA, V., CRESPO, I., COLLADO, P.S., ESTELLER, A., SÁNCHEZ-CAMPOS, S., TUNÓN M.J., GONZÁLEZ-GALLEGO, J.,

2007. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *European Journal of Pharmacology*, 557, 221-229.

GARRÉ, B., VAN DER MEULEN, K., NUGENT, J., NEYTS, J., CROUBELS, S., DE BACKER, P., NAUWYNCH, H., 2007. *In vitro* susceptibility of six isolates of equine herpesvirus 1 to acyclovir, ganciclovir, cidofovir, adefovir, PMEDAP and foscarnet. *Veterinary Microbiology*, in press.

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

GOTTILIEB, O.R., BORIN, M.R.M.B., KAPLAN, M.A.C., 1995. Biosynthetic interdependence of lignins and secondary metabolites in Angiosperms. *Phytochemistry*, 40, 1, 99-113.

GUO, Q., ZHAO, B., PACKER, L., 1999. Electron spin resonance study of free radicals formed from a procyanidin-rich pine (*Pinus maritima*) bark extract, pycnogenol. *Free Radical in Biology and Medicine*, 27, 1308-1312.

HAGIWARA, M.K., JULY, J.R., BACARO, M.R., ÂNGELO, M.J.O., 1980. Enterite hemorrágica em case associada à infecção por um parvovírus. *Arquivo do Instituto Biológico (São Paulo)*. 47, 47-49.

HAMBURGUER, M., HOSTETTMANN, K., 1991. Bioactivity in plants:the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*. 30, 3864-3874.

- HAN, K.K., SOARES, J.S., JÚNIOR, M., FERREIRA, A., 2002. Efeitos dos fitoestrogênios sobre alguns parâmetros clínicos e laboratoriais no climatério. *RBGO*, 24, 8.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., 2000. Free radical in biology and medicine. Ed: 3, printed: Clarendon, Oxford, 936p.
- HARBORNE, J.B., WILLIAMS, C.A., 2000. Advances in flavonoid research. *Phytochemistry*, 55, 481-504.
- HARBORNE, J.B., BAXTER, H., 1999. The handbook of natural flavonoids, Vols 1 and 2. Chichester, UK: John Wiley and Sons.
- HASEBE, R., KIMURA, T., SATO, E., OKAZAKI, K., OCHIAI, K., WADA, R., UMEMURA, T., 2002. Equine Herpesvirus-1-induced encephalomyelitis in mice: a comparative study of neuroadapted virus and its parental strain. *Journal Comparative Pathology*. 127, 118-125.
- HARLESS, W., PUSTERIA, N., 2006. Equine herpesvirus 1 and 4 respiratory disease in the horse. *Clinical Techniques in Equine Practice*.
- HAVSTEEN, B.H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96, 67-202.
- HAVSTEEN, B.H., 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemistry Pharmacology*, 32, 1141-148.
- HERMANN M.S., 2002. Aspectos nutricionais dos flavonóides. In: Estresse oxidativo e antioxidantes. Ed: Ulbra, Porto Alegre, p.105-119.
- HERTOG, M.G.L., FESKENS, E.J.M., HOLLMAN, P.C.H., KATAN, M.B., KROMHOUT, D. 1993. Dietary antioxidant flavonoids an risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet* , 342:1007-1011.

- HUBNER, S.O., OLIVEIRA, A.P., FRANCO, A.C., ESTEVES, P.A., SILVA, A.D., SPILKI, F.R., RIJSEWIJK, F.A.M., ROEHE, P.P., 2005. Experimental infection of calves with a gI, gE, US9 negative bovine herpesvirus type 5. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease*, 28, 187-196.
- HUDSON, J.B., 1990. Antiviral compounds from plants. CRC Press Florida, USA, 119-131.
- HURAUX, J.M., INGRAND, D., AGUT, H., 1990. Perspectives in antiviral chemotherapy. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 4, 357-372.
- JUZWIAK, S., WÓJCICKI, J., MOKRZYCKI, K., MARCHLEWICZ, M., BIATECKA, M., WENDA-ROZEWICKA, L., GAWRONSKA-SZKLARZ, B., DROZDZIK, M., 2005. Effect of quercetin on experimental hyperlipidemia and atherosclerosis in rabbits. *Pharmacological Reports*, 57, 604-609.
- KINSELLA, J.E., FRANKEL, E., GERMAN, B., KANNER, J., 1993. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology*, 85-89.
- KWON, K.H., MURAKAMI, A., TANAKA, T., OHIGASHI, H., 2005. Dietary rutin, but not its aglycon quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression. *Biochemistry Pharmacology*, 69, 395-406.
- LAHOUEL, M., BOULKOUR, S., SEGUENI, N., FILLASTRE, J.P., 2004. Effect protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathione hépatique. *Pathologie Biologie*, 52, 314-322.

- LEDNICER, D., NARAYANAN, V.L., 1993. Acquisition and screening of natural products as potential anticancer and AIDS antiviral agents. In: Colegate, .M., Molyneux, R.J. (Eds.). *Bioactive Natural Products- Detection, isolation, and structural determination*, Florida, pp.159-172.
- LI, B.Q., TAO, FU, DONGYAN, Y., KANG, E.A., 2000. Flavonoid Baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276, 534-538.
- LIANG, X., BABIUK, L.A., ZAMB, T.J., 1992. An in vivo study of a glycoprotein gIII-negative bovine herpesvirus 1 (BHV-1) mutant expressing beta-galactosidase: Evaluation of the role of gIII in virus infectivity and its use as a vector for mucosal immunization. *Virology*, 189, 629.
- LIN, J., TANG, C., 2007. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*, 101, 140-147.
- LIU, S., LU, H., ZHAO, Q., HE, Y., NIU, J., DEBNATH, A.K., WU, S., JIANG, S., 2005. Theaflavin derivatives in black tea and catechin derivatives in green tea inhibit HIV-1 entry by targeting gp41. *Biochimica et Biophysica Acta*, 25, 270-281.
- LU, J., ZHENG, Y., LUO, L., WU, D., SUN, D., FENG, Y., 2006. Quercetin reverses D-galactose induced neurotoxicity in mouse brain. *Behavioural Brain Research*, 171, 251-260.
- MARTIN, V., NAJBAR, W., GUEGUEN, S., GROUSSON, D., EUN, H., LEBREUX, B., AUBERT, A., 2002. Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled challenge trial. *Veterinary Microbiology*, 89, 115-127.

- MARTÍNEZ-FLÓREZ, S., GUTIÉRREZ, M.B., SÁNCHEZ-CAMPOS, S., GONZÁLEZ-GALLEGO, J., TUÑÓN, M.J., 2005. Quercetin prevents nitric oxide production and nuclear factor kappa B activation in interleukin-1 β -activated rat hepatocytes. *Journal Nutrition*, 135, 1359-1365.
- METZLER, A.E., SCHUDEL, A.A., ENGELS, M., 1986. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. *Archives Virology*, 87, 205-217.
- MEYER, G., LEMARIE, M., ROS, C., BELAK, K., GABRIEL, A., CASSART, D., COIGNOUL, F., BELAK, S., THIRY, E. 2001. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus type 5. *Archives Virology*, 146, 633-652.
- MIDDLETON JR., E. AND CHITHAN, K., 1993. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harborne JB, editor. *The flavonoids: advances in research since 1986*. London, UK: Chapman and Hall.
- MULLER, A.C., DAIRAM, A., LIMSON, J.L, DAYA, S., 2007. Mechanisms by which acyclovir reduces the oxidative neurotoxicity and biosynthesis of quinolinic acid. *Life Sciences*, 80, 918-925.
- MURRAY, M.J., DEL PIERO, F., JEFFREY, S.C., DAVIS, M.S., FURR, M.O., DUBOVI, E.J., MAYO, J.A., 1998. Neonatal equine herpesvirus type 1 infection on a thoroughbred breeding farm. *Journal Veterinary Internal Medicine*. 12, 36-41.
- NEUBAUER, A., OSTERRIEDER, N., 2004. Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) glycoprotein K is required for efficient cell-to-cell spread and virus egress. *Virology*, 329, 18-32.

- NILSON, M.R., CORREA, W.M., 1966. Isolamento do vírus do aborto equino no Estado de São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico*, 33, 2, 23-25.
- ONO, K., NAKANE, H., FUKUSHIMA, M., CHERMANN, J.C., BARRE-SINOUSI, F., 1990. Differential onhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. *European Journal Biochemistry*, 190, 469-476.
- ONO, K., NAKANE, H., FUKUSHIMA, M., CHERMANN, J.C., BARRE-SINOUSI, F., 1989. Inhibition of reverse transcriptase activity by a flavonoid compound, 5,6,7-trihydroxyflavone. *Biochemistry and Biophysical Research Communication*, 160, 982-987.
- ORSOLIC, N., TERZIC, S., SVER, L., BASIC, I., 2005. Polyphenolic compounds from the propolis modulate immune responses and increase host resistance to tumor cells. *Food Agriculture Immunology*, 16, 165-179.
- PARRISH, C.R., AQUADRO, C.F., STRASSHEIM, M.L., EVERNANN, J.F., SGRO, J.-Y., MOHAMMED, H.O., 1991. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *Journal of Virology*, 65, 6544-6552.
- PATEL, J.R., HELDENS, J., 2005. Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) – epidemiology, disease and immunoprophylaxis: a brief review. *Veterinary Journal*, 170, 14-23.
- PEREIRA, C.A.D, MONEZI, T.A., MEHNERT, D.U., D'ANGELO, M., DURIGON, E.L., 2000. Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. *Veterinary Microbiology*, 75, 127-133.

- PEREZ, S.E., BRETSCHEIDER, C., LEUNDA, M.R., OSÓRIO, F.A., FLORES, E.F., ODEÓN, A.C., 2002. Primary infection, latency and reactivation of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in the bovine nervous system. *Veterinary Pathology*, 39, 437-444.
- POLLOCK, R.V., 1982. Experimental canine parvovirus infection in dogs. *Cornell Veterinary*. 72, 103-119.
- REED, A.P., JONES, E.V., MILLER, T.J., 1988. Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *Journal of Virology*, 62, 266-276.
- RIET-CORREA G., DUARTE, M.D., BARBOSA, J.D., OLIVEIRA, M.C., CERQUEIRA, V.D., BRITO, M.F., RIET-CORREA, F., 2006. Meningoencefalite e poliencfalomalacia causadas por Herpesvírus bovino-5 no estado do Pará. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 26, 44-46.
- ROIZMAN, B., DESROSIERS, R.C., FLECKENSTEIN, B., LOPEZ, C., MINSON, A.C., STUDDERT, M.J., 1992. The family herpesviridae: an update. *Archives of Virology*, 123, 425-449.
- ROIZMAN, B., SEARS, A.E., 1990. Herpes simplex viruses and their replication. *Virology*, In: *Virology*, New york, Raven Press.
- SAIJA, A., SCALESE, M., LANZA, M., MARZULLO, D., BONINA, F., CASTELLI, F., 1995. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radical in Biology and Medicine*, 19, 4, 481-486.
- SÁ FILHO, D.J., 1995. Efeito do extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* e de diferentes flavonóides na multiplicação do vírus Mayaro. Monografia: Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. Monografia, p.40.

- SALVADOR, S.C., LEMOS, R.A.A., RIET-CORREA, F., 1998. Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvirus no Mato Grosso do Sul e São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 18, 2, 76-83.
- SANNOMIYA, M., BRITO, A.R.M., VILEGAS, W., 2003. XII Congresso Ítalo-Latino-Americano de Etnomedicina. Estudo químico preliminar do extrato polar de *Byrsonima crassa* (Malpighiaceae), MG. Anais.
- SELWAY, A., 1986. Plant flavonoids in biology and medicine. *Biochemical, Pharmacological and Structure - Activity Relationships*, 213, 521-536.
- SERKEDJIVA, J., IVANCHEVA, S., 1999. Antiherpes virus activity of extracts from medicinal plant *Geranium sanguineum* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 64, 59-68.
- SILVA, A.M., WEIBLEN, R., IRIGOYEN, L.F., ROEHE, P.M., SUR, H.J., OSÓRIO, F.A., FLORES, E.F., 1999. Experimental infection of sheep with bovine herpesvirus type-5 (BHV 5): acute and latent infection. *Veterinary Microbiology*, 66, 88-99.
- SILVER, L., BOSTIN, K., 1990. Screening of natural products for antimicrobial agents. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Disease*, 9, 455-461.
- SOOBRAATTEE, M.A., NEERGHEEN, V.S., LUXIMON-RAMMA, A., ARUOMA, O.I., BAHORUN, T., 2005. Phenolics as potencial antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research*, 579, 200-213.
- SPEEDING, G., RATTY, A., MIDDLETON, F.Jr., 1989. Inhibition of reverse transcriptase by flavonoids. *Antiviral Research*, 12, 99-110.

- SPENCER, J.P.E., KUHNLE, G.G., WILLIANS, R.J., 2003. Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its *in vivo* metabolites. *Biochemistry Journal*, 372, 173-181.
- STOOP, W., ROCK, D., FRASER, N., 1985. Localization of herpes simplex virus in the trigeminal and olfactory systems of the mouse central nervous system during acute and latent infections by *in situ* hybridization. *The Journal of General Virology*, 51, 27-38.
- SUZUKI, M., OKUDA, T., SHIRAKI, K. 2006. Synergistic antiviral activity of acyclovir and vibarabine against herpes simplex virus type 1 and 2 and varicella-zoster virus. *Antiviral Research*, 72, 157-161.
- URL, A., SCHMIDT, P., 2005. Do canine parvoviruses affect canine neurons? An immunohistochemical study. *Research in Veterinary Science*, 79, 57-59.
- VAN DER MEULEN, K., CAIJ, B., PENZAERT, M., NAUWYNCK, H., 2006. Absence of viral envelope proteins in equine herpesvirus 1-infected blood mononuclear cells during cell-associated viremia. *Veterinary Microbiology*, 113, 265-273.
- VAN MAANEN, C., 2002. Equine herpesvirus 1 and 4 infectious: an update. *Veterinary Quarterly*, 24, 55-58.
- VISON, J.A., 1998. Flavonoids in foods as *in vitro* and *in vivo* antioxidants. Flavonoids in the living system. Manthey and Buslig Plenum Press, New York.
- WANG, H.K., XIA, Y., YANG, Z.Y., JIANG, S., 1998. Recent advances in the discovery and development of flavonoids and their analogues as

antitumor and anti-HIV agents. Flavonoids in the Living System. Manthey and Buslig Plenum Press, New York.

WEIBLEN, R., RABUSKE, M., REBELATTO, M.C., NOBRE, V.M.T., CANABARRO, T.F., 1994. Abortions due to equine herpesvirus in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27, 1317-1320.

WELCH, H.M., BRIDGES, C.G., LYON, A.M., *et al.*, 1992. Latent equid herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues. *Journal General Virology*, 73, 261-268.

WILKINGS, P.A., SQUARE, K., 2004. Acyclovir in the treatment of EHV-1 myeloencephalopathy, in 2004 Scientific Proceedings, 22nd Annual Meeting of the American College of Veterinary Internal Medicine. Minneapolis, MN, American College of Veterinary Internal Medicine.

WILLIAMS, J.R., JEREMY, P.E.S., RICE-EVANS, C., 2004. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?. *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 7, 838-849.

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

CAPÍTULO 1

Avaliação da atividade antiviral da quercetina contra o Parvovírus Canino *in vitro*

**VIÇOSA
ABRIL DE 2007**

RESUMO

O tratamento de infecções em pequenos animais é comum, no entanto, poucos medicamentos são utilizados para controle de infecções causadas por vírus. O Parvovírus Canino (CPV) é um vírus pertencente à família *Parvoviridae* e seu genoma é constituído de uma fita simples de DNA. O CPV é causador de uma das principais enfermidades que aflige cães, sendo um dos agentes mais comuns causadores de enterite hemorrágica. O objetivo desse trabalho foi o de avaliar o potencial antiviral da quercetina contra o Parvovírus Canino *in vitro*. Para isto, foram realizados os ensaios de Inativação Direta, *End Point* e *Timing of Addition*. Na Inativação Direta do vírus, foi possível verificar uma redução de 10 vezes no título viral. No tratamento das células com a quercetina antes da inoculação viral, a redução foi até de 200 vezes (99,0% de inibição). Na incubação da quercetina durante cada passo da infecção viral, a inibição foi maior quando a quercetina foi adicionada no momento da adsorção (inibição de 99,0%). Os resultados obtidos sugerem que a quercetina atua principalmente nos passos iniciais da infecção viral e, que provavelmente, isto deve acontecer por meio da ligação da quercetina aos receptores celulares. Com o intuito de realizar um estudo posterior da atividade antiviral da quercetina em cães, foi feito um ensaio piloto em que foi testada a administração da quercetina via intravenosa em uma dose de 15 mg/kg, 2 vezes ao dia. Parâmetros indicadores de nefro e hepatotoxicidade, como dosagem de uréia, creatinina, fosfatase alcalina, aspartato e alanina aminotransferases foram analisados. Nos 3 animais utilizados neste ensaio piloto, os valores encontrados para os parâmetros testados permaneceram na faixa dos valores normais de referência. Assim, pode-se sugerir que a quercetina atue como um possível candidato na terapia contra o Parvovirus Canino. Estudos mais apurados devem ser realizados com a finalidade de se comprovar a atividade terapêutica da quercetina *in vitro* e *in vivo*.

ABSTRACT

The treatment of infections in small animals is common. However, few medications are used for control of infections caused by virus. Canine Parvovirus (CPV) is a virus belonging to the family *Parvoviridae* and its genome is constituted of a simple strand of DNA. CPV cause one of the main illnesses that afflict dogs, being one of the most common agents of hemorrhagic enteritis. The objective of that work it was evaluate the potential antiviral of the quercetin against Parvovirus Canine *in vitro*. For this, the assays of Inactivating Direct, End Point and Timing of Addition were accomplished. In direct Inactivation of the virus, it was possible to verify a reduction of 10 times in the viral title. In the treatment of the cells with the quercetin before the inoculation viral, the reduction went until of 200 times (99,0% of inhibition). In the incubation of the quercetin during each step of the infection viral, the inhibition went larger when quercetin was added in the moment of the attachment (inhibition of 99,0%). The obtained results suggest that quercetin acts mainly in the initial steps of the infection viral and, that probably, this should happen by means of the connection of the quercetin to the cellular receptors. With the intuition of accomplishing a posterior study of the activity antiviral of the quercetin in dogs, it was made a pilot assay in that the administration of the quercetin was tested intravenous in a dose of 15 mg/kg, 2 times a day. Indicative parameters of toxicity in kidneys and liver, as urea, creatinina, alkaline phosphatase, aspartate and alanine aminotransferases were analyzed. In the 3 animals used in this pilot assay, the values found for the tested parameters stayed in the strip of the normal values of reference. Thus, it can be suggested that the quercetin acts like a possible candidate in the therapy against Canine Parvovirus. More studies should be accomplished with the purpose of being proven the therapeutic activity of the quercetin *in vitro* and *in vivo*.

1 INTRODUÇÃO

O tratamento de infecções virais em pequenos animais é praticado e faz parte de um importante segmento da medicina veterinária com significativos avanços. No entanto, ainda não existem terapias eficientes para o controle de infecções virais importantes como é o caso da Parvovirose Canina.

O Parvovírus Canino (CPV) foi primeiramente identificado em 1978 nos Estados Unidos (APPEL *et al.*, 1979) e foi denominado CPV tipo 2 (CPV-2). No Brasil há relatos da infecção causada pelo Parvovírus Canino desde 1980 (HAGIWARA *et al.*, 1980).

Geralmente, a replicação do Parvovírus é restrita ao núcleo e é dependente das funções celulares. A DNA polimerase, responsável pela síntese da fita complementar desses vírus, é uma polimerase celular expressa em células de mamíferos somente durante a fase S do ciclo celular (BERNS, 1990). Assim, os Parvovírus normalmente desenvolvem tropismos por tecidos altamente ativos mitoticamente, tais como epitélio intestinal, medula óssea e tecidos linfóides (URL & SCHMIDT, 2005).

O Parvovírus Canino tipo 2 é um dos vírus mais comuns causadores de enterite hemorrágica em cães (CARMICHAEL & BINN, 1981). O CPV-2 é disseminado a partir de cães infectados para cães susceptíveis pela rota fecal-oral e alcança altos títulos nas fezes dos animais infectados (POLLOCK, 1982; CARMICHAEL, 1994; DECARO *et al.*, 2005). No intervalo de 3-7 dias após infecção, os cães infectados desenvolvem uma gastroenterite aguda caracterizada por perda de apetite, vômitos, febre, diarreia (frequentemente sanguinolenta) e leucopenia (DECARO *et al.*, 2007a).

Em cães jovens, a maior parte da proteção contra o Parvovírus é feita através de imunização passiva, fornecida pelos anticorpos maternos a prole. Assim, após o declínio do título destes anticorpos, os cães se tornam altamente susceptíveis a infecção. A prevenção para a Parvovirose Canina se faz por meio da vacinação das cadelas prenhas e dos filhotes após as 6 semanas de idade. As terapias existentes servem apenas de suporte a infecção, tais como, tratamento da desidratação, por meio de administração

de fluidos e eletrólitos ou prevenção de infecções bacterianas secundárias, por meio da administração de antibióticos (MARTIN *et al.*, 2002).

Além da ausência de terapia eficiente contra o Parvovírus Canino, a vacinação também não se mostra segura. Decaro *et al.* (2007b) relataram o aparecimento de sinais clínicos relacionados com a Parvovirose em animais logo após a vacinação. De acordo com estes autores, isto pode ser devido à reversão da virulência dos vírus vivos modificados contidos nas vacinas.

Dessa maneira, faz-se necessário o desenvolvimento de terapias eficazes contra este vírus. O objetivo deste trabalho consistiu na avaliação da atividade antiviral do flavonóide quercetina contra o Parvovírus Canino *in vitro*. Além disso, foi feito um ensaio piloto, *in vivo*, para avaliar alguns parâmetros de toxicidade da quercetina em cães.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Células e vírus

Para a realização dos ensaios *in vitro* foram utilizadas células de linhagem de rim de felino (CRFK). As células foram mantidas em meio essencial mínimo (MEM) (SIGMA-ALDRICH) contendo penicilina (1,6 mg/L) (CULTILAB), estreptomicina (0,4 mg/L) (CULTILAB), suplementadas com soro fetal bovino (10%) (CULTILAB). Foi utilizada uma cepa vacinal de Parvovírus Canino obtida do Laboratório Hertape Ltda.

2.2. Flavonóide

A quercetina [3,3',4',5,6-Pentahydroxyflavone] (quercetin dihydrate) foi adquirida da empresa SIGMA-ALDRICH e a mesma foi preparada, para os ensaios *in vitro*, em dimetilsulfóxido (DMSO) (Nuclear) em uma concentração estoque de 10 mg/mL e armazenada a -20°C. Para a realização de um ensaio piloto *in vivo*, foi preparada uma solução aquosa de quercetina em uma concentração de 50 mg/mL. A solução de quercetina utilizada para a aplicação intravenosa nos animais foi feita pela solubilização da quercetina em dimetilsulfóxido (DMSO). Esta solução foi adicionada gota a gota em uma solução salina estéril com a adição de 0,5% (p/v) de soro albumina bovina (BSA) (SIGMA-ALDRICH). A solução foi esterilizada por filtração em membrana de nitrocelulose com 0,22 µm de poro (MILLIPORE).

2.3. Preparo dos estoques de vírus e titulação

Os vírus foram inoculados em monocamadas semiconfluentes de células e após a manifestação do efeito citopático (ECP), as células foram congeladas e descongeladas duas vezes e centrifugadas a 500 g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e aliquoteado (estoque). Esse procedimento foi realizado até que se alcançasse o título viral desejado. Os estoques virais foram titulados pelo método de TCID₅₀ como descrito por Reed & Muench (1938).

2.4. Análise *in vitro*

2.4.1. Análise do efeito citotóxico da quercetina

Monocamadas das células CRFK com tapetes celulares semiconfluentes em microplacas de 96 poços, foram tratadas com concentrações de quercetina que variaram de 1 a 90 µg/mL e incubadas em estufa (Shell Lab, IR2424) a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. As microplacas foram monitoradas sob microscopia óptica diariamente durante 4 dias. A citotoxicidade foi determinada pelo efeito na morfologia e viabilidade celular (perda da monocamada, granulação e vacuolização no citoplasma) em relação ao aspecto das células não tratadas (controle). A citotoxicidade também foi determinada pelo método colorimétrico baseado na redução do 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,-difeniltetrazolium brometo (MTT) (SIGMA-ALDRICH) por enzimas mitocondriais (MOSMANN, 1983). No 4º dia após incubação com a quercetina, as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS) pH 7,2 por duas vezes e, em seguida, foi adicionado o MTT 0,5 mg/mL. As células foram incubadas por 4 horas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Posteriormente, o sal formado foi solubilizado pela adição de isopropanol (SIGMA-ALDRICH)-HCl 0,04 N. A densidade óptica (OD₅₅₀) foi determinada por espectrofotometria. A porcentagem de células tratadas viáveis foi calculada em relação ao controle não tratado (% de células = $OD_{exp} / OD_{célula\ controle} \times 100$). Foi determinada a CT₅₀ que é a concentração necessária para reduzir a densidade óptica em 50%. A partir deste experimento, foi determinada a concentração máxima não tóxica para as células. Para esta determinação, foi feita a análise estatística utilizando-se o teste t de Student no programa EXCEL versão 2003 (MICROSOFT).

2.4.2. Ensaio de Inativação Direta (*Assay Inactivating Direct* – AID)

Os vírus foram incubados com a quercetina em concentração que não excedeu a máxima não tóxica. Nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 minutos após incubação, uma alíquota dessa suspensão foi titulada. A atividade antiviral foi determinada pela redução no título viral em relação ao controle visualizada pela redução do ECP nas células infectadas. Como controle de

vírus utilizou-se uma alíquota do CPV submetido aos tempos de incubação, titulados a cada passo, e como controle da substância incubou-se a quercetina na concentração final utilizada. Foi considerada inibição significativa àquela superior a 1 log (90% de inibição).

2.4.3. Ensaio *End Point*

Neste ensaio, monocamadas das células semiconfluentes em microplacas de 96 poços foram incubadas por 1 h com a quercetina em diferentes concentrações, inferiores à concentração máxima não tóxica. Foi avaliada a infectividade do vírus, por modificações celulares que indiquem resistência viral das células. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas por duas vezes com PBS e o vírus foi inoculado. A atividade antiviral foi avaliada pela redução no ECP dos vírus inoculados em monocamadas celulares tratadas em relação aos vírus inoculados em monocamadas celulares não tratadas (controle). Foi considerado inibição significativa aquela superior a 1 log.

2.4.4. Tratamento *Timing of Addition*

O efeito antiviral da quercetina foi avaliado seguindo a adição desta substância em diferentes tempos relativos à infecção viral. Monocamadas semiconfluentes de células foram incubadas com MEM ou MEM contendo a quercetina por 1 h (pré-tratamento das células), lavadas duas vezes com PBS e posteriormente inoculadas com o vírus. Foi inoculada a suspensão viral com e sem quercetina (efeito na adsorção) e esta foi mantida por 1 h a 4°C para prevenir a internalização do vírus. Após a adsorção, as células foram lavadas duas vezes com PBS e foi adicionado meio comum e meio contendo a quercetina e incubadas por 1 h para permitir a penetração do vírus (efeito na penetração). As células foram novamente lavadas com PBS por duas vezes. Meio contendo ou não a quercetina foram adicionados e as células foram cultivadas por 72 h a 37°C (efeito após a infecção viral). A atividade antiviral foi avaliada pela redução no efeito citopático. Foi considerado inibição significativa àquela superior a 1 log.

2.5. Ensaio piloto *in vivo*

No intuito de avaliar uma possível nefro e hepatotoxicidade da quercetina em cães, foi realizado um ensaio piloto em 3 cães com 3 meses de idade, fêmeas, raça não definida (RDN), tratadas por um período de 5 dias com quercetina via intravenosa, duas vezes ao dia, em uma dose de 15 mg/kg. A escolha da administração por via intravenosa foi feita porque cães demonstrando sinais clínicos compatíveis com a infecção causada pelo Parvovírus Canino, frequentemente apresentam vômitos, o que impossibilitaria um tratamento via oral. Além disso, os animais também receberam tratamento com antibiótico (Sulfadiazina+trimetoprim 30 mg/kg duas vezes ao dia, via subcutânea). O tratamento com antibiótico foi realizado pelo fato de ser este um procedimento padrão para animais com Parvovirose Canina. Dessa maneira, foi possível verificar se a associação antibiótico+quercetina poderia causar alguma alteração nefro-hepática no animal. O sangue dos animais foi coletado antes de se iniciar o tratamento e nos dias 3, 5 e 7 após o início do tratamento. Como indicadores de nefrotoxicidade foram dosados os teores de creatinina e uréia (KIT LABTEST). Como indicadores de hepatotoxicidade foram dosadas as enzimas fosfatase alcalina (AP), aspartato-transaminase (AST) e alanina-transaminase (ALT) (KIT BIOCLIN). As análises foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Veterinária/UFV.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Ensaios *in vitro*

Para a realização dos ensaios de atividade antiviral *in vitro*, foi necessário determinar a concentração máxima não tóxica da quercetina para a linhagem utilizada, CRFK. Com esse objetivo, a quercetina foi incubada em monocamadas semiconfluentes de CRFK e a observação de alterações celulares foi feita por um período de 4 dias por microscopia óptica. Após os 4 dias de incubação, a viabilidade celular também foi avaliada pelo método colorimétrico baseado na redução do sal de tetrazolium (MTT) pelas células viáveis. Com isso, foi possível determinar uma concentração máxima de trabalho de 5 µg/mL. Acima dessa concentração, foi observada vacuolização do citoplasma, morte e desprendimento do tapete celular. Pelo ensaio colorimétrico também foi observada diferença estatística entre as células tratadas em relação ao controle de células (sem incubação da quercetina) a partir desta concentração. A concentração necessária para reduzir a densidade óptica em 50% (CT₅₀) calculada pela fórmula ($\% \text{ de células} = \text{OD}_{\text{exp}} / \text{OD}_{\text{célula controle}} \times 100$) foi determinada a 15 µg/mL, acima da concentração máxima não tóxica.

Os resultados da atividade antiviral foram expressos pela identificação do efeito citopático (ECP) e redução do título viral. A atividade da quercetina sobre o Parvovírus Canino foi determinada a partir de 3 ensaios. O primeiro deles consistiu na incubação da quercetina com o Parvovírus Canino (CPV) antes da inoculação em monocamadas celulares. Neste ensaio, denominado de ensaio de Inativação Direta (AID), observou-se uma redução no título viral de 90,0 % (Figura 1). A concentração de quercetina incubada com o vírus foi de 40 µg/mL. Esta concentração foi superior à máxima não tóxica, pois, após a incubação foram feitas diluições para a titulação.

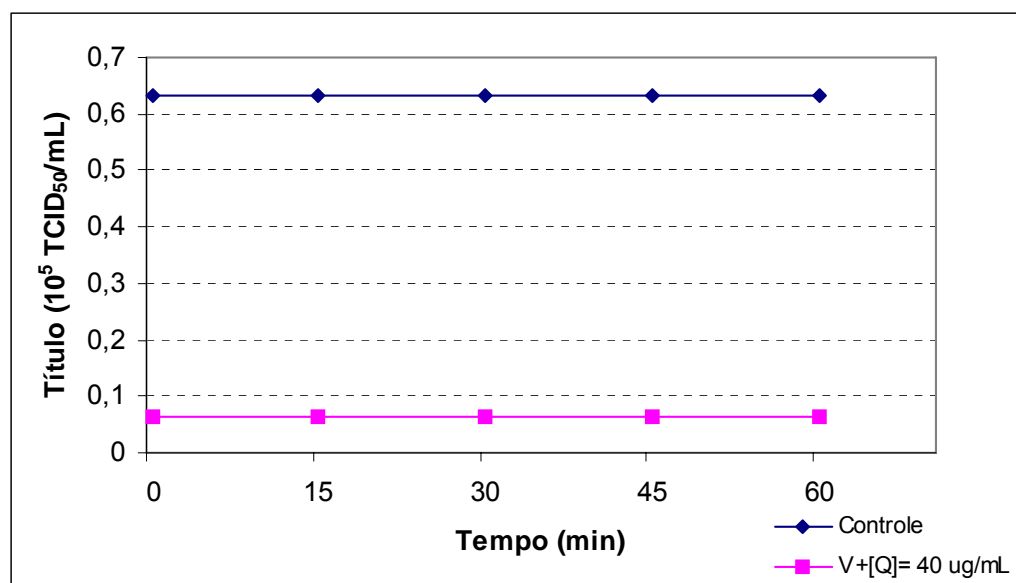


Figura 1: Ensaio de Inativação Direta. Controle: Vírus incubado sem a substância. Vírus+Q: Vírus incubado com a quercetina em uma concentração de 40 ug/mL. De 15 em 15 minutos uma alíquota do vírus foi titulada.

A redução do título viral logo após a incubação da quercetina foi de 10 vezes (igual a 1 log). Esta redução permaneceu constante, demonstrando ser dessa maneira independente do tempo de incubação da substância com o vírus. O decaimento do título viral no ensaio de Inativação Direta sugere uma inibição em processos iniciais da infecção viral ou uma destruição ou dano da partícula viral.

Um outro ensaio realizado para averiguar a atividade antiviral da quercetina contra o CPV foi o ensaio denominado *End Point*. Neste ensaio, a quercetina foi pré-incubada com monocamadas de CRFK e, posteriormente, foram inoculadas com o vírus. Foram testadas as concentrações de 0,5, 1,5 e 2,0 µg/mL. Nas 3 concentrações testadas houve redução do título viral. No entanto, esta redução demonstrou ser significativa nas concentrações de 0,5 e 2,0 µg/mL. Nessas concentrações, a redução foi de 10 vezes (90,0%) e 100 vezes (99,0%), respectivamente (Figura 2). Na concentração de 1,5 µg/mL, a redução foi apenas de 1,78 vezes.

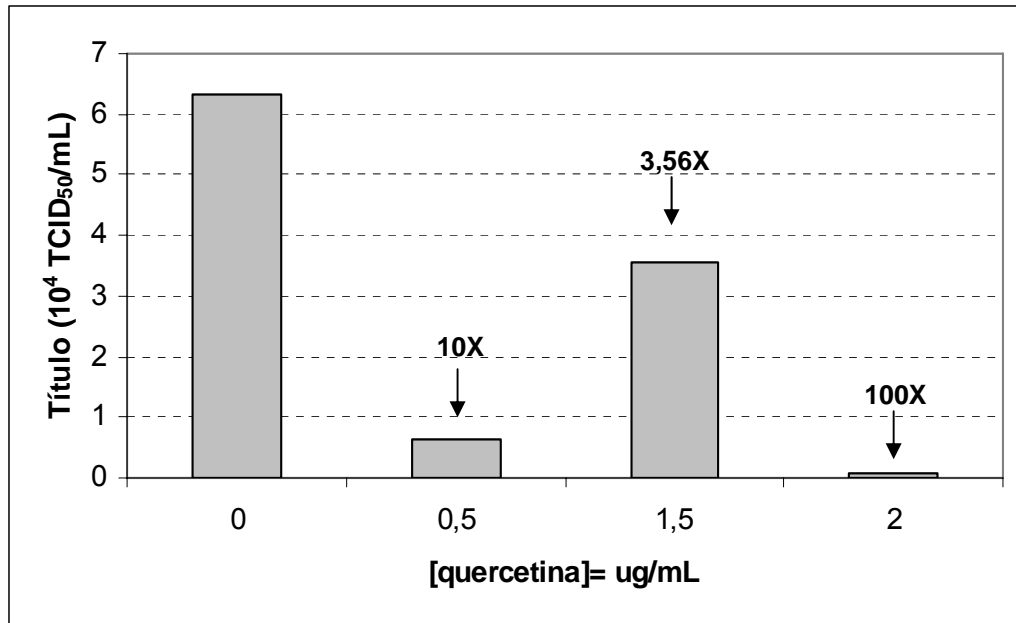


Figura 2: Ensaio *End Point*. 0: Controle, no qual as células não foram pré-tratadas com a quercetina. 0,5, 1,5 e 2,0 ug/mL representam as concentrações de quercetina utilizadas no pré-tratamento das células.

A atividade antiviral da quercetina parece estar relacionada a mecanismos da entrada do vírus na célula. Os resultados encontrados nos ensaios de Inativação Direta e *End Point*, indicam que este impedimento pode estar ocorrendo através da ligação da quercetina a receptores celulares.

Para melhor avaliar em qual ponto do ciclo viral a quercetina pode estar atuando, foi realizado o ensaio denominado *Timing of addition*. Neste ensaio, a quercetina foi incubada em uma concentração de 2,0 µg/mL a cada passo da infecção viral, ou seja, antes da inoculação (END), no momento da adsorção (ADS), no momento da penetração (PEN) e após a entrada do vírus (INF). Foi observada uma inibição significativa na ligação do vírus à célula (ADS) (Figura 3). Uma redução do título viral foi mais uma vez observada quando a célula foi pré-tratada com a quercetina (END).

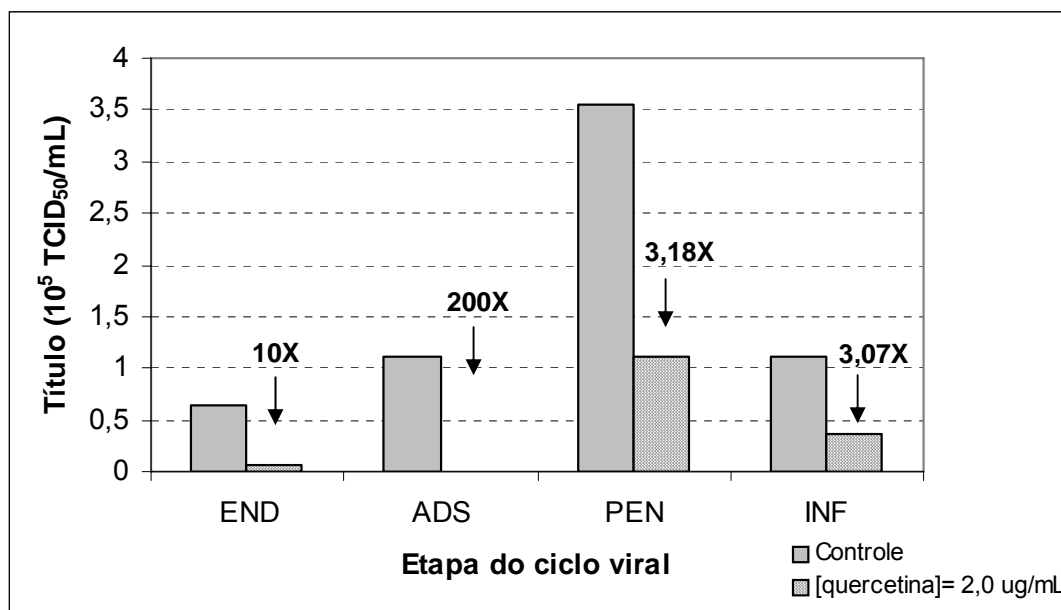


Figura 3: Ensaio *Timing of addition*. **END:** Pré-tratamento das células com a quercetina. **ADS:** Tratamento com quercetina no momento da inoculação viral e incubação a 4°C por 1 h. **PEN:** Tratamento com a quercetina após adsorção e incubação a 37°C por 1 h. **INF:** Tratamento com a quercetina após entrada viral. Controle: Vírus inoculado submetido aos mesmos passos de incubação, mas sem a quercetina. Todos os tratamentos foram feitos com a [quercetina]= 2,0 ug/mL.

O pré-tratamento das células com a quercetina resultou em uma redução de 10 vezes no título viral (inibição de 90,0%). A incubação da quercetina no momento da adsorção viral, resultou em uma redução de 200 vezes no título, o que corresponde a uma inibição de 99,0% (> 2 log). É interessante notar que após a ligação do vírus a célula, a quercetina parece não afetar significativamente a infecção viral, como pode ser visto pela redução de apenas 3,18 e 3,07 vezes quando a quercetina foi incubada no momento da penetração e após a infecção viral, respectivamente.

Existem descrições na literatura da atividade antiviral de certos compostos por meio da ligação destes aos receptores celulares. Li *et al.* (2000) observaram a inibição do HIV pela ligação do flavonóide baicalina aos receptores celulares CD4+ utilizados por estes vírus para a entrada nas células.

3.2. Ensaio piloto *in vivo*

Para verificar uma possíveis alterações nefrohepáticas da quercetina em cães, foi realizado um ensaio piloto em que 3 cães foram submetidos ao tratamento com a quercetina durante 5 dias com uma dose de 15 mg/kg via intravenosa.

Para a verificação de alterações renais foram dosados os parâmetros creatinina e uréia. A uréia é a principal forma excretora do nitrogênio proveniente do catabolismo protéico. Sua dosagem constitui o recurso mais utilizado para avaliação do estado de funcionalidade renal. Também é comum a solicitação da dosagem de creatinina juntamente com uréia. A creatinina é eliminada do plasma por filtração glomerular (MILLER & GONÇALVES, 1995). Assim, ambos constituem bons indicadores de disfunção renal quando há elevação em seus níveis.

Para avaliação de alterações hepáticas, os parâmetros avaliados foram fosfatase alcalina (AP), aspartato-transaminase (AST) e alanina-transaminase (ALT). A fosfatase alcalina parece estar ligada com o transporte de lipídeos no intestino e no processo de calcificação óssea. Já as transaminases constituem um grupo de enzimas que catalisam a interconversão de aminoácidos e α -cetoácidos por transferência de grupos amino. Essas 3 enzimas estão presentes no fígado e sua elevação na corrente sanguínea são indicativos de disfunção hepática (MILLER & GONÇALVES, 1995).

Assim, esses parâmetros foram analisados antes de se iniciar o tratamento com a quercetina e 3 análises foram feitas após o início do tratamento (3º, 5º e 7º d.p.t.). De acordo com os dados apresentados na Tabela 1, os parâmetros avaliados apresentaram-se todos normais em todos os dias analisados (Tabela 1).

Tabela 1: Análise de parâmetros sanguíneos indicadores de alterações renais e hepáticas em cães após tratamento com quercetina 15 mg/kg.

Animal	Tempo (d.p.t.)^a	Creatinina (0,5-1,5)^b mg/dL	Uréia (10-60)^b mg/dL	AP (10-96)^b UI/L	ALT (07-92)^b UI	AST (10-88)^b UI
1	0	1,10	43,0	60,0	13,0	11,0
2	0	0,98	53,0	44,0	10,0	8,0
3	0	0,96	41,0	56,0	8,0	10,0
1	3°	0,614	43,0	68,13	12,0	12,0
2	3°	0,614	46,0	51,55	40,0	20,0
3	3°	1,010	42,0	55,45	12,0	18,0
1	5°	0,614	46,0	86,24	12,0	18,0
2	5°	0,573	53,0	54,5	24,0	14,0
3	5°	0,532	37,0	82,75	12,0	22,0
1	7°	0,559	44,5	80,0	12,0	24,0
2	7°	0,614	49,5	79,3	14,0	16,0
3	7°	0,737	39,5	95,60	11,0	22,0

^a d.p.t. :Dias após o início do tratamento

^b Valores normais de referência para cães.

Os resultados encontrados dentro da faixa dos valores normais de referência mostram que a utilização da quercetina, na dose administrada, possivelmente não provoca alterações renais ou hepáticas em cães. No entanto, um maior conhecimento dos mecanismos de farmacocinética da quercetina em cães se faz necessário.

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi avaliado o potencial antiviral da quercetina *in vitro* contra o Parvovírus Canino. Este vírus pertence à família *Parvoviridae* e provoca uma das principais enfermidades em cães. A quercetina demonstrou atividade antiviral contra o CPV principalmente nos passos iniciais da infecção viral. Baseado nos resultados encontrados nos diferentes ensaios realizados sugere-se que a quercetina esteja se ligando ou promovendo alterações em receptores celulares impedindo a ligação do vírus a seus receptores e, conseqüentemente, impedindo a sua entrada e replicação na célula. No ensaio piloto realizado em cães, observou-se que possivelmente a quercetina administrada duas vezes ao dia na dose de 15 mg/kg não seja nefro e hepatotóxica. Diante dos resultados encontrados neste trabalho, acreditamos que a quercetina possa ser um possível candidato no tratamento da Parvovirose Canina. Vale ressaltar que estudos posteriores serão necessários para averiguar o potencial antiviral da quercetina contra este vírus em cães infectados e doentes com o Parvovírus Canino.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPEL, M.J.G., SCOTT, W.F., CARMICHAEL, L.E., 1979. Isolation and immunization studie of canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *The Veterinary Records*. 105, 156-159.
- BERNS, K.I., 1990. Parvovirus Replication. *Microbiology Reviews*. 54, 316-329.
- CARMICHAEL, L.E., 1994. Canine parvovirus type-2. An evolving pathogen of dogs. *Annual Veterinary Medicine*, 135, 459-464.
- CARMICHAEL, L.E., BINN, L.N., 1981. New enteric virus in the dog. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*. 25, 1-27.
- DECARO, N., MARTELLA, V., ELIA, G., DESARIO,C., CAMPOLO, M., LORUSSO, E., COLAIANNI, M.L., LORUSSO, A., BUONAVOGLIA, C., 2007a. Tissue distribution of the antigenic variants of canine parvovirus type 2 in dogs. *Veterinary Microbiology*. 121, 39-44.
- DECARO, N., DESARIO, C., ELIA, G., CAMPOLO, M., LORUSSO, A., MARI, V., MARTELLA, V., BUONAVOGLIA, C., 2007b. Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: A clinical and laboratory diagnostic dilemma. *Vaccine*. 25, 1161-1166.
- DECARO, N., ELIA, G., MARTELLA, V., DESARIO, C., CAMPOLO, M., DI TRANI, L., TARSITANO, E., TEMPESTA, M., BUONAVOGLIA, C., 2005. A real-time PCR assay for rapid detection and quantification of canine parvovirus type 2 DNA in the feces of dogs. *Veterinary Microbiology*. 105, 19-28.

- HAGIWARA, M.K., JULY, J.R., BACARO, M.R., ÂNGELO, M.J.O., 1980. Enterite hemorrágica em case associada à infecção por um parvovírus. *Arquivo do Instituto Biológico*. 47, 47-49.
- LI, B.Q., TAO, FU, DONGYAN, Y., KANG, E.A., 2000. Flavonoid Baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276, 534-538.
- MARTIN, V., NAJBAR, W., GUEGUEN, S., GROUSSON, D., EUN, H. LEBREUX, B., AUBERT, A., 2002. Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled challenge trial. *Veterinary Microbiology*. 89, 115-127.
- MOSMANN, T., 1983. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65, 55-63.
- MÜLLER, O., GONÇALVES, R.R., 1995. Laboratório para o clínico. 8ª Edição. Ed. Atheneu, 624p.
- POLLOCK, R.V., 1982. Experimental canine parvovirus infection in dogs. *Cornell Veterinary*. 72, 103-119.
- REED, J.H.; MUENCH, H., 1938. A simple method for estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene*, 27, 493-496.
- URL, A., SCHIMIDT, P., 2005. Do canine parvoviruses affect canine neurons? An immunohistochemical study. *Research in Veterinary Science*. 79, 57-99.

CAPÍTULO 2

Avaliação antiviral da quercetina *in vitro* e *in vivo* contra o Herpesvírus Equino 1

**VIÇOSA
ABRIL DE 2007**

RESUMO

A pesquisa em busca de substâncias antivirais tem se tornado cada vez maior. Os herpesvírus estão entre os vírus mais bem estudados quanto ao tratamento antiviral, principalmente os pertencentes à subfamília *Alfaherpesvirinae*. Os Herpesvírus Equino 1 (EHV-1), um *Alfaherpesvírus*, são importantes patógenos de cavalos, responsáveis por abortos, mortes neonatais e desordens do sistema nervoso. Não há tratamento específico para a doença respiratória induzida por EHV-1. Embora existam vacinas contra o EHV-1, elas não são muito protetoras e surtos da doença podem ocorrer em rebanhos vacinados. Assim, há uma urgente necessidade de um tratamento antiviral efetivo contra este vírus. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiviral do flavonóide quercetina contra o EHV-1. Para isto, foram realizados estudos *in vitro* e *in vivo*. Os ensaios *in vitro* consistiram na inativação direta do vírus pela quercetina (Ensaio de Inativação Direta), tratamento das células com a quercetina pré-infecção (Ensaio denominado *End Point*) e o tratamento das células em cada passo da infecção viral (Ensaio *Timing of addition*). Foi possível verificar que a quercetina atuou nos passos iniciais da infecção pelo EHV-1, sendo observada uma inibição de 99,0% quando a quercetina foi adicionada no momento da adsorção viral. No estudo *in vivo*, camundongos Balb/c foram inoculados via intraperitoneal com o EHV-1 e tratados com doses de 30, 90 e 270 mg/kg/dia de quercetina via oral. Foram analisados os sinais clínicos, alterações histopatológicas nos rins, cérebro, pulmão e baço. Além disso, foram feitas análises de alguns parâmetros hematológicos e avaliação da resposta imune celular pelo ensaio de linfoproliferação. Não houve aparecimento de sinais clínicos e nenhuma alteração histopatológica foi observada. No entanto, houve resposta frente à infecção viral, já que se observou aumento da proliferação linfocítica na polpa branca do baço dos animais inoculados. No ensaio de linfoproliferação foi possível verificar uma estimulação da resposta imune celular pela quercetina contra o EHV-1 quando os animais foram tratados com as doses de 30 e 90 mg/kg/dia. Nos animais tratados com a dose de 270 mg/kg/dia foi observada uma

estimulação da resposta imune celular, no entanto, esta foi específica à própria quercetina. Na avaliação hematológica, foi observado um aumento na produção de leucócitos, principalmente linfócitos, nos animais tratados. Dessa maneira, pode-se inferir que a quercetina possa ser um bom candidato para o tratamento das infecções causadas pelo EHV-1, devido à sua atuação antiviral direta, como demonstrado pelos ensaios *in vitro*, mas também por atuar nos mecanismos de defesa do animal, contribuindo indiretamente no controle da infecção viral.

ABSTRACT

The research of antiviral substances has turned every larger time. The herpesvirus is better among the viruses studied with relationship to the treatment antiviral, mainly the belonging to the subfamily *Alphaherpesvirinae*. Equid Herpesvirus 1 (EHV-1), an *Alphaherpesvirus*, is an important pathogen of horses, responsible for abortions, neonates deaths and disorders of the nervous system. There is not specific treatment for the breathing disease induced by EHV-1. Although vaccines exist against the EHV-1, they are not very protective and outbreak of the disease can happen in vaccinated flocks. Thus, there is an urgent need of an effective antiviral treatment against this virus. The objective of this work went evaluate to activity antiviral of the flavonoid quercetin against the EHV-1. For this, studies in vitro and in vivo were accomplished. The assay in vitro consisted of the direct inactivation of the virus by the quercetin (Assay of Inactivating Direct), treatment of the cells with the quercetin before infection (assay denominated End Point) and the treatment of the cells in each step of the infection viral (assay Timing of addition). It was possible to verify that the quercetin acted in the initial steps of the infection for the EHV-1, being observed an inhibition of 99,0% when the quercetin was added in the moment of the attachment viral. In the study in vivo, Balb/c mice were inoculated with EHV-1 and treateds with doses of 30, 90 and 270 quercetin mg/kg/day orally. The clinical signs, histopathologicals changes in the kidneys, brain, lung and spleen, were analyzed. Besides, they were made analyses of some blood parameters and evaluation of the cellular immune answer for the linfoproliferation assay. There were not observed clinical signs and any histopathologicals changes. However, there was answer front the viral infection, since increase of the lymphocyte proliferation was observed in the white pulp of the spleen of the inoculated animals. In the proliferation of lymphocyte assay it was possible to verify an increase of the cellular immune answer for the quercetin against the EHV-1 when the animals were treated with the doses of 30 and 90 mg/kg/day. In the treated animals with the dose of 270 mg/kg/day an increase of the cellular immune answer was observed, however, this was specific to the own quercetin. In the blood evaluation, an increase was observed in the leucocytes production, mainly lymphocytes, in the treated

animals. In that way, it can be inferred that the quercetin can be a good candidate for the treatment of the infections caused by the EHV-1, due to its performance direct antiviral, how demonstrate the in vitro assay, but also for acting in the mechanisms of defense of the animal, contributing indirectly in the control of the infection viral.

1 INTRODUÇÃO

A procura por novos medicamentos tem se tornado constante não somente na área humana, mas também para uso veterinário. Os herpesvírus, principalmente os pertencentes à subfamília *Alfaherpesvirinae* estão entre os vírus mais pesquisados em busca de tratamentos antivirais, isso devido as suas características de infecção e a possibilidade de pesquisas em modelos animais (FIELD *et al.*, 2006).

Os Herpesvírus Equino 1 (EHV-1), um *Alfaherpesvírus*, são importantes patógenos de cavalos, responsáveis por abortos, mortes neonatais e desordens do sistema nervoso (VAN DER MEULEN *et al.*, 2006). Para o EHV-1 são comuns infecções leves ou subclínicas (FOOTE *et al.*, 2006), mas a forma clínica também pode acontecer através de doença respiratória e reprodutiva, no entanto, casualmente há apresentação da forma neurológica. O tempo de incubação para a forma respiratória da doença está entre 3-10 dias. Para a apresentação clínica, os sinais iniciais incluem febre aguda, depressão, letargia, anorexia, inchaço de linfonodos e secreção nasal serosa profusa que mais tarde torna-se mucopurulenta. A febre pode ser bifásica com os episódios febris correspondendo a viremia associada à célula. Uma infecção por EHV-1 vasculotrópica pulmonar fatal, causando severo edema pulmonar e hemorragia, vasculite multissistêmica e enterotifocolite tem sido demonstrada em cavalos jovens (DEL PIERO *et al.*, 2000; DEL PIERO & WILKINGS, 2001; PATEL & HELDENS, 2005).

Assim como para a maioria dos herpesvírus, o EHV-1 também causa latência após infecção primária. Os locais de latência para o EHV-1 têm sido identificados em células neuronais do gânglio trigêmio, linfócitos sanguíneos periféricos e tecidos linfóides de cavalos com recrudescência experimentalmente induzida (WELCH *et al.*, 1992; CARVALHO *et al.*, 2000). O EHV-1 também infecta camundongos, os quais servem como um bom modelo de infecção em laboratório apresentando sinais clínicos representativos da doença em cavalos como, a infecção da mucosa do epitélio respiratório, epitélio bronquiolar, viremia associada à célula e infecção da placenta provocando partos prematuros (FIELD *et al.*, 2006). Camundongos inoculados intraperitonealmente com diferentes cepas de

EHV-1 mostraram diferenças quanto à neuropatogenicidade. O mecanismo específico para a entrada do vírus no sistema nervoso central (SNC) após inoculação intraperitoneal ainda não é claro. Os camundongos mostraram mielite que foi mais severa do que a encefalite. Ao contrário, após inoculação intracerebral ou intranasal com a mesma linhagem, os camundongos desenvolveram severa encefalite e menor mielite. O vírus pode invadir o SNC ou pela rota hematogênica ou por disseminação neural a partir dos plexos mesentéricos (HASEBE *et al.*, 2002).

Não há tratamento específico para a doença respiratória induzida por EHV-1. O uso do aciclovir tem sido restrito a infecções neurológicas e congênitas pelo vírus (MURRAY *et al.*, 1998). O penciclovir demonstrou diminuir a replicação do EHV-1 em tecidos respiratórios e reduziu a viremia em camundongos e em cultura de tecidos (DE LA FUENTE *et al.*, 1992).

Embora existam vacinas contra o EHV-1, elas não são muito protetoras e surtos da doença podem ocorrer em rebanhos vacinados. Assim, há uma urgente necessidade de um tratamento antiviral efetivo. Este constitui em reduzir a replicação viral e disseminação em cavalos afetados e prevenir a replicação viral no contato entre animais. A droga também deve ser efetiva tanto em isolados associados a surtos de aborto quanto a surtos associados a manifestações neurológicas (GARRÉ *et al.*, 2007).

Existem relatos da atuação dos flavonóides contra alguns herpesvírus, incluindo os *Alfa*herpesvírus. Dessa maneira, esse trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antiviral do flavonóide quercetina contra o Herpesvírus Equino 1 (EHV-1), *in vitro* e *in vivo*. Para o estudo *in vivo*, camundongos Balb/c foram inoculados com o EHV-1 e foi feita a análise de parâmetros hematológicos e da resposta imune celular do vírus frente à infecção viral.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Células e vírus

Para a realização dos ensaios *in vitro* foram utilizadas células da linhagem de rim de coelho (RK13). As células foram mantidas em meio essencial mínimo (MEM) (SIGMA-ALDRICH) contendo penicilina (1,6 mg/L) (CULTILAB), estreptomicina (0,4 mg/L) (CULTILAB), suplementadas com soro fetal bovino (10%) (CULTILAB). O vírus utilizado nos experimentos foi isolado de um surto no Rio Grande do Sul e cedido pelo Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria/RS.

2.2. Flavonóide

A quercetina [3,3',4',5,6-Pentahydroxyflavone] (quercetin dihydrate) foi adquirida da empresa SIGMA-ALDRICH e, para os ensaios *in vitro*, a mesma foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO) (Nuclear) em uma concentração estoque de 10 mg/mL e armazenada a -20°C. Para o experimento *in vivo* foram preparadas três suspensões aquosas de quercetina nas concentrações 4,5; 13,5 e 40,5 mg/mL. As suspensões foram preparadas utilizando-se como veículo: sorbitol, propilenoglicol 10%, natrosol 0,5%, metocel 0,25%.

2.3. Preparação dos estoques de vírus e titulação

Os vírus foram inoculados em monocamadas semiconfluentes de células e após a manifestação do efeito citopático (ECP), as células foram congeladas e descongeladas duas vezes e centrifugadas a 500 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e aliquoteado (estoque). Esse procedimento foi realizado até que se alcançasse o título viral desejado. Os estoques virais foram titulados pelo método de TCID₅₀ como descrito por Reed & Muench (1938).

2.4. Análise *in vitro*

2.4.1. Análise do efeito citotóxico da quercetina

Monocamadas das células RK13 com tapetes celulares semiconfluentes em microplacas de 96 poços, foram tratadas com concentrações da quercetina que variaram de 1 a 90 µg/mL e incubadas em estufa (Shell Lab, IR2424) a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. As microplacas foram monitoradas sob microscopia óptica diariamente por 4 dias. A citotoxicidade foi determinada pelo efeito na morfologia e viabilidade celular (perda da monocamada, granulação e vacuolização no citoplasma) em relação ao aspecto das células não tratadas (controle). A citotoxicidade também foi determinada pelo método colorimétrico baseado na redução do 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,-difeniltetrazolium brometo (MTT) (SIGMA-ALDRICH) por enzimas mitocondriais (MOSMANN, 1983). No 4º dia após incubação da quercetina, as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS) pH 7,2 por duas vezes e adicionado o MTT 0,5 mg/mL. As células foram incubadas por 4 horas em estufa. Posteriormente, o sal formado foi solubilizado pela adição de isopropanol (SIGMA-ALDRICH)-HCl 0,04 N. A densidade óptica (OD₅₅₀) foi determinada por espectrofotometria. A porcentagem de células tratadas viáveis foi calculada em relação ao controle não tratado (% de células = $OD_{exp} / OD_{célula\ controle} \times 100$). Foi determinada a CT₅₀ que é a concentração necessária para reduzir a densidade óptica em 50%. A partir deste experimento foi determinada a concentração máxima não tóxica para as células. Para esta determinação foi feita a análise estatística utilizando-se o teste t de Student no programa EXCEL versão 2003 (MICROSOFT).

2.4.2. Ensaio de Inativação Direta (*Assay Inactivating Direct* - AID)

Os vírus foram incubados com a quercetina em concentração que não excedeu a máxima não tóxica. Nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 minutos após incubação, uma alíquota dessa suspensão foi titulada. A atividade antiviral foi determinada pela redução no título viral em relação ao controle visualizada pela redução do ECP nas células infectadas. Como controle de vírus utilizou-se uma alíquota do EHV-1 submetido aos tempos de incubação, titulados a cada passo, e como controle da substância incubou-

se a quercetina na concentração final utilizada. Foi considerada inibição significativa àquela superior a 1 log (90% de inibição).

2.4.3. Ensaio *End Point*

Neste ensaio, monocamadas semiconfluentes das células em microplacas de 96 poços foram incubadas por 1 h com a quercetina em diferentes concentrações, inferiores à concentração máxima não tóxica. Foram avaliadas alterações na infectividade dos vírus, por modificações celulares que causem resistência viral às células. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS duas vezes e o vírus foi inoculado. A atividade antiviral foi avaliada pela redução no ECP dos vírus inoculados em monocamadas celulares tratadas em relação aos vírus inoculados em monocamadas celulares não tratadas (controle). Monocamadas celulares livres de vírus foram incubadas com a quercetina nas concentrações testes e utilizadas como controle da substância. Foi considerada inibição significativa àquela superior a 1 log (90% de inibição).

2.4.4. Ensaio *Timing of Addition*

O efeito antiviral da quercetina foi avaliado seguindo a adição dessa substância em diferentes tempos relativos à infecção viral. Monocamadas semiconfluentes de células foram incubadas com MEM ou MEM contendo a quercetina por 1 h (pré-tratamento das células), lavadas duas vezes com PBS e posteriormente inoculadas com o vírus. Foram inoculadas as suspensões virais com e sem quercetina (efeito na adsorção) e esta foi mantida por 1 h a 4°C para prevenir a internalização do vírus. Após a adsorção, as células foram lavadas duas vezes com PBS e foi adicionado meio comum e meio contendo a quercetina e incubadas por 1 h a 37°C para permitir a penetração do vírus (efeito na penetração). As células foram novamente lavadas com PBS por duas vezes e foram adicionados meio contendo ou não a quercetina e as células foram cultivadas por 72 h a 37°C (efeito após a infecção viral). A atividade antiviral foi avaliada pela redução no ECP. Foi considerada inibição significativa àquela superior a 1 log (90% de inibição).

2.5. Análise *in vivo*

2.5.1. Desenho experimental

Noventa camundongos, sendo 45 fêmeas e 45 machos, Balb/c com 3-4 semanas de idade soronegativos para o EHV-1 foram utilizados neste estudo. Os animais foram obtidos no Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Para inoculação os animais foram anestesiados em câmara de éter. Os animais foram organizados em 5 grupos de 16 animais cada, sendo metade machos e metade fêmeas. Os animais inoculados com o vírus foram infectados via intraperitoneal com 60 μ L da suspensão viral a $6,32 \times 10^4$ TCID₅₀/mL. Os animais do grupo 1 foram inoculados com o mesmo volume de MEM estéril e serviram como grupo controle negativo (CN). Os animais do grupo 2 foram inoculados com o EHV-1 e não receberam nenhum tipo de tratamento, sendo assim, o grupo controle positivo (CP). Os animais do grupo 3 foram inoculados com a suspensão viral e tratados com a quercetina por via oral (gavagem) em uma dose de 30 mg/kg/dia (VQ30). Os animais do grupo 4 foram inoculados e tratados com a quercetina em uma dose de 90 mg/kg/dia (VQ90) e o quinto grupo foi inoculado e tratado com a quercetina em uma dose de 270 mg/kg/dia (VQ270). Durante o experimento foram avaliados os sinais clínicos e estes foram classificados de acordo a gravidade dos mesmos. Nos tempos 0, 7 e 15 dias após inoculação (d.p.i.), foi coletado sangue para a análise hematológica. Em cada coleta, 8 animais de cada grupo foram eutanasiados e o cérebro, os rins, pulmão e o baço foram coletados. Análises histopatológicas foram realizadas nos órgãos coletados. Parte do baço foi utilizada nos ensaios de linfoproliferação.

2.5.1.1. Análise histopatológica

Os órgãos coletados para análise histopatológica foram fixados em formol 10% e processados segundo a técnica de inclusão em parafina. Os órgãos incluídos em parafina foram cortados e corados com hematoxilina e eosina (HE). As análises histopatológicas foram realizadas no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Veterinária/UFV.

2.5.1.2. Ensaio de linfoproliferação

Para avaliação da resposta imune celular produzida pelos animais foi realizado o ensaio de linfoproliferação utilizando o MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,-difeniltetrazolium brometo) (SIGMA-ALDRICH), que é um indicador de densidade e viabilidade celular. Para isso, o baço dos animais avaliados foram coletados e macerados com o meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 incompleto (SIGMA-ALDRICH) em telas obtendo uma suspensão de células esplênicas totais. As células foram centrifugadas a 250 g a 4°C por 10 minutos e ressuspendidas em 5 mL de tampão de lise [Tris-HCl 0,17M:NH₂Cl 0,16M (1:9)] por 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas com 5 mL de meio RPMI e centrifugadas a 250 g a 4°C por 5 minutos. Este passo foi repetido 2 vezes. As células foram ressuspendidas em meio RPMI completo (suplementado com 10% de soro fetal bovino). A viabilidade celular foi avaliada em câmara de Neubauer utilizando-se o teste de exclusão com azul de Trypan (SIGMA-ALDRICH). Foram distribuídas 2 x 10⁵ células por poço em placas de cultura de 96 poços. As culturas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ na presença de Concanavalina A (Con-A)(12 µg/mL) (SIGMA-ALDRICH), meio RPMI completo, com o vírus inativado por 1 hora em luz ultravioleta e com a quercetina (10 µg/mL). Após as 72 horas de incubação, foram acrescentados MTT 0,5 mg/mL por poço e as culturas foram novamente incubadas por 4 horas. Após este tempo, o MTT foi retirado e as células foram tratadas com 100 µL de isopropanol (SIGMA-ALDRICH)-HCl 0,04 N para solubilização dos cristais formados. A densidade óptica (OD₅₅₀) foi determinada por espectrofotometria. Análise de variância (ANOVA) e o teste de Dunnet foram utilizados para determinar a diferença estatística entre os grupos estimulados com o vírus, estimulados com a quercetina, estimulados com Con-A e sem estímulo (meio RPMI). As análises estatísticas foram realizadas usando o software SAS/STAT versão 9.1 (Institute Inc., Cary, NC, USA) do Sistema SAS para Windows, licenciado para a UFV, 2007.

2.5.1.3. Análise hematológica

Para avaliação dos padrões hematológicos foi feita a análise em aparelho HUMACOUNT (Cat. 17400, nº série: 902405, HUMAN GmbH, Max-Planck-Ring 21, D-65205, Wiesbaden, Germany). O sangue foi coletado em EDTA 10% e armazenado por no máximo 24 h para análise. As análises estatísticas foram realizadas usando o software SAS/STAT versão 9.1 (Institute Inc., Cary, NC, USA) do Sistema SAS para Windows, licenciado para a UFV, 2007. As análises hematológicas foram realizadas no Laboratório de Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/UFV.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Ensaios *in vitro*

Para a determinação da concentração máxima não tóxica de quercetina a ser utilizada nos ensaios antivirais foi utilizado o método colorimétrico de redução do sal de tetrazolium (MTT). De acordo com este ensaio, verificou-se uma concentração máxima de trabalho de 30 µg/mL de quercetina que foi correspondente à concentração necessária para reduzir a densidade óptica em 50% (CT₅₀) estimada através da fórmula (% de células = OD_{exp}/ OD_{célula controle} x 100). Acima desta concentração, foi observado por microscopia óptica vacuolização do citoplasma, morte e desprendimento do tapete celular.

No ensaio de Inativação Direta, o EHV-1 foi incubado com a quercetina em uma concentração de 800 µg/mL. Neste ensaio, concentrações superiores à máxima não tóxica podem ser utilizadas devido às diluições que são realizadas antes da inoculação viral. Observou-se uma redução do título viral de 10 vezes (90,0%) após incubação (Figura 1). Aos 30 minutos de incubação foi observada uma redução do título do vírus controle (sem incubação com a quercetina).

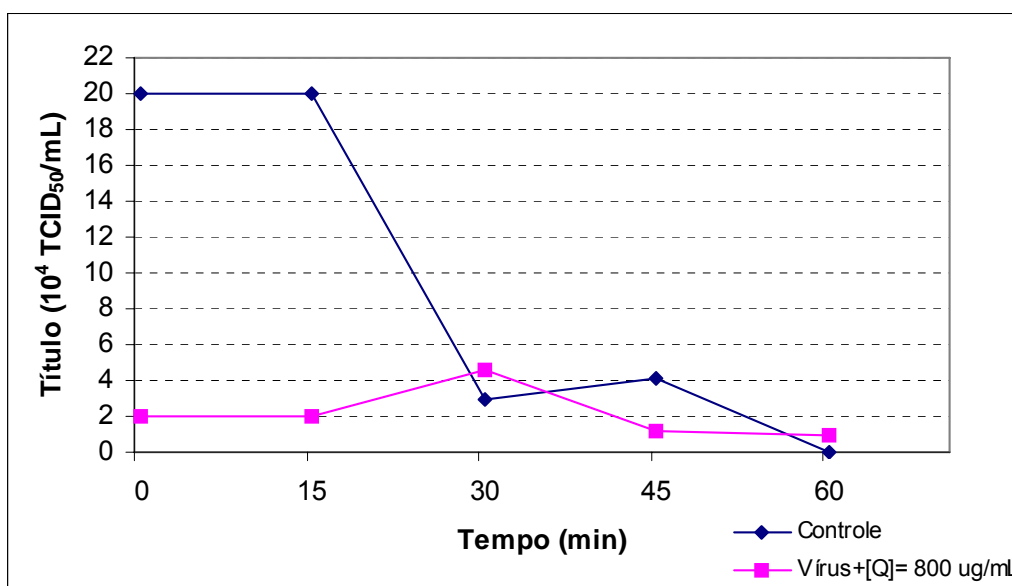


Figura 1: Ensaio de Inativação Direta. Controle: Vírus incubado sem a substância. Vírus+Q: Vírus incubado com a quercetina em uma concentração de 800 ug/mL. De 15 em 15 minutos uma alíquota do vírus foi titulada.

A redução do título do vírus utilizado como controle após 30 minutos de incubação se deve a menor estabilidade dos vírus envelopados quando expostos ao calor, como é o caso dos herpesvírus. A principal condição ambiental que pode adversamente afetar a infectividade dos vírus é a temperatura, neste sentido, vírus envelopados são mais sensíveis ao calor do que os vírus não-envelopados (MURPHY *et al.*, 1999).

No ensaio denominado *End Point*, em que as células são incubadas com a quercetina antes da inoculação viral, foram testadas as concentrações de 10, 15 e 25 $\mu\text{g/mL}$. A pré-incubação da célula com a quercetina na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ produziu uma redução no título viral de 113 vezes, o que corresponde a 99,0% de inibição (Figura 2).

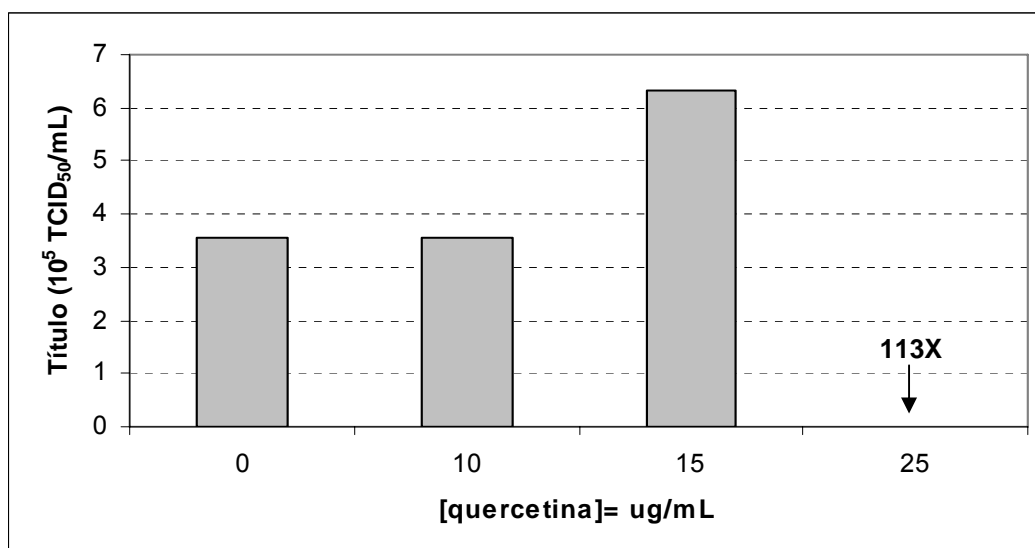


Figura 2: Ensaio *End Point*. 0: Controle, no qual as células não foram pré-tratadas com a quercetina. 10, 15 e 25 $\mu\text{g/mL}$ representam as concentrações de quercetina utilizadas no pré-tratamento das células.

Na tentativa de se determinar em qual passo da infecção viral a quercetina pode atuar, foi realizado o ensaio *Timing of addition*. Neste ensaio a quercetina foi incubada com o vírus em diferentes tempos de infecção viral, isto é, antes da inoculação, no momento da adsorção viral, penetração e após entrada do vírus. Foi observada uma inibição viral em todos os passos da infecção, no entanto, esta demonstrou ser significativa (acima de 1 log) nos passos relacionados a entrada do vírus na célula. Verificou-se uma inibição de 20 vezes quando a célula foi pré-incubada com

a quercetina (> 90%). Quando a quercetina foi incubada no momento da adsorção viral, ou seja, da ligação de proteínas virais a receptores celulares, a inibição foi de 100 vezes (99,0%) o que representa uma redução de 2 log no título viral. Quando a incubação foi feita no momento da penetração do vírus a inibição foi de 30 vezes (Figura 3).

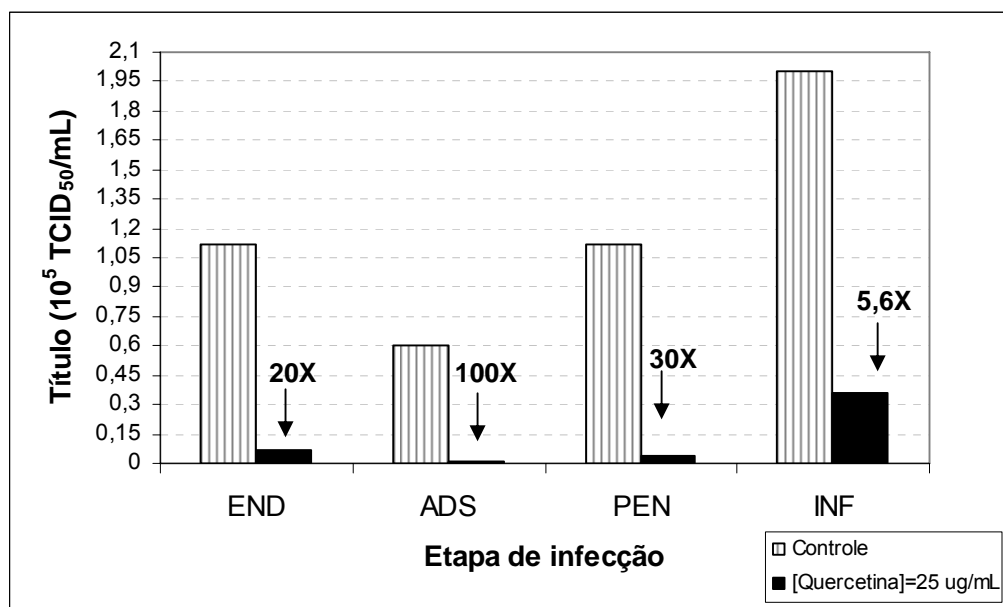


Figura 3: Ensaio *Timing of addition*. **END:** Pré-tratamento das células com a quercetina. **ADS:** Tratamento com quercetina no momento da inoculação viral e incubação a 4 °C por 1 h. **PEN:** Tratamento com a quercetina após adsorção e incubação a 37 °C por 1 h. **INF:** Tratamento com a quercetina após entrada viral. Controle: Vírus inoculado submetido aos mesmos passos de incubação, mas sem a quercetina. Todos os tratamentos foram feitos com a [quercetina]= 25 ug/mL.

Os resultados obtidos nos ensaios AID, *End Point* e *Timing of addition* indicam que a quercetina pode estar se ligando a receptores celulares, causando modificações nos mesmos, ou ligando a glicoproteínas do envelope viral que estejam impedindo a ligação e, ou, entrada do vírus na célula. A significativa redução no pré-tratamento das células indica que possivelmente a quercetina atue ao nível de receptor celular.

A incubação da quercetina após a entrada do vírus não resultou em redução significativa do título viral (5,6 vezes de redução). No entanto, a quercetina também pode estar atuando intracelularmente gerando modificações que possam interferir na atuação viral.

3.2. Ensaio *in vivo*

Com o intuito de avaliar *in vivo* a atividade da quercetina contra o Herpesvírus Equino 1, foram inoculados experimentalmente camundongos da linhagem Balb/c e estes foram tratados por um período de 10 dias com a quercetina nas doses de 30, 90 e 270 mg/kg/dia. A suspensão de quercetina utilizada foi administrada via oral através de gavagem. Os animais foram observados diariamente quanto ao aparecimento de sinais clínicos. Nenhum animal desenvolveu a doença clínica. Nos exames histopatológicos nenhuma lesão foi encontrada nos órgãos avaliados. De acordo com Foote *et al.* (2006), para o EHV-1 são comuns infecções leves ou subclínicas. Isso pode ocorrer devido a vários fatores, dentre eles a baixa carga viral. Acredita-se que a carga viral inoculada nos animais tenha sido baixa para provocar sintomatologia clínica. Na avaliação de cortes do baço, foi verificada a produção de uma resposta imunológica com a observação da proliferação linfocitária na polpa branca. Diante de uma baixa carga viral, a resposta imunológica pode ter sido suficiente para controlar a infecção.

Para avaliar a resposta imune celular e se esta pode ser estimulada pela quercetina, foi realizado o ensaio de linfoproliferação. As células esplênicas foram estimuladas com o vírus, com a quercetina e com a Concanavalina A, um agente mitogênico utilizado como controle da estimulação. Foi observado que todas as doses testadas foram capazes de estimular a resposta imune celular, significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett, tanto em resposta ao estímulo viral quanto em resposta a estimulação da quercetina (Figura 4).

Ao ser comparada a resposta celular entre os grupos foi possível verificar que os animais que foram tratados com as doses de 30 e 90 mg/dia/kg foram capazes de responder frente ao estímulo viral mais eficientemente. No entanto, quando as células foram estimuladas com a própria quercetina a resposta foi maior com o grupo de animais tratados com uma dose de 270 mg/kg/dia (Figura 5), ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste t de Tukey.

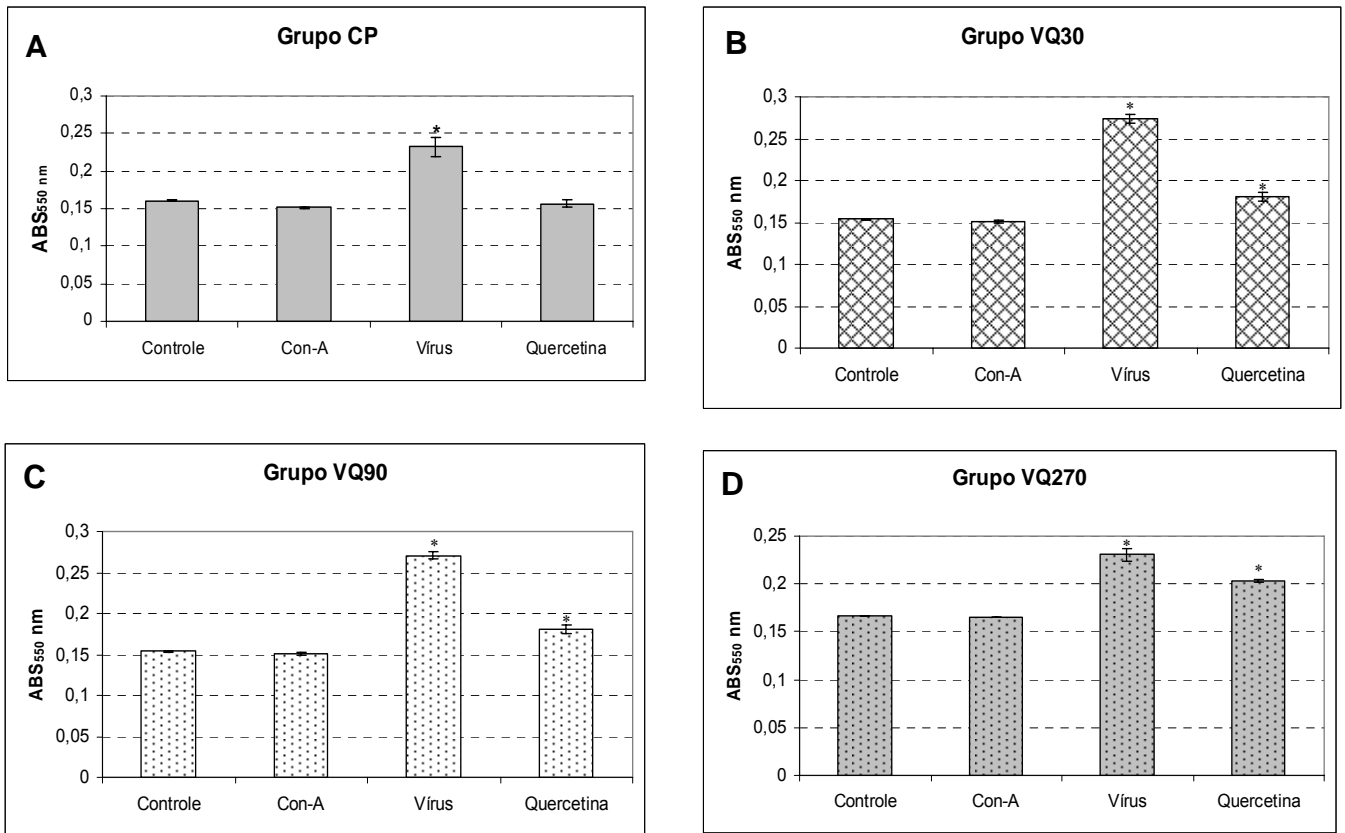


Figura 4: Linfoproliferação das células esplênicas provenientes dos camundongos inoculados com EHV-1, tratados e não tratados com a quercetina. Controle: Células sem estímulo (meio RPMI); Con-A: células estimuladas com Concanavalina A; Vírus: Células estimuladas com o EHV-1 inativado; Quercetina: células estimuladas com [quercetina]=10 ug/mL. **A:** Linfoproliferação das células esplênicas do grupo dos animais inoculados e não tratados (CP) **B:** Linfoproliferação das células esplênicas dos animais inoculados e tratados com quercetina 30 mg/kg/dia (VQ30). **C:** Linfoproliferação das células esplênicas dos animais inoculados e tratados com quercetina 90 mg/kg/dia (VQ90). **D:** Linfoproliferação das células esplênicas dos animais inoculados e tratados com quercetina 270 mg/kg/dia (VQ270).

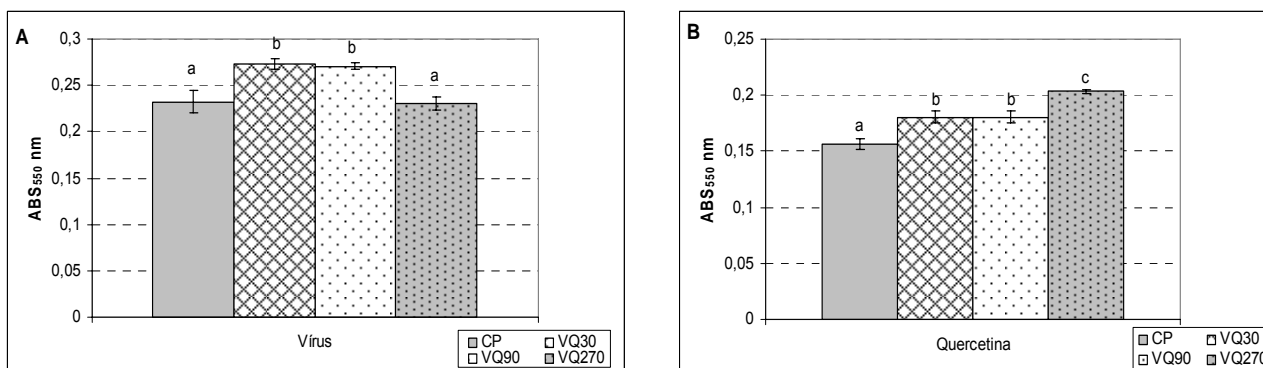


Figura 5: Ensaio de linfoproliferação comparando-se a resposta entre os grupos frente ao estímulo com o vírus (A) e estimulados com a [quercetina]=10 ug/mL (B). **CP:** Animais inoculados e não tratados. **VQ30:** Animais inoculados e tratados com quercetina 30 mg/kg/dia. **VQ90:** Animais inoculados e tratados com quercetina 90 mg/kg/dia. **VQ270:** Animais inoculados e tratados com quercetina 270 mg/kg/dia.

Pode ser observado que os animais tratados com as doses de 30 e 90 mg/kg/dia conseguiram ter uma maior resposta celular quando estimulados com o vírus. Entretanto, a dose de 270 mg/kg/dia foi capaz de estimular mais eficientemente a resposta celular quanto ao seu próprio estímulo, havendo, portanto a correlação para o estímulo específico, maior dose, maior resposta. De acordo Lin & Tang (2007), a magnitude da resposta imune celular (tal como a proliferação de esplenócitos) geralmente depende da dose estimulante administrada, doses muito baixas ou doses muito altas poderiam induzir um específico estado não responsivo. Todas as doses utilizadas neste trabalho produziram um estado responsivo, no entanto, a maior dose utilizada não estimulou uma resposta contra o EHV-1.

A resposta imunológica e outros fatores bioquímicos sanguíneos foram também avaliados pela análise hematológica do sangue dos animais, coletado nos dias 7 e 15 após a inoculação. Foi analisada a contagem de células brancas (WBC), contagem de linfócitos (LYM), porcentagem de linfócitos em relação às células brancas (LY), contagem de granulócitos (GRA), porcentagem de granulócitos em relação às células brancas totais (GR), contagem de monócitos (MID), porcentagem de monócitos (MI), contagem de células vermelhas (RBC), concentração de hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT).

Os parâmetros hematológicos de camundongos e ratos são influenciados por diversos fatores, inclusive local da coleta da amostra,

idade, sexo, linhagem, anestesia, método de contação e estresse (Thrall *et al.*, 2006).

A análise das células brancas sanguíneas (WBC), também denominadas de leucócitos, constitui o leucograma. O aumento na contagem de leucócitos acima do limite superior do valor de referência para a espécie em questão denomina-se leucocitose enquanto que uma diminuição abaixo dos valores de referência é denominada de leucopenia.

Para os machos do grupo controle positivo (CP) foi observado que estas apresentaram leucopenia após 7 d.p.i. Esta alteração é própria da fase inicial da infecção causada por vírus (MILLER & GONÇALVES, 1995). Aos 15 d.p.i., o quadro de leucopenia pôde ser revertido (Tabela 1 e Figura 6). Os animais tratados com a dose de 270 mg/kg/dia apresentaram um aumento de leucócitos, em relação ao controle positivo, significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett. Os leucócitos desempenham um papel importante no mecanismo de defesa do organismo contra as agressões infecciosas. Um aumento no seu número pode contribuir com uma melhor resposta do animal frente à infecção viral. No entanto, como visto no ensaio de linfoproliferação, esta resposta aumentada com a maior dose parece não ser contra o EHV-1.

Tabela 1: Dados da análise hematológica para o parâmetro WBC. Médias seguidas por letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste t de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. O asterisco* significa diferença estatística em relação ao grupo CP pelo Teste de Dunnett ($\alpha = 5\%$).

Tratamentos	WBC (*10 ³ /uL)		Tratamentos	WBC (*10 ³ /uL)	
	M	F		M	F
CN T7	1,57 ± 0,73 ^a	1,88 ± 0,87 ^b	CN T15	2,37 ± 1,14 ^{ab}	3,96 ± 1,95 ^a
CP T7	0,5 ± 0,12 ^a	3,33 ± 1,18 ^{ab}	CP T15	3,50 ± 2,98 ^b	2,56 ± 0,63 ^a
Q30 T7	2,63 ± 1,71 ^a	2,05 ± 1,33 ^b	Q30 T15	1,28 ± 1,17 ^{ab}	3,86 ± 0,97 ^a
Q90 T7	2,66 ± 0,98 ^a	4,18 ± 1,68 ^{ab}	Q90 T15	3,58 ± 0,77 ^{ab}	3,53 ± 1,03 ^a
Q270 T7	2,21 ± 1,13 ^a	6,16 ± 2,97 ^{a*}	Q270 T15	8,12 ± 0,70 ^{a*}	5,67 ± 1,61 ^{a*}

CN: Animais inoculados com MEM. **CP:** Animais inoculados e não tratados. **VQ30:** Animais inoculados e tratados com quercetina 30 mg/kg/dia. **VQ90:** Animais inoculados e tratados com quercetina 90 mg/kg/dia. **VQ270:** Animais inoculados e tratados com quercetina 270 mg/kg/dia.

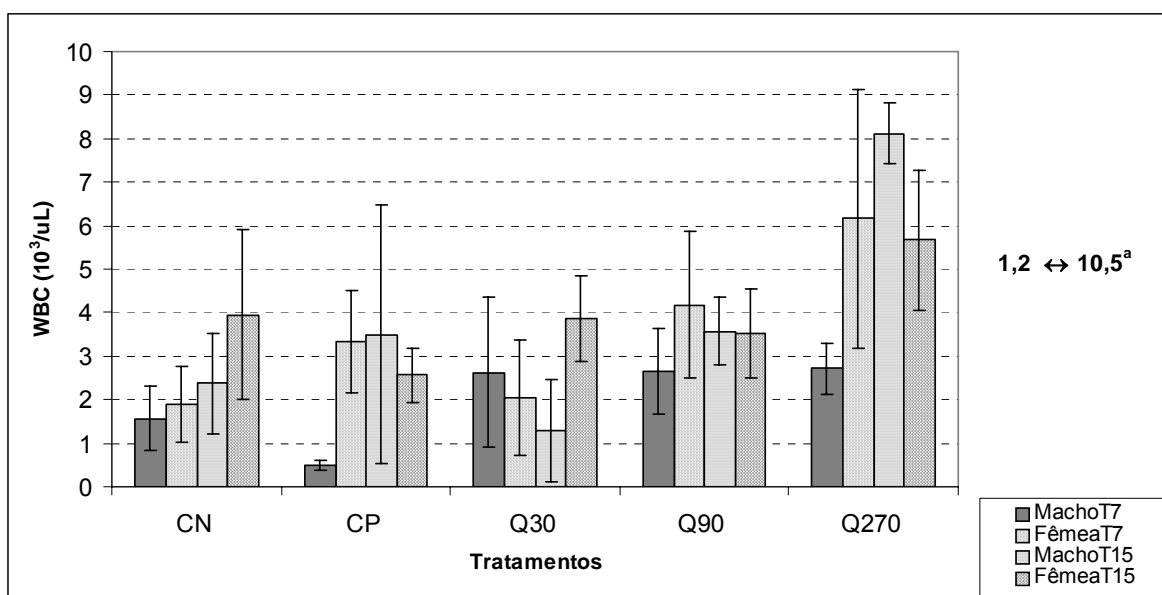


Figura 6: Contagem de células brancas (WBC).

^a Faixa de valores normais para camundongos Balb/c de acordo Thrall *et al.*(2006).

CN: Animais inoculados com MEM. **CP:** Animais inoculados e não tratados. **VQ30:** Animais inoculados e tratados com quercetina 30 mg/kg/dia. **VQ90:** Animais inoculados e tratados com quercetina 90 mg/kg/dia. **VQ270:** Animais inoculados e tratados com quercetina 270 mg/kg/dia.

Os leucócitos podem ser divididos em 3 grandes classes: linfócitos, granulócitos e monócitos. Dentre os linfócitos, duas subclasses podem ser reconhecidas, os linfócitos T e os linfócitos B, relacionados à imunidade celular e humoral, respectivamente. Na avaliação de linfócitos totais foi observado o mesmo perfil apresentado para contagem de leucócitos. Novamente, os machos do grupo controle positivo apresentaram uma diminuição acentuada do número de linfócitos com 7 d.p.i. Nos animais tratados com a dose de 270 mg/kg/dia também foi verificado um aumento do número de linfócitos em relação aos animais não tratados, mas este aumento foi significativo para as fêmeas aos 7 d.p.i (Tabela 2 e Figura 7).

Tabela 2: Dados da análise hematológica para contagem de linfócitos (LYM). Médias seguidas por letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste t de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. O asterisco* significa diferença estatística em relação ao grupo CP pelo Teste de Dunnett ($\alpha = 5\%$).

Tratamentos	LYM (*10 ³ /uL)		Tratamentos	LYM (*10 ³ /uL)	
	M	F		M	F
CN T7	1,31 ± 0,60 ^a	1,59 ± 0,70 ^b	CN T15	1,75 ± 0,88 ^c	3,10 ± 1,41 ^{ab}
CP T7	0,40 ± 0,08 ^a	2,56 ± 0,74 ^b	CP T15	4,38 ± 0,46 ^{ab}	2,18 ± 0,57 ^b
Q30 T7	2,04 ± 1,34 ^a	1,57 ± 0,91 ^b	Q30 T15	1,00 ± 0,94 ^c	3,10 ± 0,82 ^{ab}
Q90 T7	2,14 ± 0,70 ^a	3,48 ± 1,26 ^{ab}	Q90 T15	2,63 ± 0,61 ^{bc}	2,83 ± 0,86 ^a
Q270 T7	1,84 ± 0,94 ^a	5,12 ± 2,31 ^{a*}	Q270 T15	6,51 ± 1,23 ^a	4,62 ± 1,23 ^a

CN: Animais inoculados com MEM. **CP:** Animais inoculados e não tratados. **VQ30:** Animais inoculados e tratados com quercetina 30 mg/kg/dia. **VQ90:** Animais inoculados e tratados com quercetina 90 mg/kg/dia. **VQ270:** Animais inoculados e tratados com quercetina 270 mg/kg/dia.

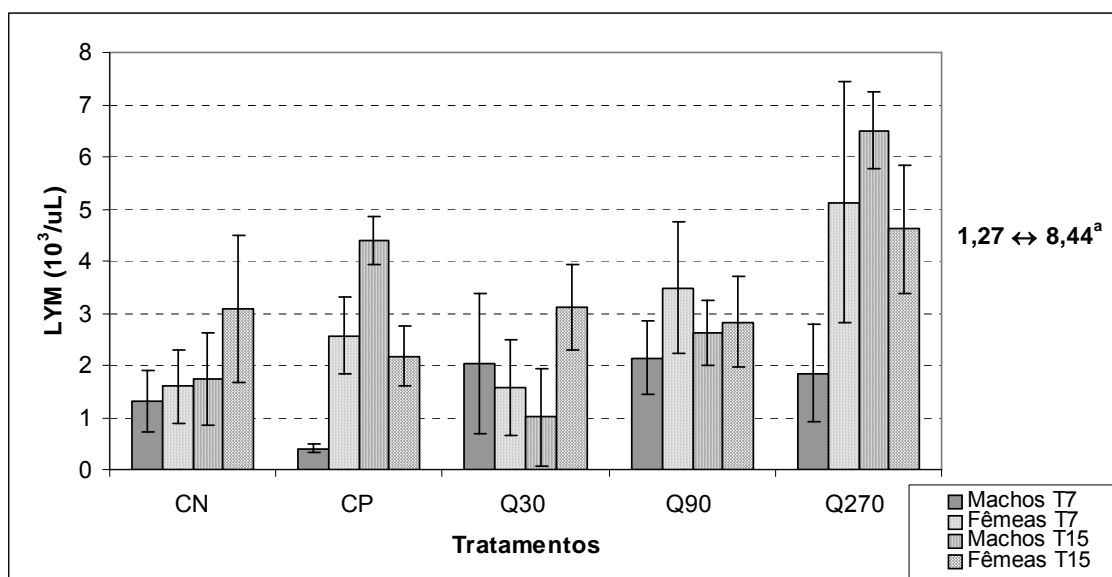


Figura 7: Contagem de linfócitos (LYM).

^a Faixa de valores normais para camundongos Balb/c de Jain N.C., 1993.

CN: Animais inoculados com MEM. **CP:** Animais inoculados e não tratados. **VQ30:** Animais inoculados e tratados com quercetina 30 mg/kg/dia. **VQ90:** Animais inoculados e tratados com quercetina 90 mg/kg/dia. **VQ270:** Animais inoculados e tratados com quercetina 270 mg/kg/dia.

As células linfocitárias também são expressas em relação à quantidade de leucócitos (%LY). Essa porcentagem deve ser em média igual a $83,5 \pm 4,95$ em camundongos da linhagem Balb/c. Todos os animais apresentaram-se incluídos nesta faixa de valores normais de referência (Tabela 3 e Figura 8).

Tabela 3: Dados da análise hematológica para % de linfócitos (%LY). Médias seguidas pela mesma letra são estatisticamente iguais pelo teste t de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tratamentos	LY (%)		Tratamentos	LY (%)	
	M	F		M	F
CN T7	86,70±3,46 ^a	85,28±5,24 ^a	CN T15	74,30±11,71 ^a	79,32±3,75 ^a
CP T7	79,50±2,16 ^a	78,50±7,15 ^a	CP T15	71,07±3,01 ^a	84,78±2,55 ^a
Q30 T7	78,02±4,01 ^a	78,48±9,31 ^a	Q30 T15	78,15±1,52 ^a	80,28±3,93 ^a
Q90 T7	81,17±3,20 ^a	84,18±3,86 ^a	Q90 T15	73,38±3,40 ^a	79,85±5,77 ^a
Q270 T7	83,52±0,84 ^a	84,38±4,22 ^a	Q270 T15	80,02±3,46 ^a	82,15±6,83 ^a

CN: Animais inoculados com MEM. **CP:** Animais inoculados e não tratados. **VQ30:** Animais inoculados e tratados com quercetina 30 mg/kg/dia. **VQ90:** Animais inoculados e tratados com quercetina 90 mg/kg/dia. **VQ270:** Animais inoculados e tratados com quercetina 270 mg/kg/dia.

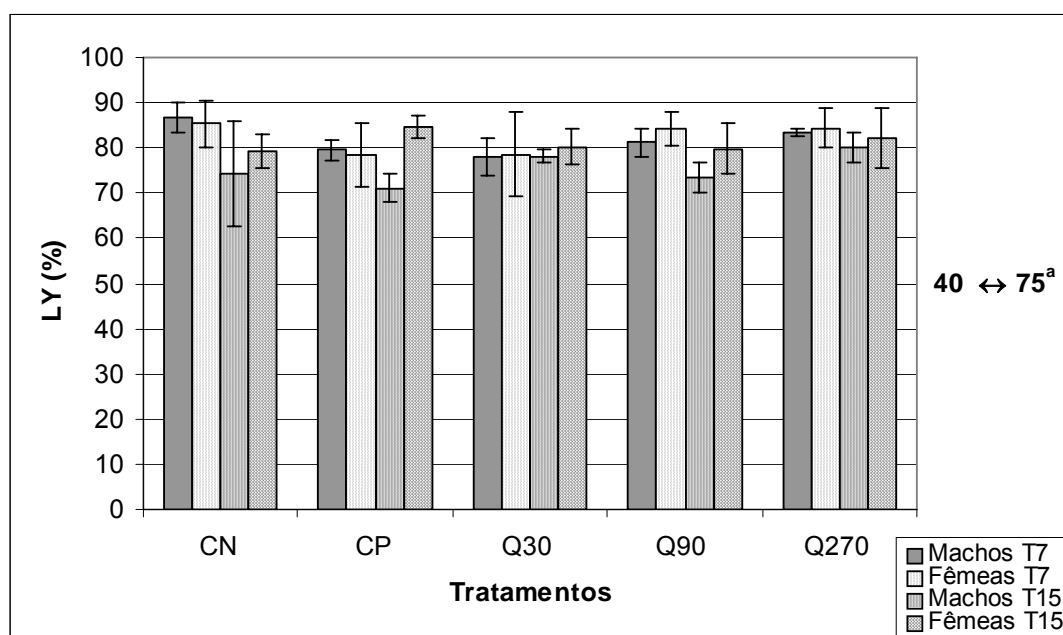


Figura 8: Porcentagem de linfócitos em relação às células brancas totais.

^a Faixa de valores normais para camundongos Balb/c de Jain N.C., 1993.

CN: Animais inoculados com MEM. **CP:** Animais inoculados e não tratados. **VQ30:** Animais inoculados e tratados com quercetina 30 mg/kg/dia. **VQ90:** Animais inoculados e tratados com quercetina 90 mg/kg/dia. **VQ270:** Animais inoculados e tratados com quercetina 270 mg/kg/dia.

Apesar de não ter havido diferenças na porcentagem de linfócitos entre os grupos, quadros patológicos relacionados a mudanças no número de linfócitos, como por exemplo, linfocitopenia, possuem valores clínicos

quando é considerado o valor absoluto (LYM) (MILLER & GONÇALVES, 1995).

Além dos linfócitos, também foram analisados a contagem de granulócitos e monócitos. Ambas as classes de leucócitos estão relacionados com a resposta fagocítica. Os monócitos migram facilmente através das paredes dos vasos sanguíneos e se transformam em células fagocitárias, os macrófagos. Em relação ao número de monócitos (MID), a maioria dos animais apresentou-se dentro da faixa dos valores de referência. Os animais tratados com a dose de 90 e 270 mg/kg/dia apresentaram aos 15 d.p.i., valores estatisticamente superiores em relação aos animais não tratados (CP). No entanto, aos 7 d.p.i., as 3 doses aumentaram a porcentagem dessas células (%MI) quando comparadas ao grupo CP (Tabelas 4 e 5; Figuras 9 e 10).

Tabela 4: Dados da análise hematológica para contagem de monócitos (MID). Médias seguidas pela mesma letra são estatisticamente iguais pelo teste t de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. O asterisco* significa diferença estatística em relação ao grupo CP pelo Teste de Dunnett ($\alpha = 5\%$).

Tratamentos	MID ($10^3/\mu\text{L}$)		Tratamentos	MID ($10^3/\mu\text{L}$)	
	M	F		M	F
CN T7	0,07±0,05 ^a	0,06±0,06 ^a	CN T15	0,15 ±0,14 ^a	0,28±0,26 ^a
CP T7	0,09±0,04 ^a	0,08±0,04 ^a	CP T15	0,04 ±0,02 ^a	0,17±0,06 ^a
Q30 T7	0,10±0,04 ^a	0,07±0,04 ^a	Q30 T15	0,17 ±0,06 ^a	0,12±0,06 ^a
Q90 T7	0,07±0,04 ^a	0,18±0,14 ^a	Q90 T15	0,33±0,08 ^{a*}	0,37±0,33 ^a
Q270 T7	0,03±0,02 ^a	0,12±0,09 ^a	Q270 T15	0,32±0,24 ^{a*}	0,07±0,02 ^a

CN: Animais inoculados com MEM. **CP:** Animais inoculados e não tratados. **VQ30:** Animais inoculados e tratados com quercetina 30 mg/kg/dia. **VQ90:** Animais inoculados e tratados com quercetina 90 mg/kg/dia. **VQ270:** Animais inoculados e tratados com quercetina 270 mg/kg/dia.

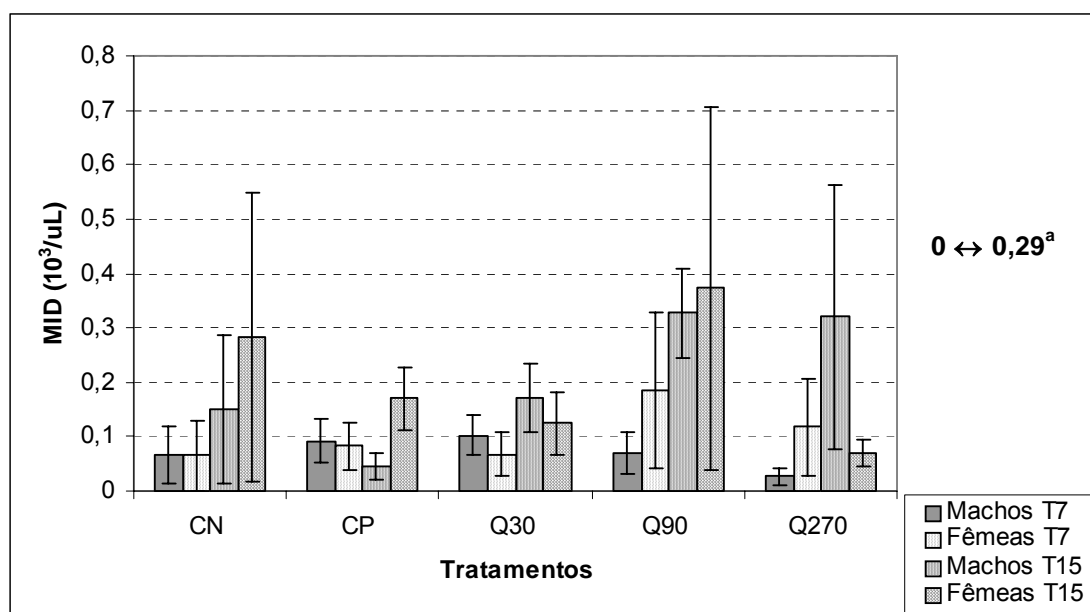


Figura 9: Contagem de monócitos.

^a Faixa de valores normais para camundongos Balb/c de Jain N.C., 1993.

CN: Animais inoculados com MEM. **CP:** Animais inoculados e não tratados. **VQ30:** Animais inoculados e tratados com quercetina 30 mg/kg/dia. **VQ90:** Animais inoculados e tratados com quercetina 90 mg/kg/dia. **VQ270:** Animais inoculados e tratados com quercetina 270 mg/kg/dia.

Tabela 5: Dados da análise hematológica para porcentagem de monócitos (% MI). Médias seguidas pela mesma letra são estatisticamente iguais pelo teste t de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. O asterisco* significa diferença estatística em relação ao grupo CP pelo Teste de Dunnett ($\alpha = 5\%$).

Tratamentos	MI (%)		Tratamentos	MI (%)	
	M	F		M	F
CN T7	3,70±2,12 ^a	2,92±1,84 ^b	CN T15	5,40±3,91 ^a	6,10±3,11 ^a
CP T7	5,83± 4,01 ^a	3,35±1,72 ^b	CP T15	6,17± 2,71 ^a	2,90±1,66 ^a
Q30 T7	4,22±0,86 ^a	17,68±4,67 ^{a*}	Q30 T15	4,72±2,18 ^a	4,48 ±1,32 ^a
Q90 T7	2,13±1,07 ^a	14,52±5,12 ^{a*}	Q90 T15	4,78 ±1,44 ^a	3,62±1,30 ^a
Q270 T7	2,75±0,94 ^a	13,08±1,95 ^{a*}	Q270 T15	4,10±1,07 ^a	6,22±4,32 ^a

CN: Animais inoculados com MEM. **CP:** Animais inoculados e não tratados. **VQ30:** Animais inoculados e tratados com quercetina 30 mg/kg/dia. **VQ90:** Animais inoculados e tratados com quercetina 90 mg/kg/dia. **VQ270:** Animais inoculados e tratados com quercetina 270 mg/kg/dia.

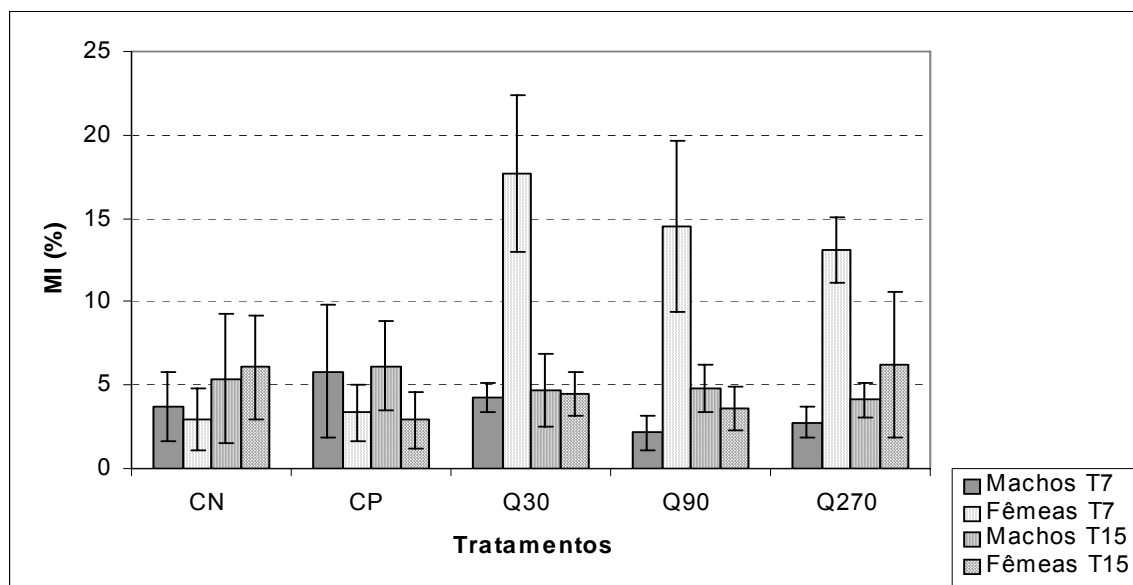


Figura 10: Porcentagem de monócitos.

CN: Animais inoculados com MEM. **CP:** Animais inoculados e não tratados. **VQ30:** Animais inoculados e tratados com quercetina 30 mg/kg/dia. **VQ90:** Animais inoculados e tratados com quercetina 90 mg/kg/dia. **VQ270:** Animais inoculados e tratados com quercetina 270 mg/kg/dia.

Quanto ao número e a porcentagem de granulócitos, não houve flutuação significativa estatisticamente em seu número quando foram comparados os valores dos animais inoculados em relação aos animais que não receberam o vírus (grupo controle negativo-CN) (Tabelas 6 e 7, Figura 11 e 12). Não foram encontrados valores normais de referência para este parâmetro hematológico.

Tabela 6: Dados da análise hematológica para contagem de granulócitos (GRA). Médias seguidas pela mesma letra são estatisticamente iguais pelo teste t de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. O asterisco* significa diferença estatística em relação ao grupo CP pelo Teste de Dunnett ($\alpha = 5\%$).

Tratamentos	GRA (*10 ³ /uL)		Tratamentos	GRA (*10 ³ /uL)	
	M	F		M	F
CN T7	0,15±0,09 ^a	0,23±0,15 ^a	CN T15	0,48±0,35 ^a	0,58±0,30 ^a
CP T7	0,08±0,05 ^a	0,65±0,43 ^a	CP T15	0,92±0,52 ^a	0,32±0,08 ^a
Q30 T7	0,50±0,37 ^a	0,20±0,14 ^a	Q30 T15	0,23±0,21 ^{a*}	0,59±0,22 ^a
Q90 T7	0,42±0,30 ^a	0,63±0,41 ^a	Q90 T15	0,78±0,22 ^a	0,58±0,23 ^a
Q270 T7	0,30±0,18 ^a	0,85±0,56 ^a	Q270 T15	1,28±0,24 ^a	0,68±0,30 ^a

CN: Animais inoculados com MEM. **CP:** Animais inoculados e não tratados. **VQ30:** Animais inoculados e tratados com quercetina 30 mg/kg/dia. **VQ90:** Animais inoculados e tratados com quercetina 90 mg/kg/dia. **VQ270:** Animais inoculados e tratados com quercetina 270 mg/kg/dia.

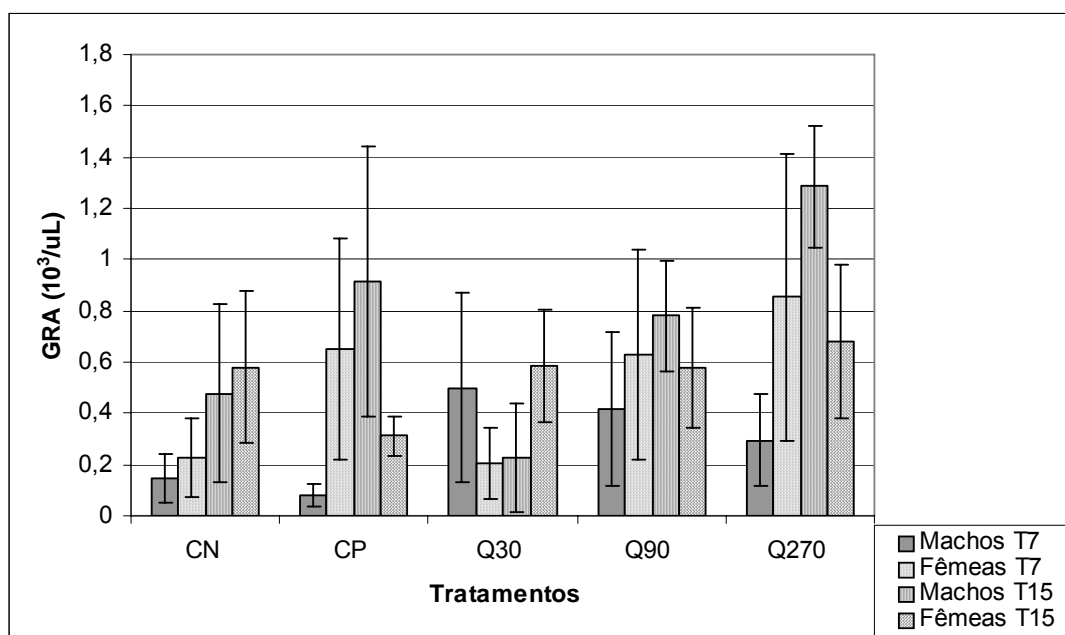


Figura 11: Contagem de granulócitos.

CN: Animais inoculados com MEM. **CP:** Animais inoculados e não tratados. **VQ30:** Animais inoculados e tratados com quercetina 30 mg/kg/dia. **VQ90:** Animais inoculados e tratados com quercetina 90 mg/kg/dia. **VQ270:** Animais inoculados e tratados com quercetina 270 mg/kg/dia.

Tabela 7: Dados da análise hematológica para porcentagem de granulócitos (%GR). Médias seguidas pela mesma letra são estatisticamente iguais pelo teste t de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tratamentos	GR (%)		Tratamentos	GR (%)	
	M	F		M	F
CN T7	9,53±2,63 ^a	11,85±3,99 ^a	CN T15	20,28±8,62 ^a	14,55±2,13 ^a
CP T7	11,37±8,24 ^a	18,12±6,92 ^a	CP T15	22,80±4,65 ^a	12,32±1,42 ^a
Q30 T7	17,68±4,67 ^a	20,77±7,51 ^a	Q30 T15	17,12±2,16 ^a	15,25±3,78 ^a
Q90 T7	14,52±5,12 ^a	14,10±3,42 ^a	Q90 T15	21,90±4,45 ^a	16,55±4,56 ^a
Q270 T7	13,08±1,95 ^a	12,85±3,83 ^a	Q270 T15	15,92±3,21 ^a	11,65±2,60 ^a

CN: Animais inoculados com MEM. **CP:** Animais inoculados e não tratados. **VQ30:** Animais inoculados e tratados com quercetina 30 mg/kg/dia. **VQ90:** Animais inoculados e tratados com quercetina 90 mg/kg/dia. **VQ270:** Animais inoculados e tratados com quercetina 270 mg/kg/dia.

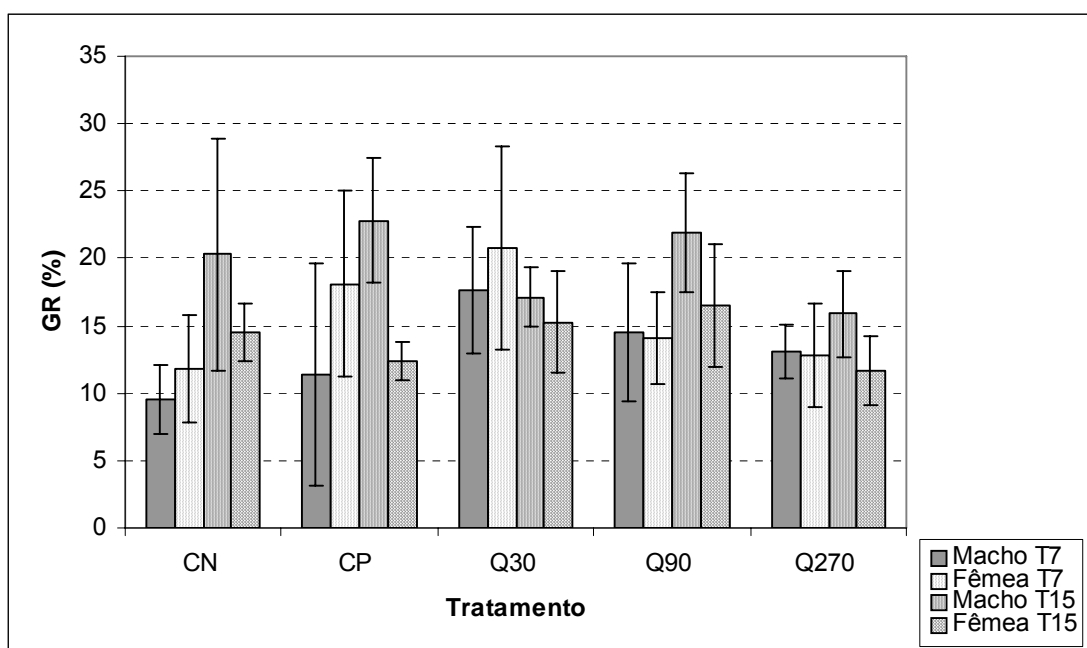


Figura 12: Porcentagem de granulócitos.

CN: Animais inoculados com MEM. **CP:** Animais inoculados e não tratados. **VQ30:** Animais inoculados e tratados com quercetina 30 mg/kg/dia. **VQ90:** Animais inoculados e tratados com quercetina 90 mg/kg/dia. **VQ270:** Animais inoculados e tratados com quercetina 270 mg/kg/dia.

Apenas no grupo de animais tratados com a dose de 30 mg/kg/dia, aos 15 d.p.i., o número de granulócitos foi estatisticamente inferior pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade quando comparado aos animais não tratados.

Também foram analisados parâmetros sanguíneos relacionados à série vermelha do sangue. Os eritrócitos, que são as células sanguíneas vermelhas (RBC), atuam como transportadores de gases (O_2 e CO_2) e o seu número, bem como a concentração de hemoglobina (HGB), indicam a capacidade do organismo de realizar eficientemente este transporte.

Quando foi analisada a contagem de eritrócitos (RBC), nenhuma diferença estatística foi observada entre os animais. No entanto, pode ser observado que animais do grupo não tratado (CP) apresentaram aos 7 d.p.i. um número de eritrócitos e concentração de hemoglobina abaixo dos valores normais de referência, o que é característico de um quadro de anemia (Figura 13 e 14). Aos 15º d.p.i., esses animais recuperaram

naturalmente desse quadro. Isto pode ser próprio da homeostase corporal em que, em baixas concentrações de O₂ na corrente sanguínea, originada de um quadro de anemia, os rins liberam um hormônio denominado eritropoetina que é capaz de estimular a produção de novas células vermelhas e, portanto, reverter o quadro de anemia. Os valores encontrados para a contagem de eritrócitos (RBC), concentração de hemoglobina (HGB) e hematócrito (HCT) estão representados nas Tabelas 8, 9 e 10 e nas Figuras 13, 14 e 15. O hematócrito corresponde à porcentagem de sangue composto por células após centrifugação. Como o número de eritrócitos predomina largamente em relação às outras células sanguíneas, o hematócrito depende praticamente do volume ocupado por eles (MILLER & GONÇALVES, 1995).

Tabela 8: Dados da análise hematológica para contagem de eritrócitos (RBC). Médias seguidas pela mesma letra são estatisticamente iguais pelo teste t de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tratamentos	RBC (*10 ⁶ /uL)		Tratamentos	RBC (*10 ⁶ /uL)	
	M	F		M	F
CN T7	7,31±1,75 ^a	4,94±1,80 ^a	CN T15	10,80±5,96 ^a	8,80±3,21 ^a
CP T7	3,77 ±1,31 ^a	6,80±2,01 ^a	CP T15	7,85 ± 4,03 ^a	8,63 ± 3,80 ^a
Q30 T7	7,10 ±1,72 ^a	8,10 ± 2,16 ^a	Q30 T15	4,95 ± 3,51 ^a	10,01±2,50 ^a
Q90 T7	8,26±2,47 ^a	14,15±10,47 ^a	Q90 T15	11,35±1,09 ^a	11,11±1,87 ^a
Q270 T7	8,78±2,65 ^a	9,59 ± 3,37 ^a	Q270 T15	12,58±0,74 ^a	9,43 ± 2,40 ^a

CN: Animais inoculados com MEM. **CP:** Animais inoculados e não tratados. **VQ30:** Animais inoculados e tratados com quercetina 30 mg/kg/dia. **VQ90:** Animais inoculados e tratados com quercetina 90 mg/kg/dia. **VQ270:** Animais inoculados e tratados com quercetina 270 mg/kg/dia.

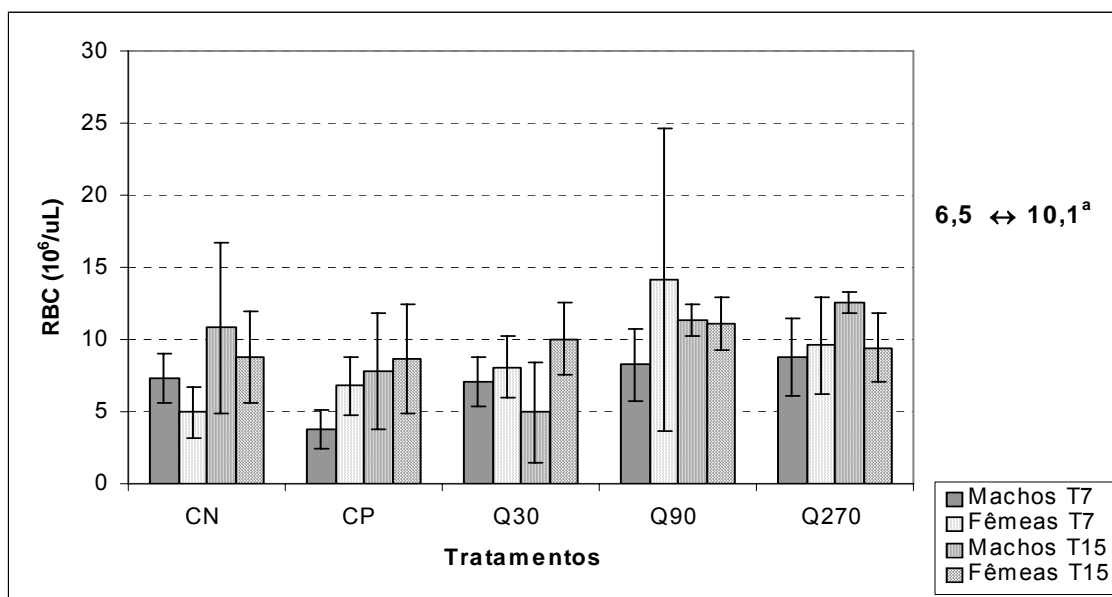


Figura 13: Contagem de eritrócitos.

^a Faixa de valores normais para camundongos Balb/c de Jain N.C., 1993.

CN: Animais inoculados com MEM. **CP:** Animais inoculados e não tratados. **VQ30:** Animais inoculados e tratados com quercetina 30 mg/kg/dia. **VQ90:** Animais inoculados e tratados com quercetina 90 mg/kg/dia. **VQ270:** Animais inoculados e tratados com quercetina 270 mg/kg/dia.

Tabela 9: Dados da análise hematológica para concentração de hemoglobina (HGB). Médias seguidas pela mesma letra são estatisticamente iguais pelo teste t de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tratamentos	HGB (g/dL)		Tratamentos	HGB (g/dL)	
	M	F		M	F
CN T7	10,23±2,61 ^a	6,90±0,76 ^a	CN T15	11,85±5,03 ^a	11,98±3,92 ^a
CP T7	5,07±1,88 ^a	9,45±2,43 ^a	CP T15	10,72±5,23 ^a	11,48±4,66 ^a
Q30 T7	9,42±2,04 ^a	10,78±2,69 ^a	Q30 T15	6,78±4,68 ^a	12,85±3,43 ^a
Q90 T7	9,82±2,69 ^a	10,20±3,35 ^a	Q90 T15	15,08±1,90 ^a	14,12±1,63 ^a
Q270 T7	9,78±3,21 ^a	13,18±4,01 ^a	Q270 T15	15,60±0,76 ^a	13,25±3,69 ^a

CN: Animais inoculados com MEM. **CP:** Animais inoculados e não tratados. **VQ30:** Animais inoculados e tratados com quercetina 30 mg/kg/dia. **VQ90:** Animais inoculados e tratados com quercetina 90 mg/kg/dia. **VQ270:** Animais inoculados e tratados com quercetina 270 mg/kg/dia.

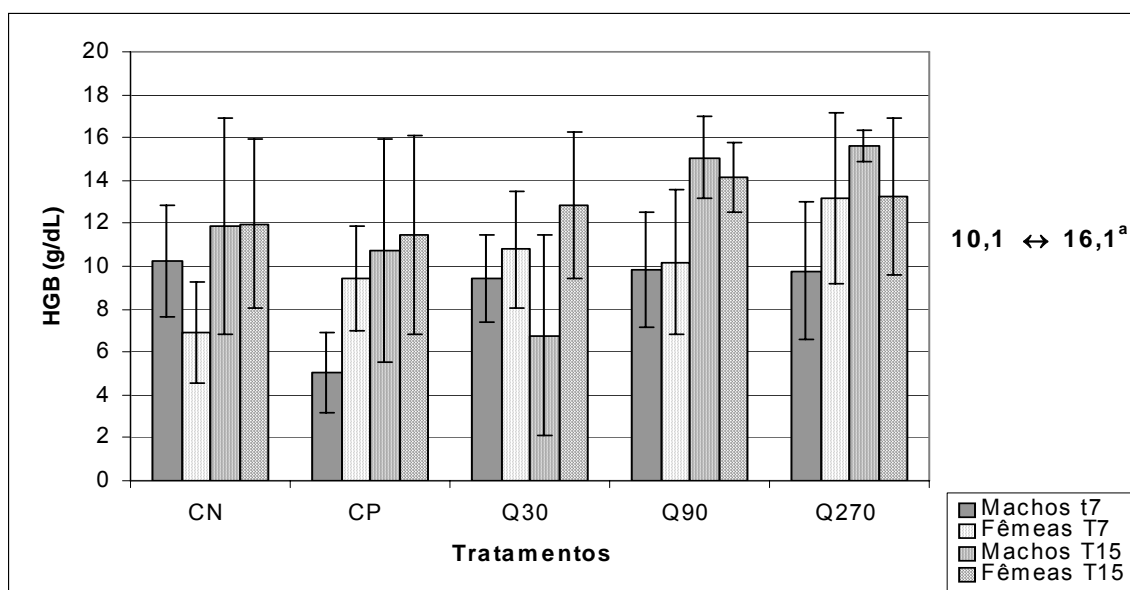


Figura 14: Concentração de hemoglobina.

^a Faixa de valores normais para camundongos Balb/c de Jain N.C., 1993.

CN: Animais inoculados com MEM. **CP:** Animais inoculados e não tratados. **VQ30:** Animais inoculados e tratados com quercetina 30 mg/kg/dia. **VQ90:** Animais inoculados e tratados com quercetina 90 mg/kg/dia. **VQ270:** Animais inoculados e tratados com quercetina 270 mg/kg/dia.

Tabela 10: Dados da análise hematológica para o hematócrito (HCT). Médias seguidas pela mesma letra são estatisticamente iguais pelo teste t de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tratamentos	HCT (%)		Tratamentos	HCT (%)	
	M	F		M	F
CN T7	34,30±8,95 ^a	23,88±8,74 ^a	CN T15	49,58±27,10 ^a	40,60±14,57 ^a
CP T7	17,50±6,40 ^a	31,15±9,42 ^a	CP T15	37,22±19,42 ^a	39,35±17,24 ^a
Q30 T7	33,00±8,01 ^a	36,42±10,37 ^a	Q30 T15	22,51±16,40 ^a	45,70±12,00 ^a
Q90 T7	39,12±12,38 ^a	46,00±35,58 ^a	Q90 T15	53,18 ±5,14 ^a	48,50±7,75 ^a
Q270 T7	40,78±12,36 ^a	43,02±15,18 ^a	Q270 T15	56,25±3,15 ^a	42,62±10,43 ^a

CN: Animais inoculados com MEM. **CP:** Animais inoculados e não tratados. **VQ30:** Animais inoculados e tratados com quercetina 30 mg/kg/dia. **VQ90:** Animais inoculados e tratados com quercetina 90 mg/kg/dia. **VQ270:** Animais inoculados e tratados com quercetina 270 mg/kg/dia.

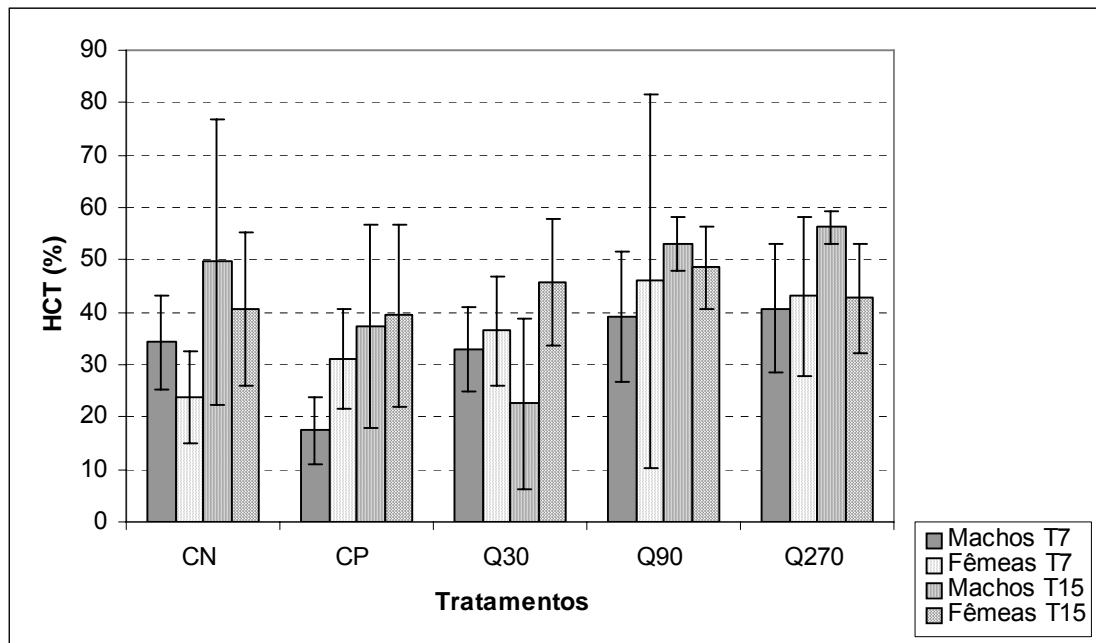


Figura 15: Valores do hematócrito.

CN: Animais inoculados com MEM. **CP:** Animais inoculados e não tratados. **Q30:** Animais inoculados e tratados com quercetina 30 mg/kg/dia. **Q90:** Animais inoculados e tratados com quercetina 90 mg/kg/dia. **Q270:** Animais inoculados e tratados com quercetina 270 mg/kg/dia.

As alterações nos parâmetros hematológicos foram observadas nos animais inoculados e não tratados, principalmente em relação à série branca sanguínea. Foi possível verificar que a resposta imunológica foi estimulada pela quercetina nos animais tratados com a dose de 270 mg/kg/dia. A natureza desta estimulação deve ser mais bem compreendida já que nos ensaios de linfoproliferação as menores doses pareceram estimular a resposta imunológica celular contra o EHV-1, enquanto que a dose de 270 mg/kg/dia estimulou apenas a resposta contra a própria quercetina.

O EHV-1 estabelece uma viremia associada a células mononucleares sanguíneas principalmente linfócitos e menos pronunciadamente em monócitos (SCOTT *et al.*, 1983, VAN DER MEULEN *et al.*, 2006). A estimulação de linfócitos de maneira responsiva não específica contra o EHV-1 pode ser não desejada, pois permite um número maior de células infectadas e conseqüentemente uma maior disseminação do vírus. Isto foi demonstrado *in vitro* por Van der Meulen *et al.* (2002), que após estimularem

PBMC com agentes mitogênicos observaram uma maior porcentagem de infecção dessas células. Assim, a dose de 270 mg/kg/dia poderia estar atuando negativamente no controle da infecção.

Em relação aos parâmetros hematológicos relacionados à série vermelha do sangue, apesar de não ter sido demonstrado variações entre os animais tratados, estudos já revelaram interação dos flavonóides, inclusive a quercetina, com os eritrócitos. Chaudhuri *et al.* (2007) verificaram a ligação de flavonóides a membrana dos eritrócitos inibindo significativamente a peroxidação de lipídeos e ao mesmo tempo aumentando a sua integridade contra a lise hipotônica. A ligação da quercetina e da rutina a hemoglobina também foi observada por Xi & Guo (2007). Esta ligação provocou mudanças conformacionais na molécula da hemoglobina.

Assim, a multifuncionalidade dos flavonóides e principalmente da quercetina pode ser avaliada atuando como possível agente antiviral não somente de forma direta na infecção viral, mas também por meio da estimulação de respostas do organismo que possam também colaborar para um maior controle da infecção.

4. CONCLUSÃO

Os Herpesvírus são amplamente utilizados para estudos em busca de novas substâncias antivirais. As características de infecção desses vírus e a possibilidade de reprodução da infecção em animais de laboratório, compatíveis com a infecção nos hospedeiros naturais, justificam seu uso como modelo de estudo. Substâncias naturais são alvos para as mais diversas pesquisas e vem sendo utilizadas em estudos para tratamento de infecções virais. Assim, neste trabalho, a atividade antiviral da quercetina foi avaliada contra o Herpesvírus Equino (EHV-1) *in vitro* e *in vivo*. Nos ensaios *in vitro*, foi observada uma inibição de 90,0% no AID e 99,0% no ensaio *End Point*. No ensaio de incubação da quercetina a cada passo de infecção viral foi observada uma inibição de 99,0% quando houve incubação no momento da adsorção viral. Estes resultados indicam que a atividade antiviral da quercetina reside principalmente nos passos iniciais da infecção viral, possivelmente através da ligação em receptores celulares utilizados pelos vírus. No ensaio *in vivo*, observou-se que a quercetina estimulou a resposta imune celular dos animais inoculados e tratados. Os tratamentos de 30 e 90 mg/kg/dia estimularam a resposta celular dos animais contra o EHV-1, entretanto, a maior dose administrada de 270 mg/kg/dia estimulou a resposta linfoproliferativa específica ao estímulo pela própria quercetina. Nas análises hematológicas, verificou-se uma ação da quercetina nos parâmetros hematológicos relacionados à série branca do sangue, tais como na produção de leucócitos, dentre eles os linfócitos. A produção das células vermelhas sanguíneas não sofreu alteração diante do tratamento da quercetina. Dessa maneira, sugere-se com os resultados encontrados, que a quercetina constitui um bom candidato a agente antiviral por demonstrar atividade antiviral nos ensaios *in vitro* e pela atuação moduladora de respostas no organismo que indiretamente controle a infecção viral.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, R., OLIVEIRA, A., SOUZA, A., PASSOS, L.M.F., MARTINS, A.S., 2000. Prevalence of equine herpesvirus type 1 latency detected by polymerase chain reaction. *Archives of Virology*. 145, 1773-1787.
- CHAUDHURI, S., BANERJEE, A., BASU, K., SENGUPTA, B., SENGUPTA, P.K., 2007. Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: Antioxidant and antihemolytic effects. *International Journal of Biological Macromolecules*. 41, 42-48.
- DEL PIERO, F., WILKINS, P., 2001. Pulmonary vasculotropic EHV-1 infection in equids. *Veterinary Pathology*. 38, 474-475.
- DEL PIERO, F., WILKINS, P., TIMONEY, P., KADUSHIN, J., VOGELBACKER, H., LEE, J.W., BERKOWITZ, S.J., LA PERLE, K.M.D., 2000. Fatal nonneurological EHV-1 infection in a yearling filly. *Veterinary Pathology*. 37, 672-676.
- FIELD, H.J., BISWAS, S., MOHAMMAD, I.T., 2006. Herpesvirus latency and therapy-From a veterinary perspective. *Antiviral Research*. 71, 127-133.
- FOOTE, C.E., LOVE, D.N., GILKERSON, J.R., WELLINGTON, J.E., WHALLEY, J.M., 2006. EHV-1 and EHV-4 infection in vaccinated mares and their foals. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 111, 41-46.
- DE LA FUENTE, R., AWAN, R., FIELD H.J., 1992. The acyclic nucleoside analogue penciclovir is a potent inhibitor of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) in tissue culture and in a murine model. *Antiviral Research*, 18, 77-89.

- GARRÉ, B., VAN DER MEULEN, K., NUGENT, J., NEYTS, J., CROUBELS, S., BACKER, P.D., NAUWYNCK, H., 2007. *In vitro* susceptibility of six isolates of equine herpesvirus 1 to acyclovir, ganciclovir, cidofovir, adefovir, PMEDAP and foscarnet. *Veterinary Microbiology*.
- HASEBE, R., KIMURA, T., SATO, E., OKAZAKI, K., OCHIAI, K., WADA, R., UMEMURA, T., 2002. Equine Herpesvirus-1-induced encephalomyelitis in mice: a comparative study of neuroadapted virus and its parental strain. *Journal Comparative Pathology*. 127, 118-125.
- LIN, J., TANG, C., 2007. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*. 101, 140-147.
- MOSMANN, T., 1983. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65, 55-63.
- MÜLLER, O., GONÇALVES, R.R., 1995. Laboratório para o clínico. 8ª Edição. Ed. Atheneu, 624p.
- MURPHY, F.A., GIBBS, E.P.J., HORZINEK, M.C., STUDDERT, M.J., 1999. *Veterinary Virology*. 3ª Edição. Academic Press. San Diego. 629p.
- MURRAY, M.J., DEL PIERO, F., JEFFREY, S.C., DAVIS, M.S., FURR, M.O., DUBOVI, E.J., MAYO, J.A., 1998. Neonatal equine herpesvirus type 1 infection on a thoroughbred breeding farm. *Journal Veterinary Internal Medicine*. 12, 36-41.
- PATEL, J.R., HELDENS, J., 2005. Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4)-epidemiology, disease and immunoprophilaxis: a brief review. *Veterinary Journal*. 170, 14-23.

- REED, J.H.; MUENCH, H., 1938. A simple method for estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene*, 27, 493-496.
- SCOTT, J.C., DUTTA, S.K., MYRUP, A.C., 1983. In vivo harboring of equine herpesvirus-1 in leukocytes populations and subpopulation and their quantitation from experimentally infected ponies. *American Journal of Veterinary Research*, 44, 1344-1348.
- THRALL, M.A., BAKER, D.C., CAMPBELL, T.W., DENICOLA, D., FETTMAN, M.J., LASSEN, E.D., REBAR, A., WEISER, G., 2006. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 1ª Edição. Ed. Roca, São Paulo.
- VAN DER MEULEN, K., CAIJ, B., PENZAERT, M., NAUWYNCK, H., 2006. Absence of viral envelope proteins in equine herpesvirus 1-infected blood mononuclear cells during cell-associated viremia. *Veterinary Microbiology*. 113, 265-273.
- VAN DER MEULEN, K.M., NAUWYNCK, H.J., PENZAERT, M.B., 2002. Increased susceptibility of peripheral blood mononuclear cells to equine herpes virus type1 infection upon mitogen stimulation: a role of the cycle and cell-to-cell transmission of the virus. *Veterinary Microbiology*. 86, 157-163.
- WELCH, H.M., BRIDGES, C.G., LYON, A.M., GRIFFITHS, L., EDINGTON, N., 1992. Latent equid herpesvirus 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues. *Journal of General Virology*. 73, 261-268.
- XI, J., GUO, R., 2007. Interactions between flavonoids and hemoglobin in lecithin liposomes. *International Journal of Biological Macromolecules*. 40, 305-311.

CAPÍTULO 3

Avaliação antiviral da quercetina *in vitro* e *in vivo* contra o Herpesvírus Bovino 5 (BoHV-5)

**VIÇOSA
ABRIL DE 2007**

RESUMO

A procura de novas drogas que atuem contra infecções virais tem se tornado cada vez maior. Substâncias naturais vêm servindo como alvo dessas novas pesquisas. Os herpesvírus estão entre os vírus mais empregados nos estudos de drogas antivirais devido as suas características de infecção. Eles pertencem à família *Herpesviridae* e na subfamília *Alfaherpesvirinae* encontram-se os principais representantes de doenças em animais e humanos, dentre eles o Herpesvírus Bovino 5 (BoHV-5). Neste trabalho procurou-se avaliar a atividade antiviral do flavonóide quercetina contra o BoHV-5 *in vitro* e *in vivo*. No ensaio de Inativação Direta (AID) incubou-se a quercetina com o vírus antes da inoculação. Neste ensaio, foi possível verificar a redução do título viral de 99,0% nos primeiros 15 minutos de incubação. No *End Point*, pré-tratamento das células com a quercetina, não houve redução significativa do título viral. No tratamento das células em cada passo da infecção (*Timing of Addition*), pode-se perceber uma possível atuação da quercetina nos passos iniciais da infecção. No estudo *in vivo*, coelhos foram inoculados experimentalmente com o BoHV-5 e tratados com a quercetina, aciclovir e a associação dessas duas substâncias. Foi observada uma melhor atuação do aciclovir contra o vírus, já que neste grupo de animais a mortalidade foi menor. No entanto, animais tratados com a quercetina demonstraram menor excreção viral e lesões cerebrais menos severas comprovando o potencial neuroprotetor da quercetina. Uma melhor resposta na produção de anticorpos também foi observada nestes animais. Os animais tratados com a associação quercetina e aciclovir apresentaram uma maior excreção viral e maior taxa de mortalidade quando comparados com os animais tratados com essas substâncias isoladamente, o que demonstra uma possível ação antagônica entre elas. Apesar da atuação da quercetina ter sido inferior a do medicamento de referência utilizado, este flavonóide apresentou-se eficiente no controle da infecção pelo BoHV-5.

ABSTRACT

The search of new drugs that act against virus infections has turned very large. Natural substances are serving as objective of those new researches. The herpesvirus is among the viruses more employees in the studies of antiviral drugs due to its infection characteristics. They belong to the family *Herpesviridae* and in the subfamily *Alphaherpesviridae* meets the main representatives of diseases in animals and humans, between them Bovine Herpesvirus 5 (BoHV-5). In this work it tried to evaluate the activity antiviral of the flavonoid quercetin against the BoHV-5 in vitro and in vivo. In the assay of Inactivating Direct (AID) the quercetin was incubated with the virus before the inoculation. In this assay, it was possible to verify the reduction of the title viral of 99,0% in the first 15 minutes of incubation. In End Point, the cells where treated before treatment with quercetin, there were not significant reduction of the title viral. In the treatment of the cells in each step of the infection (Timing of Addition), it can be noticed a possible performance of the quercetin in the initial steps of the infection. In the study in vivo, rabbits were inoculated with the BoHV-5 and treated with the quercetin, acyclovir and the association of those two substances. A better performance of the acyclovir was observed against the virus, since in this group of animals the mortality was smaller. However, animals treated with the quercetin demonstrated smaller excretion viral and less severe cerebral lesions checking the potential neural protection of the quercetin. A better answer in the production of antibodies was also observed in those animals. The treated animals with the association quercetin and acyclovir presented a larger excretion viral and larger mortality rate when compared separately with the treated animals with those substances, what demonstrates a possible antagonistic action among them. In spite of the performance of the quercetin to have been inferior the one of the used reference medication, this flavonoid came efficient in the control of the infection for the BoHV-5.

1. INTRODUÇÃO

Os herpesvírus estão entre os vírus mais empregados nos estudos de drogas antivirais devido às suas características de infecção. Eles pertencem à família *Herpesviridae* e na subfamília *Alfaherpesvirinae* encontram-se os principais representantes de doenças em animais e humanos, entre eles: o Herpesvírus Bovino 1 (BoHV-1), que causa infecções respiratórias e genitais em bovinos associado raramente a quadros de encefalite e o Herpesvírus Bovino 5 (BoHV-5) que causa meningoencefalites não purulentas em bovinos, esses relacionados antigênica e geneticamente (METZLER *et al.*, 1986). As infecções herpéticas, principalmente nos pacientes portadores de HIV, são um dos maiores problemas de saúde pública no mundo e alvo para as mais diversas pesquisas sobre drogas antivirais. O Herpesvírus Humano (HHV) também pertence à subfamília *Alfaherpesvirinae* e a infecção causada por este vírus foi uma das primeiras infecções a fornecer o princípio que uma doença viral é tratada com sucesso por compostos antivirais (FIELD *et al.*, 2006).

Torna-se cada vez mais crescente a procura de novas substâncias que possuem atividade antimicrobiana. Drogas comerciais já conhecidas por essas atividades e muitas outras substâncias naturais são alvos de pesquisas para formulações de medicamentos que possam prevenir ou tratar infecções causadas por bactérias, fungos e vírus. Substâncias naturais extraídas de diversas plantas, bem como testes de fármacos comerciais e associações desses com as substâncias naturais vem sendo realizados na busca da prevenção das infecções virais e no tratamento dos sinais clínicos relacionados (GONG *et al.*, 2004). Os flavonóides fazem parte de uma classe de compostos fenólicos resultantes do metabolismo secundário de plantas. Quimicamente, os flavonóides apresentam um esqueleto fundamental de quinze carbonos contidos em dois anéis fenólicos e um terceiro não fenólico. Os flavonóides são encontrados em várias partes das plantas, tais como caule, folhas e frutos. Estes e outros compostos fenólicos derivados da via biossintética mista chiquimato e acetato, tem sido relatados como possuidores de ampla variedade de efeitos fisiológicos em plantas e animais, servindo como inibidores e ativadores de enzimas, quelante de

metais, antioxidantes, recrutadores de radicais livres, reguladores da transcrição, fitohormônios e como substâncias mutagênicas, antimutagênicas, carcinogênicas, anticarcinogênicas, citotóxicas, antiinflamatórias e antialergênicas (BERHOW, 1998).

Muitos estudos já relataram os efeitos de alguns flavonóides sobre a replicação de vírus animais, onde podem atuar na inativação direta, afetando a infectividade, ou podem ter efeito antireplicativo (SELWAY, 1986; HUDSON, 1990; VISON, 1998). A quercetina, um dos flavonóides mais pesquisados, parece ter atividade antiviral relacionada à habilidade desse composto de se ligar a proteínas do envelope viral interferindo na ligação e penetração do vírus na célula, no entanto, ela também pode atuar na síntese de DNA (FORMICA & REGELSON, 1995). Desta maneira, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antiviral do flavonóide quercetina *in vitro* e *in vivo* buscando assim, um maior entendimento dos mecanismos de ação deste flavonóide contra membros da subfamília *Alfaherpesvirinae* bem como relacionar essa possível ação antiviral com os mecanismos imunológicos e patológicos desses vírus.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Células e vírus

Para a realização dos ensaios *in vitro* foram utilizadas células de linhagem de rim bovino resistentes a pestivírus (CRIB) (FLORES & DONIS, 1995). As células foram mantidas em meio essencial mínimo (MEM) (SIGMA-ALDRICH) contendo penicilina (1,6 mg/L) (CULTILAB), estreptomicina (0,4 mg/L) (CULTILAB), suplementadas com soro fetal bovino (10%) (CULTILAB). Foi utilizada uma cepa padrão de laboratório de BoHV-5 (SV-507) fornecida pelo Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria/RS.

2.2. Flavonóide

A quercetina [3,3',4',5,6-Pentahydroxyflavone] (quercetin dihydrate) foi adquirida da empresa SIGMA-ALDRICH e a mesma foi preparada, para os ensaios *in vitro*, em dimetilsulfóxido (DMSO) (Nuclear) em uma concentração estoque de 10 mg/mL e armazenada a -20°C. Para os experimentos *in vivo* foram preparadas cápsulas de 20 mg de quercetina contendo talco farmacêutico como excipiente.

2.3. Preparo dos estoques de vírus e titulação

Os vírus foram inoculados em monocamadas semiconfluentes de células e após a manifestação do efeito citopático (ECP), as células foram congeladas e descongeladas duas vezes e centrifugadas a 500 g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e aliquoteado (estoque). Esse procedimento foi realizado até que se alcançasse o título viral desejado. Os estoques virais foram titulados pelo método de TCID₅₀ como descrito por Reed & Muench (1938).

2.4. Análise *in vitro*

2.4.1. Análise do efeito citotóxico da quercetina

Monocamadas das células CRIB com tapetes celulares semiconfluentes em microplacas de 96 poços foram tratadas com

concentrações que variaram de 1 a 100 µg/mL de quercetina e incubadas em estufa (Shell Lab, IR2424) a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. As microplacas foram monitoradas sob microscopia óptica diariamente durante 4 dias. A citotoxicidade foi determinada pelo efeito na morfologia e viabilidade celular (perda da monocamada, granulação e vacuolização no citoplasma) em relação ao aspecto das células não tratadas (controle). A citotoxicidade também foi determinada pelo método colorimétrico baseado na redução do 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,-difeniltetrazolium brometo (MTT) (SIGMA-ALDRICH) por enzimas mitocondriais (MOSMANN, 1983). No 4º dia após incubação com a quercetina, as células foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS) pH 7,2 por duas vezes e adicionado o MTT 0,5 mg/mL. As células foram incubadas por 4 horas em estufa. Posteriormente, o sal formado foi solubilizado pela adição de isopropanol (SIGMA-ALDRICH)-HCl 0,04 N. A densidade óptica (OD₅₅₀) foi determinada por espectrofotometria. A porcentagem de células tratadas viáveis foi calculada em relação ao controle não tratado (% de células = $OD_{exp} / OD_{célula\ controle} \times 100$). Foi determinada a CT₅₀ que é a concentração necessária para reduzir a densidade óptica em 50% . A partir deste experimento foi determinada a concentração máxima não tóxica para as células. Para esta determinação foi feita a análise estatística utilizando-se o teste t de Student no programa EXCEL versão 2003 (MICROSOFT).

2.4.2. Ensaio de Inativação Direta (*Assay Inactivating Direct* – AID)

Os vírus foram incubados com a quercetina em diferentes concentrações que não excederam a máxima não tóxica. Nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 minutos após incubação, uma alíquota dessa suspensão foi titulada. A atividade antiviral foi determinada pela redução no título viral em relação ao controle visualizada pela redução do ECP nas células infectadas. Como controle de vírus, utilizou-se uma alíquota do BoHV-5 submetido aos tempos de incubação, titulados a cada passo, e como controle da substância incubou-se a quercetina na concentração final utilizada. Foi considerada inibição significativa àquela superior a 1 log (90% de inibição).

2.4.3. Ensaio *End Point*

Neste ensaio, monocamadas semiconfluentes das células em microplacas de 96 poços foram incubadas por 1 h, com a quercetina em diferentes concentrações, inferiores à concentração máxima não tóxica. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS duas vezes e o vírus foi inoculado. A atividade antiviral foi avaliada pela redução no ECP dos vírus inoculados em monocamadas celulares tratadas em relação aos vírus inoculados em monocamadas celulares não tratadas (controle). Monocamadas celulares livres de vírus foram incubadas com a quercetina nas concentrações testes e utilizadas como controle da substância. Foi considerada inibição significativa àquela superior a 1 log (90% de inibição).

2.4.5. Tratamento *Timing of Addition*

O efeito antiviral da quercetina foi avaliado seguindo a adição dessa substância em diferentes tempos relativos à infecção viral. Monocamadas confluentes de células foram incubadas com MEM ou MEM contendo a quercetina por 1 h (pré-tratamento das células), lavadas duas vezes com PBS e posteriormente inoculadas com o vírus. Foram inoculadas as suspensões virais com e sem quercetina (efeito na adsorção) e esta foi mantida por 1 h a 4°C para prevenir a internalização do vírus. Após a adsorção, as células foram lavadas duas vezes com PBS e foi adicionado meio comum e meio contendo a quercetina e incubadas por 1 h a 37°C para permitir a penetração do vírus (efeito na penetração). As células foram novamente lavadas com PBS por duas vezes e foram adicionados meio contendo ou não a quercetina e as células foram cultivadas por 72 h a 37°C (efeito após a infecção viral). A atividade antiviral foi avaliada pela redução no efeito citopático. Foi considerada inibição significativa àquela superior a 1 log (90% de inibição).

2.5. Análise *in vivo*

2.5.1. Desenho experimental

Quarenta coelhos da raça *New Zealand* de 40 dias de idade, fêmeas, soronegativos para o BoHV-5 foram inoculados via cavidades tréfinas

(BROWN & FIELD, 1990). Para inoculação, os animais foram anestesiados com 0,1 mL/kg de uma combinação de zolazepam e tiletamina (Telazol). Os animais que receberam a suspensão viral foram inoculados com $4,28 \times 10^6$ TCID₅₀/mL da cepa SV 507 do Herpesvírus Bovino 5. Os coelhos foram distribuídos em 5 grupos com 8 animais cada. Os animais do grupo 1 foram inoculados com MEM estéril e serviram como grupo controle negativo (CN). Os animais do grupo 2 foram inoculados com o BoHV-5 e não receberam nenhum tipo de tratamento constituindo o grupo controle positivo (CP). Os animais do grupo 3 foram inoculados com a suspensão viral e foram tratados com a quercetina via oral em uma dose de 20 mg/kg duas vezes ao dia (VQ). Os animais do grupo 4 foram inoculados e tratados com o medicamento comercial aciclovir em uma dose de 200 mg duas vezes ao dia (VA) e o quinto grupo foi inoculado e tratado com a associação de quercetina 20 mg/kg e aciclovir 200 mg duas vezes ao dia (VAQ). Durante o experimento foram avaliados os sinais clínicos e estes, classificados de acordo a gravidade dos mesmos. A partir do segundo dia pós-inoculação (d.p.i.), foram coletados por 10 dias *swabs* nasais para o isolamento viral. Nos tempos 0, 3, 7, 14, 21, 28, 35 e 40 dias pós-inoculação o sangue foi coletado para os ensaios de soroneutralização. No 30º d.p.i., os animais foram tratados com dexametasona 2 mg/kg/dia por 3 dias para avaliação da reativação da replicação viral. A partir deste dia foram coletados *swabs* nasais para isolamento viral e foram avaliados os sinais clínicos por um período de 5 dias. No 40º d.p.i., os animais foram eutanasiados e o cérebro e o baço foram coletados. Análises histopatológicas foram realizadas nos órgãos coletados. O ácido nucléico viral foi detectado pela PCR no cérebro dos animais. Parte do baço foi utilizada nos ensaios de linfoproliferação.

2.5.2. Isolamento viral

Swabs nasais foram coletados em MEM 5X (acrescidos de dose 5 vezes maior de antibiótico) e, posteriormente, clarificados por centrifugação a 500 g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e inoculado em cultivo celular em placas de 24 poços. As células inoculadas foram monitoradas diariamente em busca de efeito citopático. Após 96 horas, as células foram congeladas e descongeladas duas vezes e re-inoculadas em monocamadas

semiconfluentes. Esse processo foi repetido duas vezes. Após terceira passagem, o sobrenadante dos poços positivos foram coletados e titulados.

2.5.3. Teste de soroneutralização (SN)

Os testes foram realizados em placas de poliestireno de 96 poços, utilizando-se uma diluição constante do soro 1:2 frente a 100 TCID₅₀ da cepa de BoHV-5. A mistura soro-vírus foi incubada por 1 h a 37°C. Posteriormente, uma suspensão de células CRIB foi adicionada, seguida de incubação em estufa de a 5% de CO₂ e a 37°C. A leitura foi realizada após 96 h de incubação, por meio do monitoramento do efeito citopático (ECP). Nos testes qualitativos, a ausência de ECP indica neutralização viral na diluição utilizada. Nos testes quantitativos, foram considerados títulos de anticorpos neutralizantes as recíprocas das maiores diluições do soro capazes de impedir a replicação viral e a conseqüente produção de ECP.

2.5.4. Ensaio de linfoproliferação

Para avaliação da resposta imune celular produzida pelos animais foi realizado o ensaio de linfoproliferação utilizando o MTT, que é um indicador de densidade e viabilidade celular. Para isso, o baço dos animais avaliados foi coletado e macerado, com o meio RPMI 1640 incompleto (Roswell Park Memorial Institute, SIGMA-ALDRICH), em telas obtendo uma suspensão de células esplênicas totais. As células foram centrifugadas a 250 xg a 4°C por 10 minutos e ressuspensas em 5 mL de tampão de lise [Tris-HCl 0,17M:NH₂Cl 0,16M (1:9)] por 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas com 5 mL de meio RPMI e centrifugadas a 250 g a 4°C por 5 minutos sendo este passo repetido 2 vezes. As células foram ressuspensas em meio RPMI completo (suplementado com 10% de soro fetal bovino). A viabilidade celular foi avaliada em câmara de Neubauer utilizando-se o teste de exclusão com azul de Trypan (SIGMA-ALDRICH). Foram distribuídas 2x10⁵ células por poço em placas de cultura de 96 poços. As culturas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ na presença de Concanavalina A (Con-A) (12 µg/mL) (SIGMA-ALDRICH), meio RPMI completo e com o vírus inativado por 1 hora em luz ultravioleta. Após as 72 horas de incubação, foram

acrescentados 60 µg de MTT por poço e as culturas foram novamente incubadas por 4 horas. Após este tempo, o MTT foi retirado e as células foram tratadas com 100 µL de isopropanol (SIGMA-ALDRICH)-HCl 0,04 N para solubilização dos cristais formados. A densidade óptica (OD₅₄₀) foi determinada por espectrometria. Análise de variância (ANOVA) e o teste de Dunnet foram utilizados para determinar a diferença estatística entre os grupos estimulados com o vírus, estimulados com Con-A e sem estímulo (meio RPMI). As análises estatísticas foram realizadas usando o software SAS/STAT versão 9.1 (Institute Inc., Cary, NC, USA) do Sistema SAS para Windows, licenciado para a UFV, 2007.

2.5.5. Teste da Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

O cérebro dos animais foi monitorado quanto à presença ou ausência do ácido nucléico viral. Primeiramente, foi extraído DNA total do cérebro pelo método fenol-clorofórmio. As amostras foram testadas pela PCR utilizando pares de oligonucleotídeos externos e internos que amplificam parte da seqüência do gene que codifica a glicoproteína B viral, descritos por Belák *et al.* (1999). São eles: gB1 5' CTC TAC CGC ACG GGC ACC TC 3'; gB2 5' TCT CGT CTC GCA GCA TTT CGT C 3'; gB3 5' TGC ATC GTG GAA GAA GTG GAG G 3'; gB4 5' CAC CCA GTC CCA GGC TAC CG 3'. A reação foi realizada para um volume final de 25 µL contendo 2 µL de DNA, 0,1 mM de cada deoxinucleotídeo, 15 pmol de cada primer, 1,5 mM MgCl₂, Tampão 1X (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9,0) e 1U de Taq DNA polimerase (PROMEGA). As condições de reação consistiram de 35 ciclos de 94°C, 57°C e 72°C por 1 minuto cada passo. Para a primeira reação foram utilizados os oligonucleotídeos GB1 e GB2 (externos) e para a segunda reação foram utilizados os oligonucleotídeos GB3 e GB4 (internos). Os produtos da PCR e Nested-PCR foram separados em gel de agarose (1%,) corados com brometo de etídio e visualizados através de luz ultravioleta, em transluminador.

2.5.6. Análise histopatológica

Os órgãos coletados para análise histopatológica foram fixados em formol 10% e processados segundo a técnica de inclusão em parafina. Os órgãos incluídos em parafina foram cortados e corados com hematoxilina e eosina (HE). As análises histopatológicas foram realizadas no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Veterinária/UFV.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Ensaio *in vitro*

Para a determinação da concentração máxima não tóxica de quercetina a ser utilizada nos ensaios antivirais foi utilizado o método colorimétrico de redução do sal de tetrazolium (MTT). De acordo com este ensaio, verificou-se uma concentração máxima de trabalho de 25 µg/mL de quercetina que foi correspondente à concentração necessária pra reduzir a densidade óptica em 50% (CT₅₀) calculada através da fórmula (% de células = OD_{exp}/ OD_{célula controle} x 100).

Os resultados da atividade antiviral foram expressos pela observação do efeito citopático e redução do título viral. No ensaio de Inativação Direta (AID) observou-se uma redução no título viral de 99,0 % (Figura 1), após os primeiros 15 minutos de incubação do vírus com a quercetina. Neste ensaio, a concentração de quercetina incubada com o vírus foi de 600 µg/mL, superior à máxima não tóxica, devido às diluições que são realizadas antes da inoculação viral.

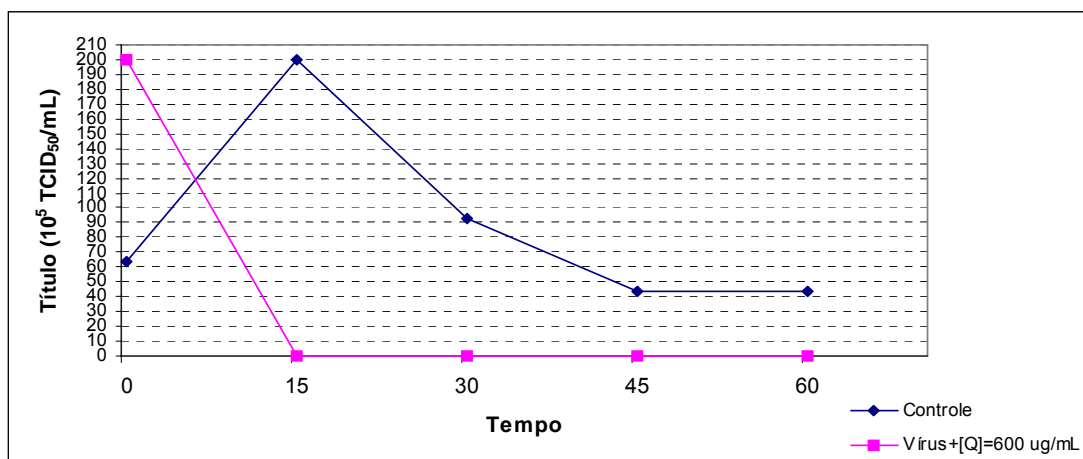


Figura 1: Ensaio de Inativação Direta. Controle: Vírus incubado sem a substância. Vírus+Q: Vírus incubado com a quercetina em uma concentração de 600 ug/mL. De 15 em 15 minutos uma alíquota do vírus foi titulada.

Após 15 minutos de incubação da quercetina com o vírus houve uma redução de 488 vezes no título viral, o que representa uma inibição de 99,0% (> 2 log). Com 30 minutos de incubação a redução foi superior a 4000 vezes, inibição de 99,9 % (> 3 log).

No ensaio *End Point*, incubou-se a quercetina com a célula por 1 h antes da inoculação viral. Este ensaio tem como objetivo avaliar se a substância a ser testada produz alguma modificação celular que interfira na infectividade viral. Foram testadas as concentrações de 5, 10 e 15 µg/mL. Observou-se que somente na concentração de 5 µg/mL (Figura 2) houve redução do título viral. No entanto, essa redução foi apenas de 5,6 vezes, o que não chega a ser significativa (> 1 log).

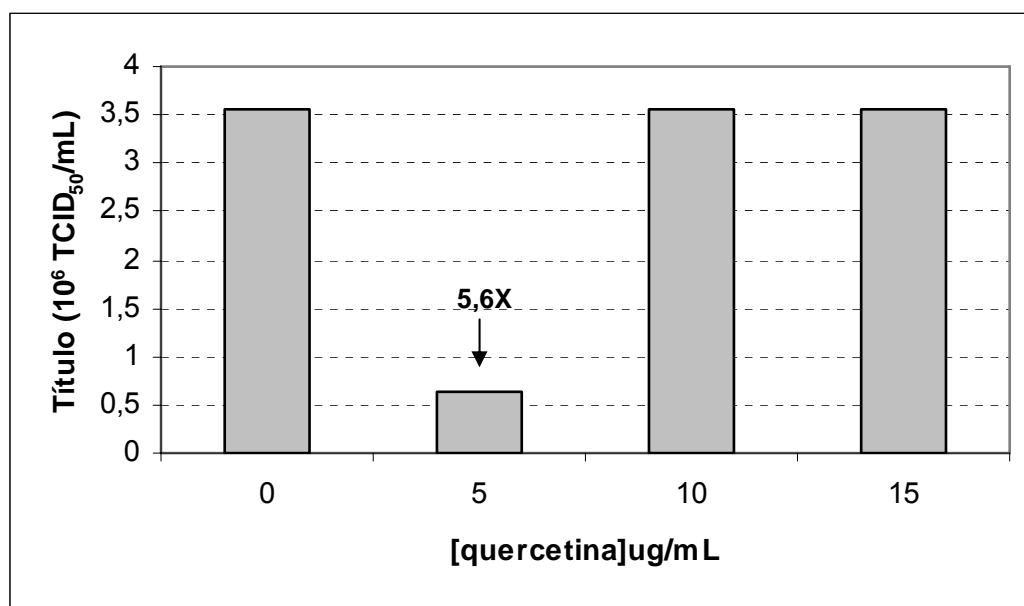


Figura 2: Ensaio *End Point*. 0: Controle, no qual as células não foram pré-tratadas com a quercetina. 5, 10 e 15 µg/mL representam as concentrações de quercetina utilizadas no pré-tratamento das células.

O pré-tratamento das células com a quercetina não resultou em efeito significativo na replicação do BoHV-5. No entanto, no ensaio de Inativação Direta essa redução foi significativa logo após os primeiros 15 minutos de incubação. Resultados semelhantes foram encontrados por Summerfield *et al.* (1997) quando avaliaram a atividade antiviral de extratos de *Acanthospermum hispidum* contra o Vírus da Pseudorraiva (SuHV-1) e o Herpesvírus Bovino 1 (BoHV-1), ambos *Alfaherpesvírus*. Os autores sugeriram que este tipo de inibição pode ser devido à ligação da substância testada, a estruturas do envelope viral inibindo a entrada viral, e não a moléculas da superfície da célula.

Na avaliação do efeito da quercetina nos diferentes passos de infecção viral foi realizado o ensaio *Timing of addition*. Neste ensaio a

quercetina foi incubada com o vírus em diferentes tempos de infecção viral, isto é, antes da inoculação, no momento da adsorção viral, da penetração e após a entrada do vírus. De acordo com Formica & Regelson (1995), a quercetina tem atividade antiviral relacionada à capacidade desse composto de ligar-se a glicoproteínas do envelope ou ao capsídeo viral interferindo na ligação e penetração do vírus na célula. Corroborando com esse achado foi observada uma redução do título viral quando a quercetina foi incubada nos passos iniciais da infecção, adsorção e penetração (Figura 3). Isto indica que a quercetina pode estar bloqueando a entrada do vírus, possivelmente induzindo modificações nas glicoproteínas do envelope ou do nucleocapsídeo viral que impeçam a correta adsorção e posterior entrada do vírus.

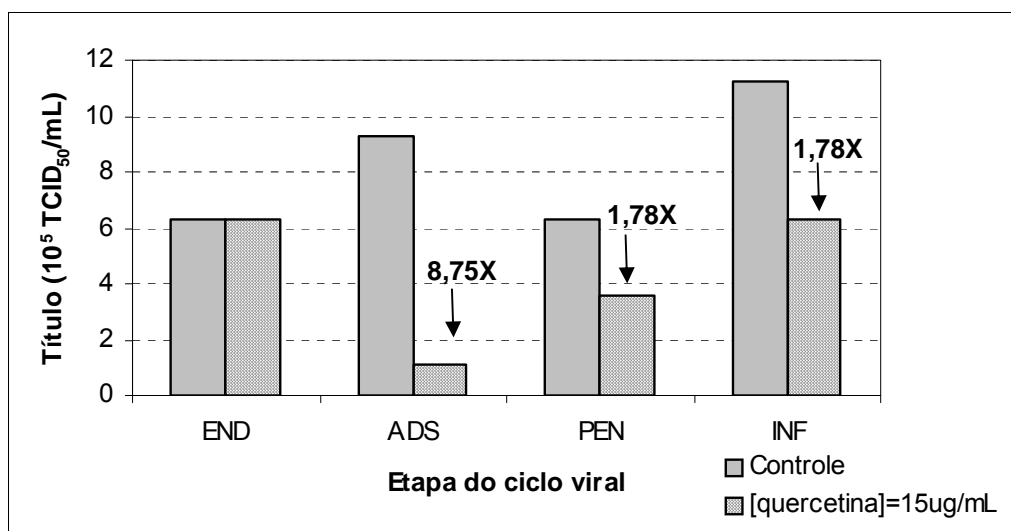


Figura 3: Ensaio *Timing of addition*. **END:** Pré-tratamento das células com a quercetina. **ADS:** Tratamento com quercetina no momento da inoculação viral e incubação a 4°C por 1 h. **PEN:** Tratamento com a quercetina após adsorção e incubação a 37°C por 1 h. **INF:** Tratamento com a quercetina após entrada viral. Controle: Vírus inoculado submetido aos mesmos passos de incubação, mas sem a quercetina. Todos os tratamentos foram feitos com a [quercetina]= 15 ug/mL.

O tratamento da quercetina nos diferentes passos da infecção viral produziu uma redução no título viral, principalmente em relação à entrada do vírus na célula. Quando a quercetina foi incubada no momento da adsorção, a redução foi de 8,75 vezes. A incubação da quercetina no momento da penetração e após a entrada viral culminou com uma redução de 1,78 vezes. Apesar de ter sido observada uma inibição nos passos iniciais da infecção viral, esta não foi significativa (>1 log). No entanto, esta inibição pode ser

um indicativo da atuação da quercetina na entrada viral, provavelmente por meio da sua ligação à partícula viral, já que no pré-tratamento não foi possível observar inibição.

3.2. Ensaio *in vivo*

Para a reprodução experimental da doença causada pelo BoHV-5 foram utilizados coelhos com 40 dias de idade e 3 tipos de tratamentos foram analisados. Um dos grupos consistiu de animais tratados somente com a quercetina (VQ). Um outro grupo consistiu de animais tratados com o medicamento aciclovir (VA). O aciclovir tem atividade antiviral contra herpesvírus, tais como Herpesvírus Humano 1 e 2 (HHV-1 e 2) e o Vírus da Varicela Zoster (VZV) (ELION *et al.*, 1977, BIRON & ELION, 1980). Como o BoHV-5 pertence à mesma subfamília viral na qual se encontram esses vírus, o aciclovir foi utilizado neste trabalho como tratamento controle. Também foi avaliada a associação entre o aciclovir e a quercetina (VAQ). Avaliou-se a manifestação da doença por meio dos sinais clínicos e da excreção viral por recuperação do vírus de *swabs* nasais em cultivo celular. Verificou-se que os animais não tratados e inoculados com o vírus apresentaram maior intensidade dos sinais clínicos e excretaram o vírus por um tempo médio maior e com maior título (Tabela 1 e Figura 4). Estes dados demonstram que os tratamentos utilizados foram eficientes no controle da infecção ou que pelo menos retardaram a replicação viral.

Tabela 1: Apresentações clínicas observadas nos animais inoculados com o BoHV-5 tratados e não tratados.

Grupos	Isolamento viral		PCR ^c	Sinais clínicos (scores) ^d				Mortalidade (%)
	Dias de excreção ^a	Título máximo ^b (TCID ₅₀ /mL)		0	1	2	3	
VQ	5,5 (4-7)	1,12 x 10 ⁶	0/7	2/7	5/7	2/7	3/7	2/7 (28,6)
VA	4,5 (3-6)	6,32 x 10 ⁵	0/8	5/8	2/8	0/8	0/8	0/8 (0)
VAQ	5,0 (4-6)	6,32 x 10 ⁶	1/6	1/6	3/6	3/6	4/6	2/6 (33,3)
CP	6,0	1,12 x 10 ⁷	1/7	2/8	5/8	5/8	5/8	5/8 (62,8)

^a Número médio de dias de excreção viral (dia mínimo - dia máximo).

^b Título do maior dia de excreção viral.

^c Número de animais positivos pela Nested-PCR na primeira e segunda reação.

^d Intensidade dos sinais clínicos (score 0: ausência de sinais clínicos, 1: secreção nasal e ocular, depressão, falta de apetite, 2: salivação, opistótomos, perda do equilíbrio, bruxismo, 3: sinais de comprometimento neurológico grave, coma, morte).

VQ: Animais inoculados com o BoHV-5 e tratados com quercetina. **VA:** Animais inoculados e tratados com aciclovir. **VAQ:** Animais inoculados e tratados com a associação quercetina e aciclovir. **CP:** Animais inoculados e não tratados.

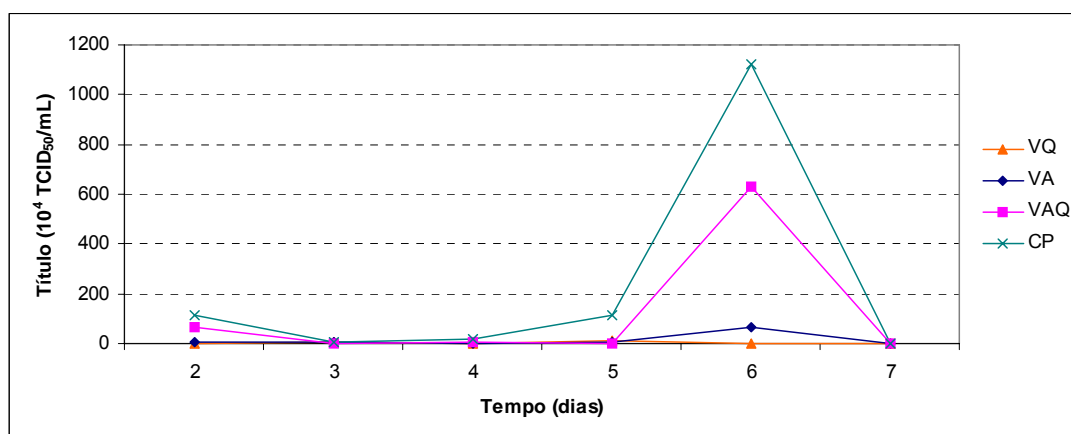


Figura 4: Titulação dos vírus excretados pelos animais e isolados em cultivo celular. **VQ:** Animais inoculados com o BoHV-5 e tratados com quercetina. **VA:** Animais inoculados e tratados com aciclovir. **VAQ:** Animais inoculados e tratados com a associação quercetina e aciclovir. **CP:** Animais inoculados e não tratados.

Foi observado que os animais tratados com a quercetina, quando comparados aos animais dos outros tratamentos, excretaram vírus por um período de tempo maior, no entanto, a quantidade de vírus excretada foi menor. Em relação à mortalidade dos animais, foi observada uma menor taxa nos animais tratados (0 - 33,3%) em relação aos não tratados (62,8%). Nenhum animal do grupo tratado com o medicamento comercial aciclovir

veio a óbito. Isto confirma a eficácia do mesmo contra infecções causadas por *Alfaherpesvírus* como o BoHV-5 (Tabela 1).

A baixa excreção viral dos animais tratados com a quercetina pode indicar a capacidade antiviral desta substância contra o Herpesvírus Bovino 5 *in vivo*. Isto também pode ser observado pela menor taxa de mortalidade apresentada pelos animais deste grupo em relação a dos animais não tratados. No entanto, em relação aos tratados com o aciclovir, a taxa de mortalidade dos animais tratados com a quercetina demonstrou ser superior. Esta capacidade antiviral inferior da quercetina pode estar tanto relacionada com uma menor capacidade deste composto em controlar a infecção causada pelo BoHV-5 mas também pode sugerir a otimização do tratamento com esta substância como por exemplo, diferentes doses e vias de administração.

Na tentativa de se amplificar o ácido nucléico viral presente no SNC dos animais, foi realizada extração de DNA de parte do cérebro e foi feita a Nested-PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para a região que codifica a glicoproteína B do envelope viral. Em apenas 2 animais (1 animal não tratado e 1 animal tratado com aciclovir e quercetina) foi possível a amplificação de parte do genoma viral (Tabela 1 e Figura 5).

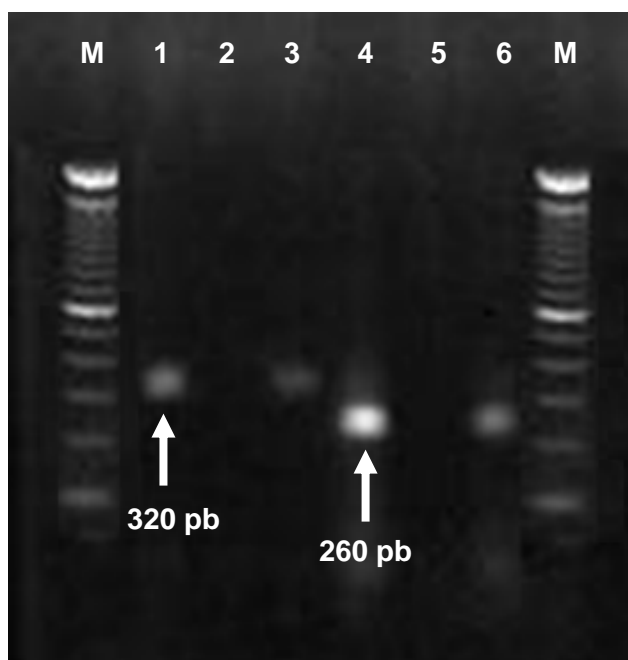


Figura 5: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os produtos da Nested-PCR. **M:** Marcador DNA Ladder 100 pb (GIBCOBRL). **Canaletas 1 a 3:** Produtos da 1ª reação. (1) Controle positivo (2) Controle negativo (3) Amostra positiva. **Canaletas de 4 a 6:** Produtos da 2ª reação. (4) Controle positivo (5) Controle negativo (6) Amostra positiva.

Foi possível amplificar parte do genoma viral em apenas 2 animais. A baixa recuperação do ácido nucléico viral pode ser um indicativo de que há pequenas quantidades de vírus latente nos animais em que não houve amplificação.

A associação entre a quercetina e o aciclovir demonstrou não ser tão eficiente em relação aos tratamentos com estas substâncias realizados separadamente. A quercetina parece atuar nos estágios iniciais da infecção e a atuação do aciclovir está no bloqueio da síntese de DNA. Apesar dos diferentes sítios de ação dessas substâncias, sugere-se uma ação antagônica entre elas, ou possivelmente de interferência da quercetina na ação do aciclovir. Para Bito *et al.* (2002), a maioria das atividades biológicas dos flavonóides é atribuída às suas propriedades moduladoras redox e inibidoras de proteínas cinases. Como o aciclovir, para efetuar a sua ação antiviral, necessita ser fosforilado pela enzima timidina cinase viral, nós sugerimos que o antagonismo demonstrado em nossos experimentos seja devido à inibição desta enzima pela quercetina, bloqueando consequentemente, a ação antiviral do aciclovir. De acordo com Havsteen (2002), a inibição das proteínas cinases pelos flavonóides pode ser feita pela acomodação destes compostos aos sítios de ligação ao ATP, que são normalmente conservados na maioria das cinases.

Para avaliar a resposta imune humoral contra a infecção viral foram dosados os níveis de anticorpos neutralizantes pelo ensaio de soroneutralização. Para avaliar a resposta imune celular foi realizado o ensaio de linfoproliferação, além da observação de proliferação linfocítica pela visualização da polpa branca nos exames histopatológicos do baço. Observou-se que animais tratados com o medicamento aciclovir apresentaram baixos títulos de anticorpos, o que pode ser um indício de que esta droga atue precocemente no controle da infecção viral (Figura 6). Diferentemente, animais tratados unicamente com a quercetina demonstraram um maior título de anticorpo. Esse maior título de anticorpos pode estar relacionado com o fato de que os animais tratados com quercetina excretaram o vírus por um período maior de tempo, mesmo que em títulos menores. Isto pode indicar uma atuação mais lenta da quercetina

sobre o vírus, o que proporciona a formação dos anticorpos pelo sistema imune do animal.

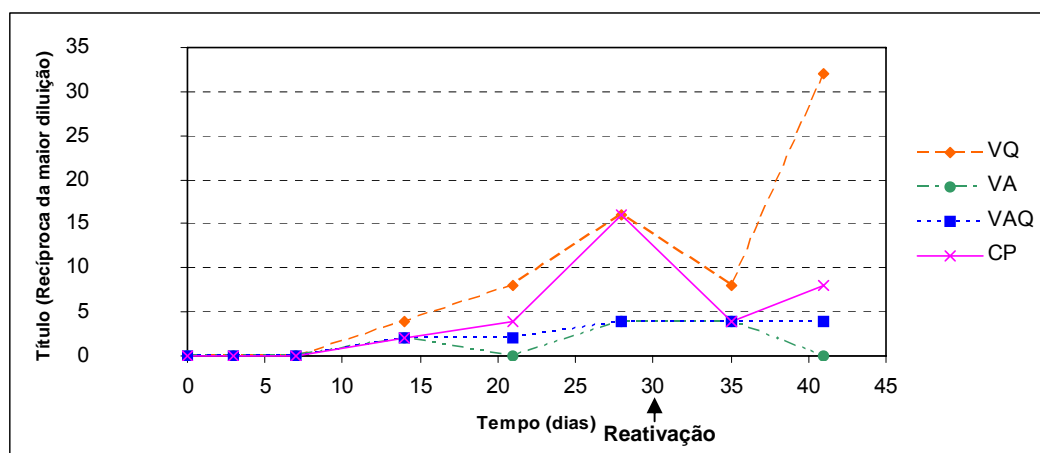


Figura 6: Título de anticorpos obtidos por meio da técnica de soroneutralização. No 30º d.p.i., os animais foram tratados com dexametasona para reativação da replicação viral. **VQ:** Animais inoculados com o BoHV-5 e tratados com quercetina. **VA:** Animais inoculados e tratados com aciclovir. **VAQ:** Animais inoculados e tratados com a associação quercetina e aciclovir. **CP:** Animais inoculados e não tratados.

A maior produção de anticorpos dos animais tratados com a quercetina também pode ser devida à capacidade dos flavonóides em estimular a resposta Th1. Em estudo realizado por Cherng et al. (2007), foi observado que a genisteína, ácido fítico e ácido siríngico foram capazes de aumentar a resposta imune predominantemente Th-1 por estimularem a produção de $\text{INF-}\gamma$ e suprimirem a secreção da citocina imunossupressora IL-10. Além disso, os flavonóides são conhecidos por estimular a resposta imune tanto celular quanto humoral. Embora o preciso mecanismo ainda seja desconhecido, é possível que os flavonóides estimulem a produção de citocinas, particularmente as interleucinas 1 e 2 (IL-1 e IL-2), as quais possuem ação mitogênica para linfócitos T e B (HAVSTEEN, 2002). Outros compostos fenólicos, tais como os derivados do ácido cinâmico, também induzem a produção e liberação de citocinas como IL-1, IL-6 e IL-8 pela ativação de macrófagos, estimulando a produção de anticorpos (ORSOLIC *et al.*, 2005).

É interessante notar que a partir do 35º d.p.i. houve um aumento acentuado dos níveis de anticorpos nos animais não tratados e nos animais tratados com quercetina. Isto coincide com o período após a reativação viral com dexametasona. Nos animais tratados com aciclovir, a ausência desta resposta pode ser devido a uma menor quantidade de partículas virais latentes, o que corrobora com a hipótese de que o aciclovir atua precocemente na infecção viral. Um outro fator a ser considerado é que os animais tratados com a quercetina podem ter formado mais eficientemente uma resposta de memória capaz de responder ao pequeno estímulo após a reativação viral, já que não foi possível a recuperação viral por isolamento em cultivo celular após o período de reativação. Pode ser observado que os animais tratados com a associação testada excretaram maior quantidade de vírus, no entanto, a produção de anticorpos não foi tão acentuada quanto à dos animais tratados somente com a quercetina.

A quantificação da resposta imune celular foi obtida por meio do ensaio de linfoproliferação (Figura 7). No entanto, neste ensaio não foi observada diferença estatisticamente significativa quando comparada à estimulação feita com o vírus nos diferentes grupos.

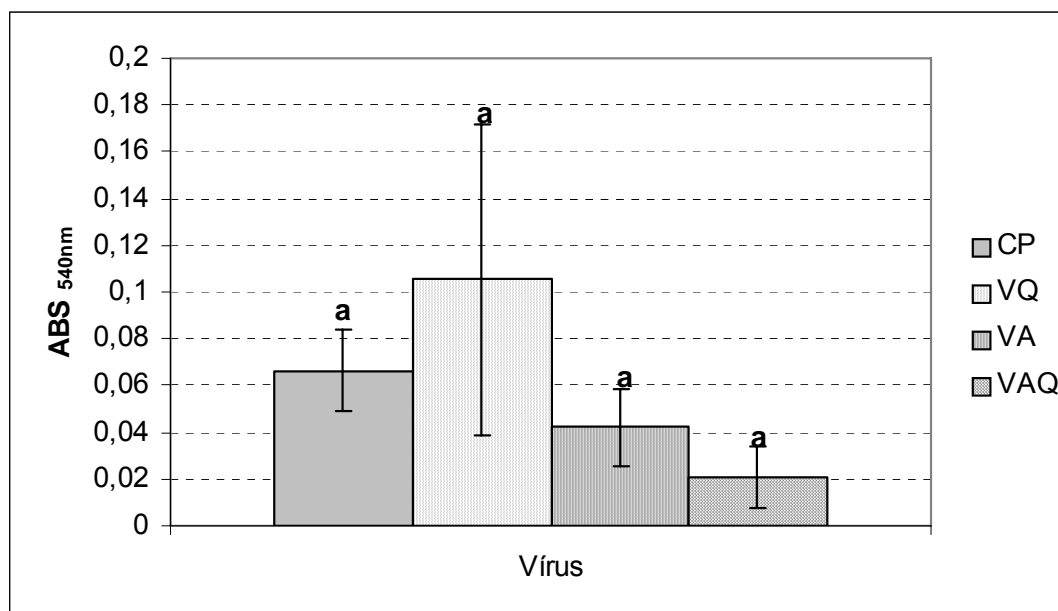


Figura 7: Ensaio de Linfoproliferação. Comparação entre grupos da estimulação com o vírus inativado. **VQ:** Animais inoculados com o BoHV-5 e tratados com quercetina. **VA:** Animais inoculados e tratados com aciclovir. **VAQ:** Animais inoculados e tratados com a associação quercetina e aciclovir. **CP:** Animais inoculados e não tratados. Barras seguidas pela mesma letra são estatisticamente iguais pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

A ausência de uma maior resposta linfoproliferativa nos animais tratados com quercetina pode ser explicada pelos relatos de Lin & Tang (2007). De acordo com estes autores, diferentes tipos de compostos fenólicos, incluindo os flavonóides, podem demonstrar efeitos imunomodulatórios diferenciados, tais como aumento ou diminuição da proliferação de esplenócitos. Entretanto, a magnitude da resposta imune celular (tal como a proliferação de esplenócitos) geralmente depende da dose estimulante administrada. Provavelmente, a dose de quercetina utilizada não foi suficiente para gerar um aumento significativo da resposta celular.

Nas análises histopatológicas foram observadas diferenças na formação de lesões no cérebro dos animais tratados em relação aos animais não tratados. No cérebro dos animais não tratados foi constatada a presença de lesões características da meningoencefalite produzida pelo BoHV-5. Dentre as lesões encontradas estão a formação de manguitos perivasculares (1), infiltrados linfoplasmocitários, picnose, gliose e hiperemia acentuada principalmente nas meninges (Figura 8). Corpúsculos de inclusão intranucleares também foram observados em neurônios, principalmente na região do hipocampo. As lesões observadas foram semelhantes às observadas por Caron *et al.* (2002). Esses autores realizaram um estudo infectando experimentalmente coelhos com o BoHV-5 e verificaram a presença de lesões inflamatórias cerebrais. As mudanças histopatológicas consistiam de manguitos perivasculares mononucleares, gliose focal (próxima às meninges) e congestão meningeal.

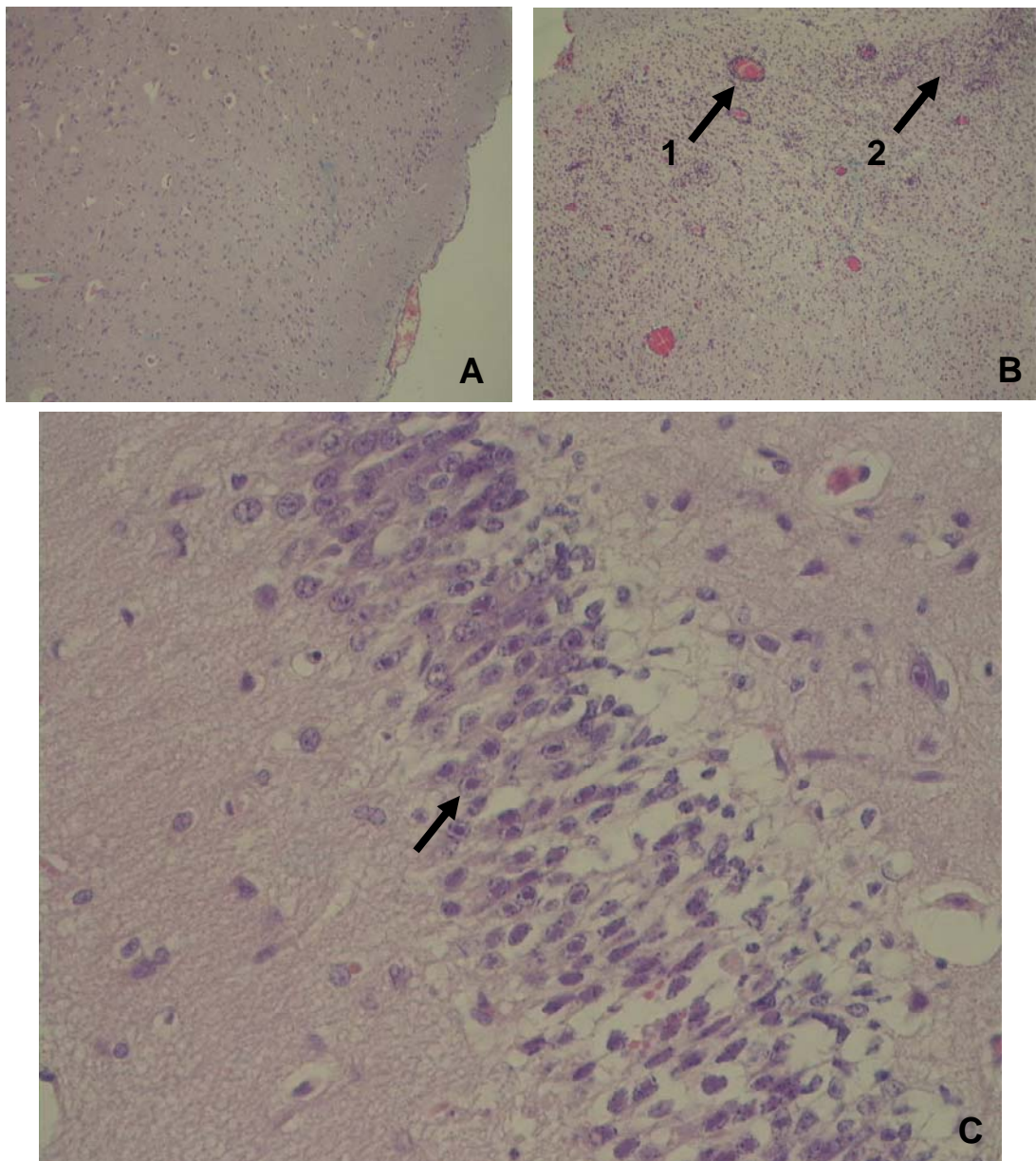


Figura 8: Análise histopatológica do cérebro dos animais (HE). Em **A:** animal não inoculado (100X). **B:** Animal inoculado não tratado. (1) manguito perivascular, (2) infiltrado inflamatório linfoplasmocitário (100X). **C:** Animal inoculado não tratado. A seta indica um corpúsculo de inclusão intranuclear (400X).

Nos animais não tratados, as lesões apresentaram-se com um maior grau de severidade, consistindo em uma distribuição difusa das lesões por todo o córtex cerebral. Nos animais tratados com o aciclovir, todos os animais apresentaram as lesões inflamatórias, no entanto, estas se apresentaram em focos e não tão difusas como as dos animais não tratados.

Apenas um animal tratado com o aciclovir apresentou lesões difusas comparáveis com as dos animais não tratados. Os animais tratados com a quercetina quer seja isoladamente ou associada ao aciclovir, demonstraram lesões cerebrais leves, existindo inclusive alguns animais que não apresentaram lesões inflamatórias (Figura 9).

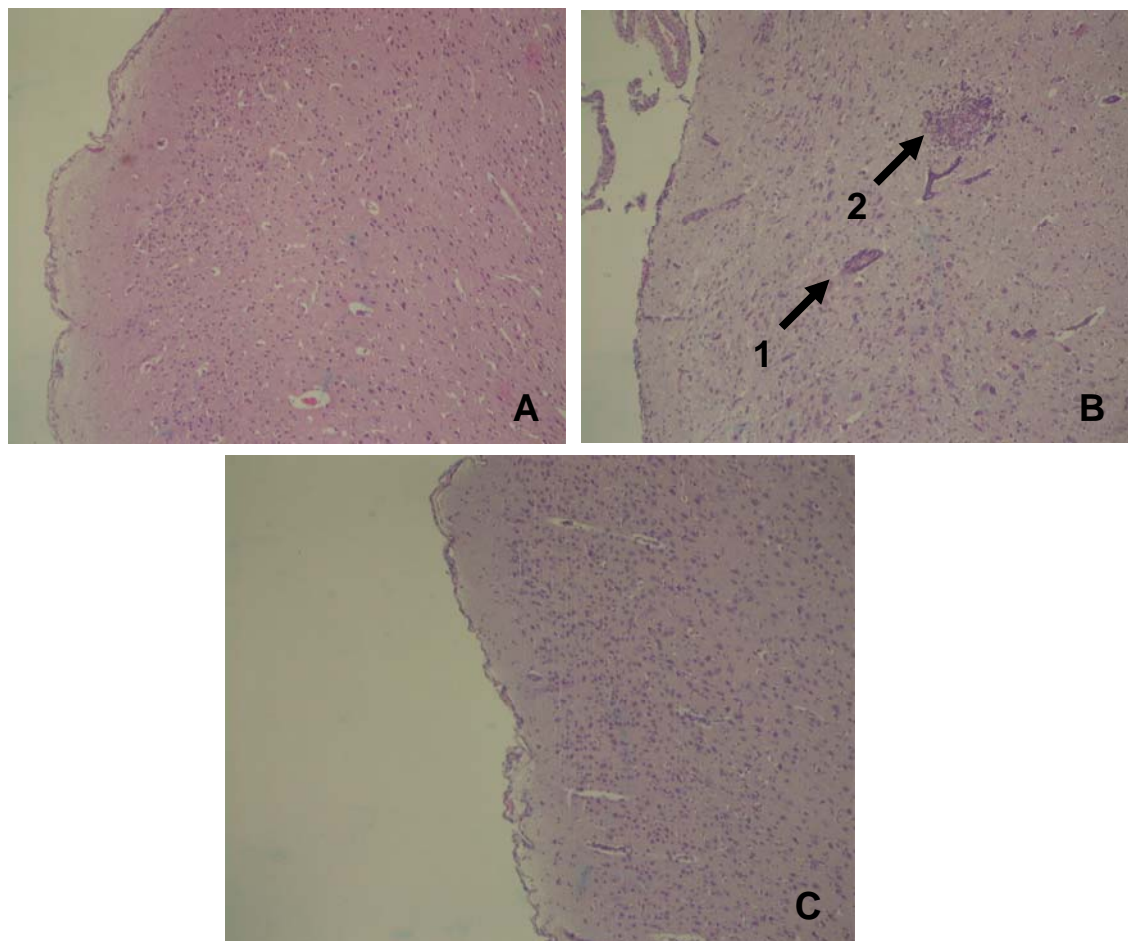


Figura 9: Análise histopatológica (HE). **A:** Animais inoculados e tratados com quercetina (100x). **B:** Animais inoculados e tratados com o aciclovir (100X) (1) manguito perivascular (2) infiltrado inflamatório. **C:** Animais inoculados e tratados com aciclovir e quercetina (100X).

A menor gravidade ou a ausência das lesões apresentadas pelos animais tratados com quercetina, além de poder estar relacionada à atuação antiviral direta deste flavonóide, pode também estar relacionada aos seus efeitos neuroprotetores. Em estudo realizado por Lu *et al.* (2006) a quercetina, devido a sua capacidade antioxidante, conseguiu reverter a neurotoxicidade, em cérebro de camundongos, induzida por D-galactose

resultante de dano oxidativo pela regulação dos níveis de ROS. De acordo com esses autores, a neuroprotetividade da quercetina pode ser devida: 1- recrutamento de radicais livres, 2- modulação da homeostase intrasinapsomal, 3- aumento da atividade de enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase (SOD) e proteção contra a peroxidação de lipídeos, 4- promoção da expressão do mRNA GAP43. Além disso, existem relatos da ação antiinflamatória da quercetina. Em estudo realizado por Sharma *et al.* (2007) utilizando cultivo de astrócitos humanos, foi observado que a quercetina pode diminuir o dano cerebral causado por respostas inflamatórias por reduzir a expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias.

Contudo, os animais tratados com quercetina, apesar de terem apresentado menor intensidade das lesões, tiveram uma maior taxa de mortalidade quando comparados com os animais tratados com o aciclovir. Sugere-se aqui, que a redução da resposta inflamatória no cérebro levou a uma menor eliminação viral, possibilitando que o vírus pudesse estabelecer infecção em outros órgãos e, conseqüentemente, causando uma maior taxa de mortalidade. Isto também foi observado por Maeda *et al.* (2004). Esses autores verificaram que camungondos inoculados com o Herpesvírus Eqüino 1 (EHV-1), quando foram submetidos a tratamento com anticorpos monoclonais contra ICAM-1 e LFA-1, ambos necessários para a resposta inflamatória, recuperaram mais lentamente da infecção apesar do menor grau de lesão inflamatória no epitélio pulmonar. Além disso, como mencionado anteriormente, estudos devem ser realizados para melhor avaliação do perfil dose-resposta antiviral da quercetina associados a estudos de bioavaliabilidade e biodisponibilidade sob diferentes formas de administração dessa substância.

4. CONCLUSÃO

A procura de novas drogas que atuem contra infecções virais tem se tornado cada vez maior. Substâncias naturais vêm servindo atualmente como alvo dessas novas pesquisas. Neste trabalho procurou-se verificar a ação do flavonóide quercetina contra o Herpesvírus Bovino 5 (BoHV-5). Como controle do estudo, utilizou-se o medicamento comercial aciclovir. Os estudos *in vitro* indicaram o potencial antiviral da quercetina pela redução do efeito citopático após os tratamentos. Nos ensaios *in vivo*, a ação da quercetina pareceu não superar a ação já comprovada do aciclovir, no entanto, foi considerável a atuação da mesma contra o vírus. Vale ressaltar que a quercetina pode estar atuando tanto diretamente no controle da infecção viral bem como pode estar estimulando mecanismos de controle da infecção do hospedeiro. O potencial imunomodulador da quercetina, além do potencial antiviral reforça a sua possível utilização no tratamento de infecções virais. Devido às semelhanças na replicação e a presença de lesões no sistema nervoso central (SNC) causada pelos *Alfaherpesvirus*, pode-se sugerir uma ação terapêutica da quercetina no controle de infecções herpéticas de membros dessa subfamília. Os resultados encontrados nesses ensaios, juntamente com os dados já descritos na literatura, permitem sugerir que a quercetina pode ser um candidato a um medicamento terapêutico e preventivo contra as infecções herpéticas, bem como para outras viroses e doenças do SNC. Além disso, a diminuição do efeito antiviral do aciclovir quando associado com a quercetina, sugere uma interação antagônica entre os dois fármacos, proscurendo assim, essa associação na terapia clínica.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELÁK, K., KUCSERA, L., ROS, C., KULCSÁR, G., MAKRANSZKI, L., SOÓS, T., BELÁK, S., 1999. Studies on the pathogenicity of bovine herpesvirus type 5 in sheep. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 22, 207-220.
- BERHOW, M.A., 1998. Flavonoid accumulation in tissue and cell culture. Flavonoids in the living system, *Plenum Press*, New York.
- BIRON, K.K., ELION, G.B., 1980. In vitro susceptibility of varicella-zoster virus to acyclovir. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 18, 443-447.
- BITO, T., ROY, S., SEN, C.K., SHIRAKAWA, T., GOTOH, A., UEDA, M., ICHIHASHI, M., M. M. PACKER, L., 2002. Flavonoids differentially regulate IFN γ -induced ICAM-1 expression in human keratinocytes: molecular mechanisms of action. *FEBS Letter*, 520, 145-152.
- BROWN, G.A., FIELD, H.J., 1990. A reliable method for establishing viral infection in the rabbit by intranasal inoculation. *Journal of Virological Methods*, 27, 341-346.
- CARON, L., WILKELMANN, E., FLORES, E.F., WEIBLEN, R., 2002. Latent infection by bovine herpesvirus type 5 in experimentally infected rabbits: virus reaction, shedding and recrudescence of neurological disease. *Veterinary Microbiology*, 84, 285-295.
- CHERNG, J., CHIANG, W., CHIANG, L., 2007. Immunomodulatory activities of edible beans and related constituents from soybean. *Food Chemistry*, 104, 613-618.

- ELION, G.B., FURMAN, P.A., FYFE, J.A., DE MIRANDA, P., BEAUCHAMP, L., SCHAEFFER, H.J., 1977. Selectivity of action of an antiherpetic agent 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. *Proceedings of the National Academy of Science*, 74, 5716-5720.
- FIELD, H.J., BISWAS, S., MOHAMMAD, I.T., 2006. Herpesvirus latency and therapy-From a veterinary perspective. *Antiviral Research*, 71, 127-133.
- FLORES, E., DONIS, R., 1995. Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to bovine viral diarrhea virus infection due to a block in viral entry. *Virology*, 208, 565–575.
- FORMICA, J.V., REGELSON, W., 1995. Review of biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chemical Toxicology*, 33, 1061-1080.
- GONG, Y., RAJ, K.M., LUSCOMBE, C.A., GADAWSKI, I., TAM, T., CHU, J., GIBSON, D., CARLSON, R., SACKS, S.L., 2004. The synergistic effects of betulin with acyclovir against herpes simplex viruses. *Antiviral Research*, 64,127-130.
- HAVSTEEN, B.H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96, 67-202.
- HUDSON, J.B., 1990. Antiviral compounds from plants. *CRC Press*, Florida, USA, 119-131.
- LIN, J., TANG, C., 2007. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*. 101, 140-147.
- LU, J., ZHENG, Y., LUO, L., WU, D., SUN, D., FENG, Y., 2006. Quercetin reverses D-galactose induced neurotoxicity in mouse brain. *Behavioural Brain Research*, 171, 251-260.

- MAEDA, K., KAI, K., HAYASHI, T., KASEGAWA, K., MATSUMURA, T., 2004. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) contribute to the elimination of equine herpesvirus type-1 (EHV-1) from the lungs of intranasally infected Balb/c mice. *Journal Comparative Pathology*, 130, 162-170.
- METZLER, A.E., SCHUDEL, A.A., ENGELS, M., 1986. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. *Archives of Virology*, 87, 205-217.
- MOSMANN, T., 1983. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65, 55-63.
- REED, J.H.; MUENCH, H., 1938. A simple method for estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene*, 27, 493-496.
- SELWAY, A., 1986. Plant flavonoids in biology and medicine. *Biochemical, Pharmacological and Structure - Activity Relationships*. 213, 521-536.
- SHARMA, V., MIRHRA, M., GHOSH, S., TEWARI, R., BASU, A., SETH, P., SEN, E., 2007. Modulation of interleukin-1 β mediated inflammatory responses in human astrocytes by flavonoids: Implications in neuroprotection. *Brain Research Bulletin*.
- SUMMERFIELD, A., KEIL, G.M., METTENLEITER, T.C., RZIHA, H., SAALMÜLLER, A., 1997. Antiviral activity of an extract from leaves of the tropical plant *Acanthospermum hispidum*. *Antiviral Research*, 36, 55-62.
- VISON J. A., 1998. Flavonoids in foods as *in vitro* and *in vivo* antioxidants. *Flavonoids in the living system*. Manthey and Buslig Plenum Press, New York.

CONCLUSÕES GERAIS

- A concentração máxima não tóxica de quercetina para as linhagens celulares utilizadas neste trabalho foram de 5,0 µg/mL para a CRFK, 30 µg/mL para a RK13 e 25 µg/mL para a CRIB.
- Nos ensaios de atividade antiviral contra o Parvovírus Canino, a quercetina demonstrou resultados significativos (acima de 2 log) quando houve o tratamento das células antes da inoculação e na incubação da quercetina no momento da adsorção viral.
- Os resultados de atividade antiviral *in vitro* contra o CPV indicaram, portanto, que a quercetina possivelmente se liga a receptores celulares impedindo a ligação do vírus à célula.
- A administração da quercetina em cães utilizando uma dose de 15 mg/kg, via intravenosa, demonstrou não afetar aparentemente o metabolismo hepático e renal desses animais.
- Nos ensaios de atividade antiviral *in vitro* contra o Herpesvírus eqüino 1, foi possível verificar uma ação direta da quercetina contra esses vírus, sendo que essa atuação parece acontecer nos passos iniciais da infecção viral.
- A resposta imune celular pode ser estimulada pela quercetina, sendo que esta estimulação parece ser dependente da dose utilizada. No ensaio de linfoproliferação foi observado que nos tratamentos com a quercetina nas doses de 30 e 90 mg/kg/dia houve um estímulo da resposta imune contra o EHV-1. No entanto, a maior dose utilizada (270 mg/kg/dia), apesar de ter estimulado a resposta imunológica, parece não atuar eficientemente contra este vírus.
- Nas análises hematológicas, verificou-se uma ação da quercetina nos parâmetros relacionados à série branca do sangue, tais como produção de leucócitos, dentre eles os linfócitos. Já a produção das células vermelhas sanguíneas, não sofreu alteração diante do tratamento com a quercetina.
- Os ensaios de atividade antiviral da quercetina *in vitro* contra o Herpesvírus Bovino 5 (BoHV-5) sugerem que a quercetina parece atuar nos passos iniciais da infecção por este vírus.

- Nos ensaios *in vivo*, utilizando-se o coelho como modelo experimental, tanto a quercetina como o aciclovir demonstraram ser eficientes no controle da infecção causada pelo BoHV-5. No entanto, a ação da quercetina pareceu não superar a ação já comprovada do aciclovir.
- Os animais tratados com quercetina, isoladamente ou em associação com o aciclovir, apresentaram lesões cerebrais mais leves quando comparados com os animais tratados com aciclovir, corroborando com a idéia da quercetina como agente neuroprotetor e antiinflamatório.
- Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que a quercetina seja um possível agente antiviral, não somente por atuar de forma direta no controle da infecção viral, mas também por meio da ativação de múltiplos processos que indiretamente promovem o controle da infecção viral pelo organismo.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- ✓ Estudos *in vitro* testando diferentes concentrações de quercetina serão necessários, uma vez que não houve uma correlação direta entre as concentrações testadas neste trabalho e a atividade antiviral exercida pela quercetina.
- ✓ Nos cães, que chegarem ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa, apresentando sinais clínicos da Parvovirose Canina e sabidamente infectados, sugerem-se que sejam realizados testes com a administração da quercetina para avaliação do potencial da mesma *in vivo*.
- ✓ A reprodução da doença clínica do EHV-1 em camundongos deve ser explorada para melhor avaliação da atividade da quercetina contra este vírus *in vivo*.
- ✓ Estudos da interferência da quercetina nos mecanismos de resposta inflamatória contra o BoHV-5 em coelhos inoculados experimentalmente, como por exemplo, avaliação da produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias.
- ✓ Maior atenção deve ser dada aos mecanismos de entrada dos vírus nas células, pois com os vírus, Parvovírus Canino, Herpesvírus Eqüino 1 e Herpesvírus Bovino 5, a quercetina demonstrou ter um papel importante nos passos iniciais da infecção viral.
- ✓ Diante do potencial antiviral exibido pela quercetina, ensaios utilizando outros flavonóides bem como outras substâncias naturais podem ser promissores.
- ✓ Desenvolvimento de formulações farmacêuticas estáveis de quercetina ou algum de seu derivado para teste em animais.

APÊNDICE

1. Cultivo Celular

Meio Essencial Mínimo Sigma®

MEM 1 frasco

Água MilliQ q.s.p. 1000mL

pH 7,2, conservar a 4°C até por 6 meses, conservando as características físicas do meio como a cor, vedar com parafilme alíquotar em garrafas de vidro estéril 90 mL.

Meio RPMI-1640 incompleto

Hepes 2,4 g

Piruvato de Sódio 0,11 g

D-glucose 4,5 g

Bicarbonato de Sódio 1,5 g

RPMI 1640 com

L-glutamina 10,43 g (frasco)

Água MilliQ q.s.p. 1000 mL

Meio RPMI completo

Meio RPMI incompleto 90mL

Soro fetal bovino 10mL

Gentamicina 1mL

Anfotericina 1mL

SFB, Gentamicina e Anfotericina alíquotar e conservar -20°C, quando completado o meio a 4°C.

2. Quercetina

Solução para experimentos *in vitro*

Quercetina 10 mg

DMSO 1 mL

Solução para experimento piloto em cães [quercetina] = 50 mg/mL em salina

Quercetina 1,5 g

DMSO 5 mL

Posteriormente, essa solução foi diluída em solução salina 0,85% gota a gota.

Quercetina (Solução DMSO) 5 mL

Solução salina 25 mL

BSA 0,15 g

Suspensão para experimento em camundongos (3 suspensões de 100 mL)

Quercetina 450 mg (30 mg/kg/dia)

1,35 g (90 mg/kg/dia)

4,05 g (270 mg/kg/dia)

A suspensão foi preparada por meio de levigação com sorbitol (q.s.), propilenoglicol (10%), natrosol (0,5%), Metocel (0,25%) e H₂O destilada q.s.p.

Cápsulas para experimento com coelhos

Quercetina 20 mg

Talco farmacêutico q.s.p.

(Cápsulas nº 04)

3. Demais soluções

Tampão Fosfato (PBS- pH 7,2):

NaCl.	7,2 g
KH ₂ PO ₄ .	0,43 g
Na ₂ HPO ₄	1,48 g
Água MilliQ q.s.p	1000 mL

Solução de Lise de Hemáceas:

NH ₄ Cl	8,29 g
KHCO ₃	1 g
EDTA	0,0372 g
Água MilliQ q.s.p.	1000 mL

MTT

3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,-difeniltetrazolium brometo (MTT)	5 mg
PBS	1 mL

Esta solução deve ser preparada no momento do uso.

Formol tamponado 10%:

Formol	100 mL
Fosfato de sódio bibásico	4,5 g
Fosfato de sódio monobásico	4,6 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Isopropanol-HCl 0,04N:

Isopropanol	99,847 μ L
HCl	163 μ L