

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA MOLECULAR

Avaliação de atividade antirretroviral de extratos de plantas frente  
ao Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) como modelo  
experimental para o HIV

Rafaela Wachholz Hepp

Porto Alegre, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA MOLECULAR

Avaliação de atividade antirretroviral de extratos de plantas frente  
ao Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) como modelo  
experimental para o HIV

Trabalho de conclusão de curso de  
graduação apresentado ao Instituto de  
Biotecnologia da Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul como requisito  
parcial para obtenção do título de  
Bacharel em Biotecnologia com ênfase  
em Biotecnologia Molecular

Rafaela Wachholz Hepp  
Orientadora: Prof. Ana Paula Ravazzolo

Porto Alegre, 2017

## **Agradecimentos**

Agradeço à UFRGS, pela formação proporcionada, e pelos professores que fizeram parte desta trajetória.

À minha família, meus pais (Clovis e Neusa), e minha irmã Juliana, pelo apoio, incentivo, amor e dedicação para que eu pudesse concluir esta etapa da vida.

Aos meus amigos, por todo apoio e companheirismo.

Aos meus colegas de graduação e colegas de laboratório por toda a ajuda e convívio.

À professora Gilsane von Poser, pelo fornecimento dos extratos de plantas utilizados neste projeto, e por toda a ajuda sempre que necessária.

Em especial, agradecer à minha orientadora, Prof. Ana Paula, pela oportunidade, pelo tempo dedicado a este trabalho, e por todos ensinamentos, os levarei por toda a minha vida profissional.

Gostaria de agradecer a todos que, direta ou indiretamente, ajudaram na minha formação durante estes anos.

## Resumo

O vírus da imunodeficiência felina (FIV), do gênero *Lentivirus*, vem sendo utilizado como modelo experimental para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), desde a sua descoberta, em 1986. A grande similaridade estrutural, genômica e patogênica dos vírus foi estudada por diversos autores, e torna o FIV um modelo promissor para avaliação de novos medicamentos antirretrovirais. Plantas de caráter medicinal ainda foram pouco exploradas quanto a sua capacidade em fornecer compostos que possuam atividade antiviral. Neste trabalho, foram avaliados três extratos provenientes de *Hypericum connatum* e *Pterocaulon balansae*, com o objetivo de buscar novas substâncias de caráter inibidor frente ao FIV. Para tal, foram realizados testes de citotoxicidade, em que se obteve a concentração máxima dos extratos para ser utilizada em testes posteriores. Na avaliação da atividade antirretroviral, o extrato de *Hypericum connatum* promoveu a maior redução do número de partículas virais quando quantificado pela técnica de PCR em tempo real, reduzindo em vinte e três vezes o número de cópias do vírus, em comparação ao controle. Os extratos PBLI2 e PBEH, ambos de *Pterocaulon balansae*, também foram capazes de reduzir parcialmente o número de partículas virais. A avaliação da relação efeito-dose do extrato de *Hypericum connatum*, analisadas em quatro concentrações diferentes, pôde confirmar a sua ação inibitória frente ao lentivírus felino. Os resultados evidenciam a atividade inibitória de *Hypericum connatum* frente ao FIV, que servirão como base para novos estudos.

## Abstract

The Feline Immunodeficiency Virus (FIV), from the *Lentivirus* genus, have been used as experimental model for the Human Immunodeficiency Virus (HIV), since its discovery, in 1986. The strong structural, genomic and pathogenic similarity between these viruses was demonstrated by many authors, making FIV a promising model for evaluation of new antiretroviral drugs. Compounds with antiviral activities obtained from medicinal plants are probably underestimated. In this study, three extracts from *Hypericum connatum* and *Pterocaulon balansae* were evaluated, with the purpose of searching new substances with inhibitor character against FIV. To this end, cytotoxicity tests were performed, in which it was obtained the maximum concentration of the extract to utilize ahead. In the evaluation of antiretroviral activity, the *Hypericum connatum* extract induces a reduction of viral particles when quantified by real time PCR technique, decreasing in twenty-three times the number of virus copies, when comparing to the control sample. The extracts PBLI2 and PBEH, both from *Pterocaulon balansae*, also decreased the number of viral particles in a lesser extent. The evaluation of dose-response relationship of *Hypericum connatum* extract, in which four concentrations were analyzed, was able to confirm the inhibitory action against the feline lentivirus. The results demonstrate an inhibitory activity of *Hypericum connatum* against FIV, to be explored through new experiments.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micro molar
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ART	Terapia Antirretroviral
AZT	Zidovudina
CA	Proteína do Capsídeo
CD4/CD8	<i>Cluster of Differentiation</i> : marcadores de superfície celular de linfócitos T
cDNA	DNA Complementar
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CPE	Efeito Citopático
CRFK	<i>Crandell Rees Feline Kidney</i> (células de linhagem de rim felino)
CT	<i>Cycle Threshold</i> (Ciclo Limiar)
DMEM	Meio Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNT	deoxinucleotídeos naturais
DU	dUTPase
dUTP	Desoxiuridina Trifosfato
FeLV	Vírus da Leucemia Felina
FIV	Vírus da Imunodeficiência Felina
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (Proteína Verde Fluorescente)
g	Força da gravidade
gp	Glicoproteína
h	Horas
H <sub>2</sub> O	Água
HAART	<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i> (Terapia Antirretroviral de Alta Eficácia)
HBV	Vírus da Hepatite B
HCME	Extrato metanólico de <i>Hypericum connatum</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSV-2	Vírus do Herpes Simples tipo 2
IN	Integrase
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LTR	<i>Long Terminal Repeats</i> (Sequências Longas Repetidas)
MA	Proteína da Matriz
mg	Miligrama
MGG	May-Grünwald-Giemsa
mL	Mililitro
mRNA	RNA mensageiro
NC	Proteína do Nucleocapsídeo
ng	Nanograma
nm	Nanômetros
NNRTI	Inibidor da RT não nucleosídeo

<b>NRTI</b>	Inibidor da RT nucleosídeo
<b>NtRTI</b>	Inibidor da RT nucleotídeo
<b>OH</b>	Hidroxila
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>ORF</b>	<i>Open Reading Frame</i> (Fase de Leitura Aberta)
<b>PBEH</b>	Extrato hexano de <i>Pterocaulon balansae</i>
<b>PBLI2</b>	Extrato aquoso liofilizado de <i>Pterocaulon balansae</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (Solução salina tamponada com fosfatos)
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polymerase)
<b>pEGFP</b>	Plasmídeo contendo sequência de GFP
<b>pFIV</b>	Plasmídeo contendo o provírus do FIV
<b>PR</b>	Protease
<b>qPCR</b>	PCR em Tempo Real
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>RT</b>	Transcriptase Reversa
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>SN</b>	Sobrenadante
<b>SU</b>	Superfície
<b>TDF</b>	Tenofovir Disoproxil Fumarato
<b>TM</b>	Transmembrana
<b>UFRGS</b>	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
<b>UI</b>	Unidades Internacionais

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Organização genômica do DNA proviral de FIV e HIV.....	14
<b>Figura 2.</b> Representação da replicação viral de FIV.....	15
<b>Figura 3.</b> Estrutura do composto Calanolide A .....	26
<b>Figura 4.</b> Representação de <i>Hypericum connatum</i> .....	27
<b>Figura 5.</b> CPE em CRFKs inoculadas com SN de CRFKs transfectadas com FIV.....	34
<b>Figura 6.</b> Citotoxicidade dos extratos frente às CRFKs .....	35
<b>Figura 7.</b> Curva padrão obtida pela PCR em tempo real.....	36



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Quantificação das partículas virais da avaliação da atividade antiviral por PCR em tempo real.....	37
<b>Tabela 2</b> - Quantificação por PCR em tempo real da relação efeito-dose de <i>Hypericum connatum</i> .....	38

## Sumário

1. Revisão Bibliográfica .....	12
1.1. Vírus da imunodeficiência felina.....	12
1.1.1. Partícula viral e genoma .....	12
1.1.2. Replicação viral .....	14
1.1.3. Patogenia .....	16
1.2. Terapia antirretroviral .....	17
1.2.1. Fármacos já existentes.....	18
1.2.2. Desenvolvimento de resistência .....	21
1.3. FIV como modelo experimental para o HIV .....	22
1.4. Plantas medicinais .....	23
1.4.1. <i>Pterocaulon balansae</i> .....	25
1.4.2. <i>Hypericum connatum</i> .....	26
2. Objetivos.....	27
2.1. Objetivo geral .....	27
2.2. Objetivos específicos .....	27
3. Justificativa .....	28
4. Metodologia .....	28
4.1. Obtenção do DNA plasmidial de clone infeccioso do FIV (pFIV) para fins de transfecção .....	28
4.2. Propagação, manutenção e obtenção de estoque de células permissíveis ao FIV.....	29
4.3. Transfecção das células CRFKs com o clone infeccioso.....	29
4.4. Avaliação de citotoxicidade de substâncias e extratos de plantas nas CRFKs .....	30
4.4.1. Obtenção dos extratos.....	30
4.4.2. Teste de citotoxicidade .....	31

4.5. Ensaio de inibição da replicação viral .....	31
4.6. Quantificação da inibição da replicação viral através de RT-PCR quantitativa (RT-qPCR).....	32
5. Resultados.....	33
5.1. Estoque viral .....	33
5.2. Citotoxicidade de substâncias e extratos de plantas nas CRFKs .....	34
5.3. Quantificação da inibição da replicação viral através de RT-PCR quantitativa (RT-qPCR).....	35
5.4. Relação efeito-dose do extrato metanólico de <i>Hypericum connatum</i> .	37
6. Discussão .....	38
7. Referências Bibliográficas .....	41
Anexo .....	45

## 1. Revisão Bibliográfica

### 1.1. Vírus da imunodeficiência felina

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) foi isolado pela primeira vez em 1986 em Petaluma, na Califórnia, de gatos domésticos que exibiam sinais de imunodeficiência, mas eram soronegativos para o vírus da leucemia felina (FeLV). FIV pertence à família *Retroviridae* e ao gênero *Lentivirus*. O vírus pode ser encontrado mundialmente e é classificado em 5 subtipos (A-E) (AKEMI et al., 2013) baseados na análise da sequência de nucleotídeos do gene *env* das regiões variáveis 3-5. A maioria dos vírus identificados pertence aos subtipos A e B, e um mesmo felino pode ser infectado por mais de um subtipo. A caracterização molecular dos isolados do FIV no Brasil revelou até o presente momento somente a presença do subtipo B em Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro (TEIXEIRA; JUNIOR; HAGIWARA, 2010).

Os *Lentivirus* são envelopados, de RNA fita simples que possuem uma enzima de transcriptase reversa, a qual irá gerar um DNA proviral que se integra no genoma do hospedeiro (STICKNEY; DUNOWSKA; CAVE, 2013). A ampla heterogeneidade molecular do FIV relatada nos subtipos do vírus identificados ao redor do mundo, e a alta capacidade de promover mutações sob pressões imunológicas, farmacológicas ou ambientais são características inerentes aos lentivírus (TEIXEIRA; JUNIOR; HAGIWARA, 2010).

Desde a sua descoberta, o FIV tem se mostrado único entre os lentivírus de não-primatas por ser capaz de infectar linfócitos T e ter a capacidade em causar imunodeficiência severa e irreversível. FIV e HIV são os dois únicos lentivírus que causam perda seletiva de células TCD4+ e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (LECOLLINET; RICHARDSON, 2008).

#### 1.1.1. Partícula viral e genoma

FIV é um vírus envelopado e similar aos outros *lentivirus* (MOHAMMADI; BIENZLE, 2012). O vírion tem 105-125 nm de diâmetro, possui uma forma esférica a helicoidal e um envelope externo com pequenas projeções pouco definidas. O genoma da partícula viral é caracterizado por apresentar duas fitas

simples de RNA não complementares, idênticas, de polaridade positiva, com 9,4 kilobases (TEIXEIRA; JUNIOR; HAGIWARA, 2010). O genoma do FIV é constituído por 3 grandes fases de leitura aberta (ORFs), sendo elas correspondentes aos genes *gag*, *pol* e *env* (Figura 1). As poliproteínas Gag, Pol e Env, são processadas por proteases, dando origem às principais proteínas do capsídeo, enzimas virais e glicoproteínas do envelope, respectivamente (LECOLLINET; RICHARDSON, 2008).

O gene *gag* é responsável por codificar as principais proteínas do interior da partícula viral, sendo elas a proteína do capsídeo (CA) e a proteína da matriz (MA), ambas responsáveis pela estrutura do vírion, e a proteína do nucleocapsídeo (NC), responsável pela ligação ao genoma viral (KENYON; LEVER, 2011).

O gene *pol* é responsável por codificar as principais enzimas para a replicação viral, sendo elas a transcriptase reversa (RT), responsável por transcrever o RNA genômico em DNA proviral, a integrase (IN), enzima que irá integrar o DNA proviral no genoma da célula hospedeira, e a protease (PR), que irá clivar as proteínas geradas pelo *gag* para produzir a matriz, o capsídeo e o nucleocapsídeo (KENYON; LEVER, 2011; STICKNEY; DUNOWSKA; CAVE, 2013). As propriedades enzimáticas dos produtos de *pol* do lentivírus felino são altamente similares às do HIV. A peculiaridade do gene *pol* de FIV se encontra na presença de uma sequência que codifica dUTPase (DU), uma enzima que pode proteger o genoma viral de erros na incorporação de dUTP, facilitando a infecção produtiva de células que não se dividem, como macrófagos, uma função que é aparentemente realizada pela proteína Vpr para o HIV (LECOLLINET; RICHARDSON, 2008). O gene *env* codifica as proteínas do envelope viral. Cada partícula é envolta por glicoproteínas do envelope de superfície (SU) e transmembranária (TM), envolvidas com receptores na interação celular, possuem atividade de fusão, sendo importantes para a penetração do vírus na célula. São os primeiros alvos de anticorpos e outros mecanismos efetores do sistema imune (BENDINELLI et al., 1995).

O genoma do FIV, além das três grandes regiões genômicas, também contém genes acessórios como *vif*, *rev* e *ORF-A*, que possuem funções reguladoras e transreguladoras da expressão viral. O DNA proviral ainda possui

duas longas repetições terminais, ou, LTR, contendo elementos indispensáveis para a iniciação da transcrição viral e replicação.

Além da diferença em não possuir a enzima DU, o genoma do HIV se diferencia por possuir um número maior de genes acessórios, como o *vpr*, *nef*, *vpu* e *tat* (LECOLLINET; RICHARDSON, 2008) (Figura 1).

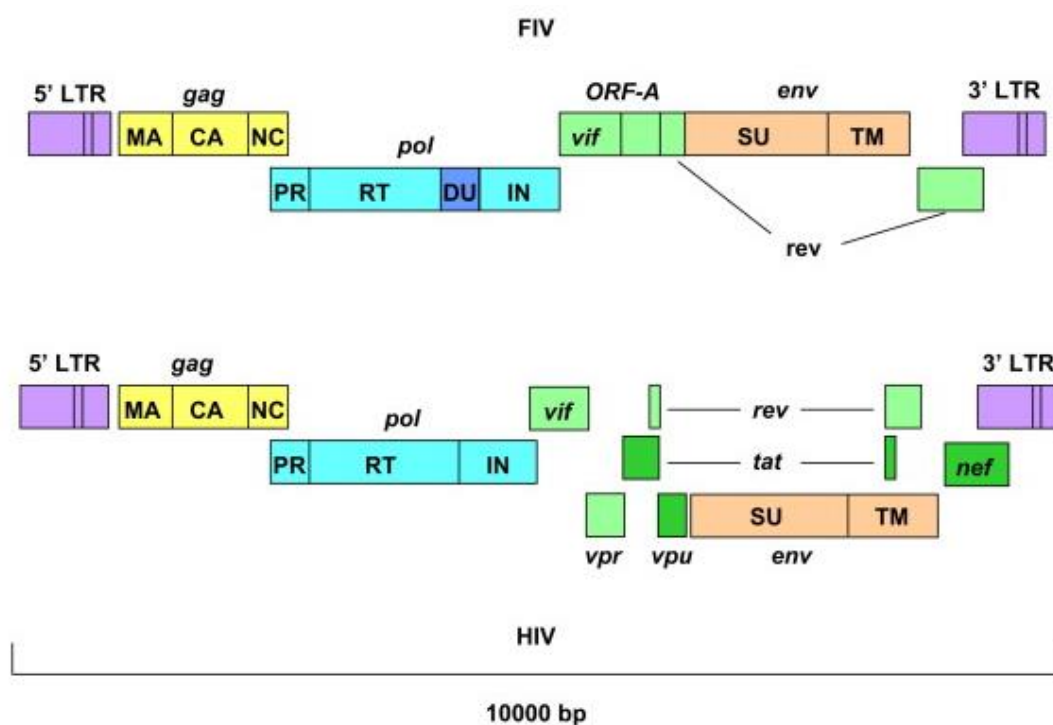


Figura 1. Organização genômica do DNA proviral de FIV e HIV. Fonte: Lecollinet, Richardson, 2008

### 1.1.2. Replicação viral

FIV infecta linfócitos, células da linhagem dos monócitos/macrófagos e células do sistema nervoso central. O vírus entra na célula através da glicoproteína do envelope viral, interagindo com receptor celular CD134, que irá expor um epítipo do envelope viral, o qual se ligará com alta afinidade ao co-receptor CXCR4, causando uma fusão na membrana celular e subsequentemente, o nucleocapsídeo viral entrará para o interior do citoplasma hospedeiro.

Após a entrada e o desenrolamento, o RNA fita simples é transcrito em DNA dupla fita pela enzima transcriptase reversa. A atividade RNase H da RT

catalisa a remoção do RNA. A RT de FIV compartilha 63% de identidade dos nucleotídeos e 67% de similaridade de aminoácidos com a RT do HIV-1.

O DNA dupla fita gerado é então transportado para o núcleo, onde irá ocorrer a integração no genoma do hospedeiro pela enzima viral Integrase. A proteína Rev irá auxiliar através do transporte do mRNA viral, e a proteína Orf A pode contribuir para a liberação viral das células infectadas. O mRNA viral e o RNA genômico são, então, transcritos e transportados para o citoplasma a fim de que ocorra a tradução do mRNA em proteínas virais. O vírion imaturo se desloca até a membrana celular, adquire o envelope viral e as glicoproteínas, e, então, é liberado da célula infectada por brotamento (MOHAMMADI; BIENZLE, 2012) (KENYON; LEVER, 2011) (Figura 2).

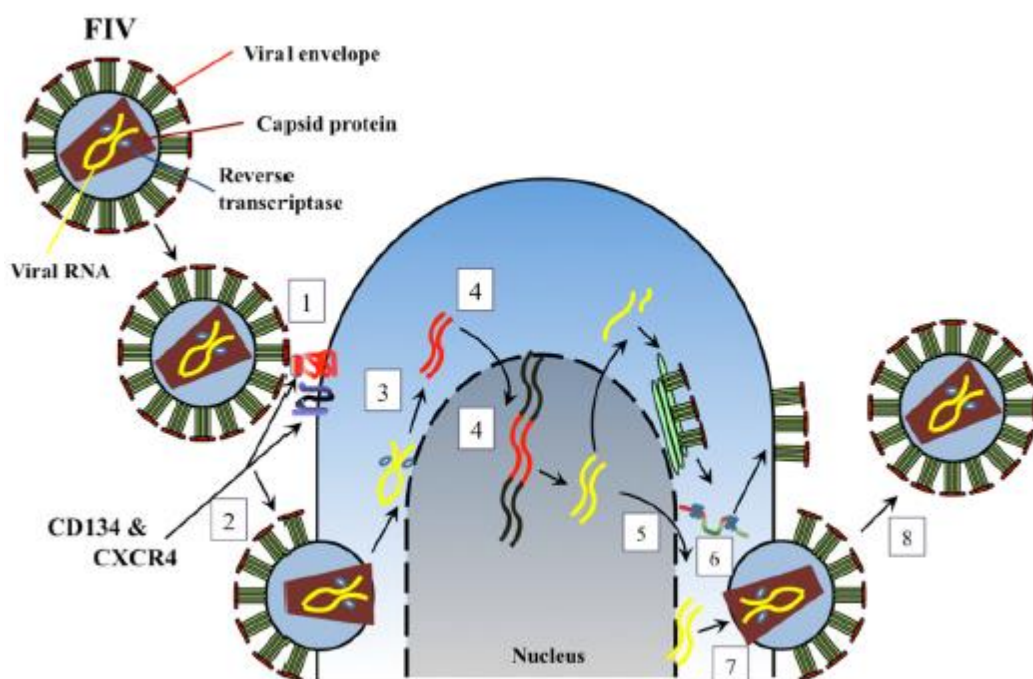


Figura 2. Representação da replicação viral de FIV; (1) Ligação do vírus aos receptores celulares; (2) Fusão viral com a membrana celular; (3) Transcrição reversa; (4) Translado ao núcleo e integração no genoma do hospedeiro; (5) Transcrição do DNA proviral e exportação nuclear; (6) Protease viral e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

### 1.1.3. Patogenia

O principal alvo da infecção pelo FIV é constituído pelos linfócitos T CD4+ ativados. Essas células, também conhecidas como células T *helper* (Th) ou auxiliares, desenvolvem um papel central na função imune, tanto na resposta humoral, através da produção de anticorpos, quanto na resposta celular (TEIXEIRA; JUNIOR; HAGIWARA, 2010). FIV não utiliza CD4 como receptor primário, infectando um grande número de células B e T CD8+, assim como T CD4+ e macrófagos (LECOLLINET; RICHARDSON, 2008).

A viremia é geralmente detectada na segunda semana após a infecção, com um pico entre 8 e 12 semanas, período no qual o vírus se espalha para todo o organismo. Durante o estágio inicial, ou fase aguda, o animal pode mostrar sinais clínicos moderados, como febre, anorexia e letargia (AKEMI et al., 2013). O sistema imune felino promove uma resposta vigorosa a partir das células T e B. Uma resposta específica ao FIV mediada por células T citotóxicas é desenvolvida rapidamente, em torno de 5 semanas, e persiste durante toda a fase assintomática da doença. Anticorpos neutralizantes anti-FIV surgem logo após a ação das células T CD8+ e participam do controle da infecção, como a prevenção da interação das partículas virais com novas células (LECOLLINET; RICHARDSON, 2008).

Os gatos infectados permanecem no estágio assintomático por muitos anos, ou até mesmo pela vida inteira, com alguns sinais clínicos; no entanto, a imunodeficiência permanece progredindo, com a redução do número de linfócitos T CD4+ e na inversão da taxa CD4+/CD8+. Após a fase assintomática, os gatos alcançam o segundo estágio, ou fase terminal, a qual correlaciona com as fases de linfadenopatia generalizada, pré-AIDS e AIDS da infecção por HIV. Esta fase é caracterizada por imunossupressão severa e uma consequente redução de anticorpos circulantes, a qual irá permitir o aumento da carga viral e maior susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças causadas por infecções crônicas secundárias ou oportunistas, neoplasias e desordens neurológicas (AKEMI et al., 2013).

A prevalência do FIV varia de 1% a 44%, dependendo do estado de saúde dos gatos em estudo. A prevalência é influenciada pelo comportamento do



animal. Felinos machos, com livre acesso a ambientes externos em áreas de alta densidade populacional, constituem o grupo de maior risco por estarem mais expostos a mordidas, que é a principal forma de transmissão, em brigas por demarcação territorial (AKEMI et al., 2013). A infecção do FIV também pode ocorrer por transmissão pré e pós-natal, pela mucosa através do contato sexual, e por transferência de sangue (BIENZLE et al., 2004). Gatos infectados não exibem sinais clínicos específicos, e alguns animais podem ser assintomáticos por toda a vida (AKEMI et al., 2013).

## 1.2. Terapia antirretroviral

Antivirais são compostos que interferem em uma ou mais etapas do ciclo de replicação viral. Após estudos descrevendo a interação entre o vírus e a célula, foram identificadas as diversas etapas em que o ciclo viral pode ser interrompido (HARTMANN; STENGEL, 2006).

Há diversos tipos de medicamentos antivirais, como nucleosídeos (adefovir, entecavir, lamivudine) e agentes biológicos (interferon, IFN) (HUANG et al., 2014), que podem ser classificados quanto a sua inibição em uma etapa específica do ciclo viral. Os compostos anti-HIV podem atuar na adsorção do vírus à célula, na sua fusão, transcrição reversa, integração, replicação do DNA proviral, entre outros (PRASAD; TYAGI, 2015).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 12,9 milhões de pacientes recebem terapia antirretroviral (ART). O regime terapêutico mais eficiente atualmente é a HAART (“Highly Active Antiretroviral Therapy”), a qual combina inibidores de protease e inibidores de transcriptase reversa nucleosídeos ou não-nucleosídeos. HAART controla a infecção de HIV somente em indivíduos que seguem ininterruptamente a terapia, e a pausa na medicação leva a uma retomada da viremia (MUKHTAR et al., 2008).

### 1.2.1. Fármacos já existentes

#### 1.2.1.1. Inibidores da entrada celular

Homólogos/antagonistas de receptores se ligam ao vírus ou ao receptor celular, levando à inibição da adsorção viral à superfície da célula. A grande parte é altamente seletiva para HIV, e não são utilizados pela medicina veterinária. Uma exceção é a classe de compostos antivirais chamada Biciclams, a qual vem sendo utilizada em gatos infectados por FIV. Biciclams atuam como antagonistas seletivos ao receptor CXCR4, e, ao se ligar ao receptor, previne a interação com outros ligantes, impedindo a entrada do HIV ou FIV no interior celular (HARTMANN; WOODING; BERGMANN, 2015).

#### 1.2.1.2. Inibidores de protease

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

#### 1.2.1.3. Inibidores da transcriptase reversa

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

#### 1.2.1.3.1. NRTIs

NRTIs são metabolizados em sua forma ativa tri-fosforilada por quinases e, então, competem com dNTs para a incorporação nas fitas de DNA que estão sendo sintetizadas pela RT viral. No entanto, como há a falta do grupo 3'-hidroxila, o próximo dNT não pode formar ligação fosfodiéster, resultando no término da elongação do DNA. Zidovudina, mais conhecida como AZT, foi o primeiro agente NRTI aprovado para o tratamento de HIV, e, desde então, outros sete NRTIs foram aprovados (HARTMANN; WOODING; BERGMANN, 2015). Os medicamentos vêm sendo avaliados também *in vitro* e *in vivo* para a inibição da replicação do FIV. Zidovudina preveniu mais de 95% da replicação de FIV em células CRFK. Também foi avaliada em gatos infectados, e foi relativamente bem tolerada, porém, pôde-se observar o surgimento de anemia, impedindo de ser utilizada em altas dosagens (MOHAMMADI; BIENZLE, 2012). Outros medicamentos inibidores de RT aprovados para o tratamento da infecção por HIV são: Abacavir, Stavudina, Emtricitabine, Lamivudine e Didanosine (HARTMANN; WOODING; BERGMANN, 2015).

#### 1.2.1.3.2. NtRTIs

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

#### 1.2.1.3.3. NNRTIs

NNRTIs são pequenas moléculas que não são análogas a nucleosídeos naturais, e se diferenciam estruturalmente de NRTIs e NtRTIs. O sítio de ligação na enzima RT é diferente dos outros tipos de inibidores. Este se liga ao domínio perto do sítio ativo da enzima e muda sua conformação, o qual vai resultar em

uma inibição não-competitiva da ação catalítica (MOHAMMADI; BIENZLE, 2012). Há três medicamentos aprovados para uso clínico, sendo eles, nevirapina, delavirdina e efavirenz, inibindo somente HIV (AMMARANOND; SANGUANSITTIANAN, 2012). Outros retrovírus, como o FIV, não foram suscetíveis a esta inibição, possivelmente devido às diferenças estruturais no sítio de ligação da enzima (MOHAMMADI; BIENZLE, 2012).

#### 1.2.1.4. Inibidores de integrase

Inibidores de integrase agem através da inibição da integração do DNA proviral que é produzido pela transcrição reversa do RNA genômico do vírus. Raltegravir é utilizado como composto anti-HIV e mostrou também ser ativo contra o FIV, *in vitro*. Porém, o lentivírus felino foi menos suscetível ao medicamento (HARTMANN; WOODING; BERGMANN, 2015).

#### 1.2.1.5. Vacina

A natureza da infecção lentiviral, a sua habilidade em invadir o sistema imune, e a sua rápida mutação na região do envelope viral com uma geração de novas variantes, constituem as maiores dificuldades no desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o FIV (DUNHAM; GRAHAM, 2008; TEIXEIRA; JUNIOR; HAGIWARA, 2010). Vacinas desenvolvidas com um único subtipo protegem contra a infecção homóloga, mas podem falhar na proteção contra cepas divergentes que apresentem mais de 20% de diferença nas sequências do gene *env* (TEIXEIRA; JUNIOR; HAGIWARA, 2010). Diversas vacinas experimentais vêm sendo testadas, incluindo vacinas de DNA, recombinantes, e imunógenos de vírus inativado (AMMARANOND; SANGUANSITTIANAN, 2012).

Em 2002, foi licenciada para comercialização nos Estados Unidos, uma vacina (Fel-O-Vax; Fort Dodge®; USA) contendo preparados de vírus inativado contra o FIV. A vacina foi produzida de uma linhagem de células felinas infectadas com dois subtipos do FIV, o subtipo A<sub>Petaluma</sub> e o subtipo D<sub>Shizuoka</sub>. No estudo realizado, 84% dos gatos vacinados foram protegidos contra um heterólogo de FIV do mesmo subtipo após um ano da vacinação (HUANG et al., 2010). Desde a sua liberação, nenhum caso de infecção foi relatado nos Estados

Unidos. Apesar de ter apresentado um alto índice de proteção, a eficácia da vacina se limita ao subtipo B da infecção (TEIXEIRA; JUNIOR; HAGIWARA, 2010).

O uso generalizado da vacina de FIV, que contenha vírus inativados inteiros, também levanta um problema para o diagnóstico da infecção de FIV, pois acaba induzindo uma resposta de anticorpos indistinguível daquela induzida pela infecção viral (DUNHAM; GRAHAM, 2008). É de fundamental importância a determinação da diversidade genética das linhagens de FIV circulantes da região onde seja planejada sua comercialização (TEIXEIRA; JUNIOR; HAGIWARA, 2010).

### 1.2.2. Desenvolvimento de resistência

O desenvolvimento de resistência aos medicamentos é um dos maiores desafios encontrados pela administração contínua de uma terapia efetiva contra patógenos infecciosos. Embora o número de terapias e medicamentos contra o HIV tenha aumentado, a ocorrência de vírus resistentes a esses tratamentos também se intensificou (AMMARANOND; SANGUANSITTIANAN, 2012). A alta quantidade de erros cometidos pela enzima RT e a alta taxa de produção de vírions, resulta na heterogeneidade das sequências do DNA proviral, a qual permite ao vírus uma rápida adaptação à resposta imune, aos fármacos antivirais, ou a ambos, constituindo o mecanismo de resistência diante de pressões farmacológicas, imunológicas ou de pressões de seleção ambiental (TEIXEIRA; JUNIOR; HAGIWARA, 2010).

Em um estudo realizado pela OMS, em 2012, foram coletados dados de diversas pesquisas realizadas sobre a resistência viral a medicamentos anti-HIV. Nos 4.248 pacientes avaliados, em 573 o tratamento falhou no período de 12 meses, representando 13,5% do total de pacientes. Entre os casos que falharam, 60% foram documentados como resistentes a HIV e 40% como vírus selvagens (reinfecções). As mutações mais comuns encontradas foram mutações aos NRTI (detectadas em 55% dos pacientes avaliados) e aos NNRTI (46%) (HOSSEINIPOUR et al., 2013).

Nos medicamentos NRTI, a baixa fidelidade da enzima RT e a alta taxa de replicação viral permite o aumento de mutações. A maior limitação ao

tratamento com NNRTIs é o rápido desenvolvimento de mutantes resistentes. Uma única mutação poderá causar um alto nível de resistência, podendo ser cruzada entre todos medicamentos NNRTIs.

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

Entre 36 pesquisas em 12 países, a resistência completa entre os pacientes no início da terapia antirretroviral aumentou de 4,8% em 2007 a 6,8% em 2010, um aumento ocasionado por mutações associadas ao tratamento com NNRTIs (HOSSEINIPOUR et al., 2013).

Embora mutações ocorram de forma aleatória, a sobrevivência de novas variantes de FIV pode ser influenciada pela resposta imune do hospedeiro. O escape da imunidade, ou a falha em desencadear uma forte resposta imune, pode favorecer as variantes de FIV à formação de uma população homogênea do vírus, devido à menor pressão seletiva. Por outro lado, aqueles que estiverem sob uma maior pressão efetiva da resposta do sistema imune serão forçados a evoluírem para sobreviver (STICKNEY; DUNOWSKA; CAVE, 2013).

### 1.3. FIV como modelo experimental para o HIV

FIV possui alta similaridade ao HIV em respeito à sua estrutura molecular, propriedades de replicação viral e a patogenicidade da doença, a qual ocasiona a síndrome da imunodeficiência em gatos, comparável à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) em humanos. Logo após o seu isolamento e caracterização, FIV se tornou alvo como modelo animal para terapias antivirais contra o HIV. FIV e HIV compartilham um mesmo receptor utilizado para a entrada nas células alvos, o CXCR4, que, para o HIV, funciona como um co-receptor, e o torna um importante alvo para novos tratamentos (ELDER et al., 2010). Seus genomas codificam os mesmos três genes principais, *gag*, *pol* e *env*, assim como parte dos genes acessórios, como *rev* e *vif* (MCDONNEL; SPARGER; MURPHY, 2013). O alvo dos antirretrovirais são, principalmente, as enzimas codificadas pelo gene *pol*, responsáveis pela replicação viral, sendo

elas a transcriptase reversa, a protease e a integrase (ELDER et al., 2010). A similaridade entre a RT de ambos os vírus em relação as suas sequências de aminoácidos, propriedades estruturais, atividades catalíticas e a suscetibilidade a múltiplos análogos nucleosídeos, encorajaram os estudos para a descoberta de novos inibidores da replicação viral (HARTMANN; STENGEL, 2006).

O modelo de FIV pode ser utilizado para investigar propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas de compostos anti-HIV, para determinar seu potencial como antiviral. Através de estudos em gatos infectados experimentalmente, é possível avaliar a eficácia do medicamento em modelos pré-expostos, em infecções recentes, assim como em infecção crônica. Sob condições naturais, os sinais clínicos relacionados a FIV se desenvolvem após um longo período de latência que dura anos, assim como o HIV (HARTMANN; STENGEL, 2006). Os gatos infectados pelo lentivírus felino também podem ser estudados quanto as suas características de replicação viral e tropismo celular, incluindo os reservatórios virais centrais, que são tipicamente inacessíveis em humanos infectados por HIV. Estudos em gatos infectados naturalmente e experimentalmente revelaram importantes informações sobre a patologia da infecção viral ao longo dos anos, e, como resultado, se tornaram um modelo relevante para terapias antivirais e vacinas. FIV é o único vírus de não-humanos que causa depleção progressiva das células T CD4+, somada a infecções oportunistas e enfermidades, como definhamento e desordens neurológicas (ECKSTRAND; SPARGER; MURPHY, 2017).

#### 1.4. Plantas medicinais

Os medicamentos anti-HIV e as terapias combinadas, como a HAART, não são completamente efetivos contra a replicação viral. Apesar de elevarem intensamente o tempo de sobrevivência e a qualidade de vida dos pacientes, há a necessidade da adesão do medicamento por toda a vida, além de efeitos colaterais e surgimento de mutantes resistentes. Em pessoas que estão sob terapia HAART, a viremia é geralmente reduzida para menos de 50 cópias de RNA por mililitro de sangue e, caso o tratamento seja interrompido, acaba

resultando em uma retomada da viremia, com progressão da AIDS (MCDONNEL; SPARGER; MURPHY, 2013; MUKHTAR et al., 2008).

Plantas medicinais vêm sendo utilizadas desde a origem da civilização humana. O primeiro interesse reconhecido no desenvolvimento de agentes antivirais ocorreu pela companhia Boots, em 1952, na Inglaterra, onde analisaram 288 plantas para atividade anti-influenza. Estudos posteriores têm mostrado os efeitos inibidores de diversos extratos de plantas na replicação de diferentes vírus, como o Vírus do Herpes Simples tipo 2 (HSV-2), HIV e Vírus da Hepatite B (HBV) (MUKHTAR et al., 2008). Metabólitos secundários constituem quase 50% das novas drogas introduzidas no mercado farmacêutico de 1981 até 2010 e, aproximadamente 75% dos agentes anti-infecciosos são produtos naturais ou derivados (ALVES et al., 2014). De acordo com a OMS, estima-se que 80% da população mundial utiliza fontes fitomedicinas para os cuidados com a saúde (MUKHTAR et al., 2008).

Compostos naturais demonstraram possuir ação inibitória em transcriptase reversa, protease e integrase. São constituídos principalmente por flavonoides, polifenóis, alcaloides, cumarinas, terpenoides, e diversos outros, sendo a maior parte destes os flavonoides e os polifenóis, seguidos pelos terpenoides. Muitos deles apresentam inibição eficiente em RT, PR e IN ao mesmo tempo (JIANG et al., 2010).

Recentes estudos em triterpenoides vêm sendo focados principalmente em ácido oleanólico, ácido betulínico, ácido ursólico, e seus derivados. Os três triterpenos já demonstraram possuir atividade inibitória contra a protease do HIV-1 *in vitro* (GANJHU et al., 2015). Os flavonoides podem inibir diversos passos críticos do ciclo de vida do HIV. Flavononas, que possuem um grupo OH na posição C-3', como taxifolina, inibem protease, RT e a interação CD4/gp120, se ligando ao loop V3 da gp120. Flavononas que não possuem o grupo OH na posição C-3', como aromadendrina, são mais específicas e inibem somente a interação CD4/gp120. Flavonóides são conhecidos por inibirem diversas enzimas, incluindo as necessárias para a replicação do HIV. Diferentes tipos de alcaloides mostraram atividade anti-HIV. Policitona A, um alcaloide aromático, demonstrou atividade inibitória na transcriptase reversa do HIV (JIANG et al., 2010; KURAPATI et al., 2016).



#### 1.4.1. *Pterocaulon balansae*

O gênero *Pterocaulon* abrange 18 espécies distribuídas ao longo da América do Sul e América do Norte, Austrália e áreas adjacentes (VERA et al., 2001). A principal classe de compostos ativos encontrados no gênero são terpenos, flavonoides e as cumarinas (SILVEIRA et al., 2009).

Cumarinas consistem em uma grande classe de substâncias fenólicas encontradas em plantas e são caracterizadas pela presença de um anel 1,2 benzopirona em sua estrutura. São uma importante classe de produtos naturais anti-RT (JIANG et al., 2010).

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

Piranocumarinas, como a pseudocordatolide C e calanolídeo F, compostos isolados de *Calophyllum*, também apresentaram atividade anti-HIV (VENUGOPALA; RASHMI; ODHAV, 2013). Cordatolide A e B apresentam estrutura similar aos Calanolídeos (Figura 3), inibindo a replicação viral de HIV-1. Além destes, Suksdorfin, um composto derivado de pirocumarina, apresentou efeitos inibitórios à replicação viral (KURAPATI et al., 2016).

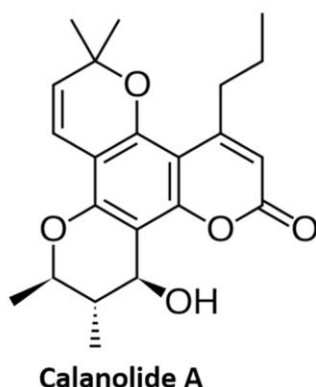


Figura 3. Estrutura do composto Calanolide A. Fonte: Kurapati et al., 2016

#### 1.4.2. *Hypericum connatum*

*Hypericum*, membro da família *Guttiferae*, é um gênero com mais de 450 espécies distribuídas em diversas regiões do mundo. Aproximadamente vinte espécies deste gênero são encontradas no Brasil, concentrando-se principalmente na região sul (FRITZ, 2006).

São relatados diversos membros da família *Guttiferae* que são utilizados na medicina tradicional para tratar, por exemplo, feridas, hepatite, caxumba, distúrbios gastrointestinais e tumores. Muitos compostos desta família já foram isolados para o estudo de suas atividades antivirais (FRITZ et al., 2007).

Algumas espécies do gênero *Hypericum* tem recebido importância pois apresentaram, além da conhecida atividade antidepressiva, atividade anti-inflamatória, diurética, antiviral e antibacteriana (FRITZ, 2006). Os compostos mais comuns isolados de plantas do gênero são quinonas, xantonas, flavonoides, e derivados de florigucinol (FRITZ et al., 2007).

Hipericina e pseudohipericina são antraquinonas isoladas do gênero *Hypericum*, e demonstraram ação antiviral em vírus de RNA e DNA envelopados e não envelopados (HUDSON; LOPEZ-BAZZOCCHI; TOWERS, 1991; TANG et al., 1990). Estas substâncias foram capazes de reduzir a propagação do HIV-1 *in vitro* e eficazes em prevenir manifestações induzidas pelo vírus *in vivo* e *in vitro*, além de demonstrarem maior atividade sob a presença de luz ultravioleta (AXARLIS et al., 1998).

*Hypericum connatum*, conhecida popularmente como “orelha-de-gato”, é uma erva ou subarbusto, que possui ocorrência natural no sul e sudeste do Brasil, sul da Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai (Figura 4). É utilizada por índios guaranis para o tratamento de feridas na boca, dores, anginas, aftas e estomatites (FRITZ, 2006). A espécie também demonstrou atividade antiviral frente ao FIV em estudos anteriores (SCHMITT; RAVAZZOLO; VON POSER, 2001).



Figura 4. Representação de *Hypericum connatum*. Fonte: Fritz, 2006

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade antiviral de extratos provenientes de *Hypericum connatum* e *Pterocaulon balansae* frente ao FIV, como modelo experimental para o HIV.

### 2.2. Objetivos específicos

- I. Avaliar a toxicidade de substâncias isoladas e extratos nas células permissíveis ao vírus;
- II. Quantificar, por RT-qPCR, a inibição da replicação viral em células infectadas pelo FIV e tratadas com as substâncias e extratos através de RT-qPCR.

### 3. Justificativa

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) atinge milhões de pessoas em escala mundial. É um vírus muito conhecido por sua alta patogenicidade e a alta capacidade em levar o paciente a ser propenso a diversas outras doenças devido à deficiência do sistema imune. Hoje, ainda não temos uma vacina eficaz para o HIV. Os medicamentos e terapias existentes possuem alguns obstáculos para o hospedeiro. Além de não ser possível a completa eliminação do vírus do organismo, tendo que ser administrado por toda a vida, os medicamentos possuem uma série de efeitos colaterais prejudiciais ao paciente. Além disto, devido à alta taxa de mutação do vírus, constantemente desenvolve resistência aos antirretrovirais existentes.

A necessidade da descoberta de novas terapias tem levado pesquisadores à busca por novas moléculas, cada vez mais constante, em diferentes organismos vivos, principalmente nos vegetais superiores. Este projeto tem como justificativa a procura de um novo extrato de planta como forma de tratamento para o HIV, utilizando como modelo para tal o vírus da imunodeficiência felina (FIV).

### 4. Metodologia

#### 4.1. Obtenção do DNA plasmidial de clone infeccioso do FIV (pFIV) para fins de transfecção

Primeiro, foram obtidas bactérias competentes *E. coli* da linhagem XL-1, através do protocolo estabelecido por CHUNG et al. (1989). A transformação foi realizada pela técnica de choque térmico, sendo adicionado às bactérias competentes 1  $\mu$ L do DNA de FIV em uma concentração de 1 ng/ $\mu$ L. As bactérias foram incubadas no gelo por 30 minutos, em seguida 45 segundos em banho maria a 42 °C, e, então, novamente incubadas no gelo. Foi acrescentado meio SOC aos tubos, e incubados por 2 horas em banho-maria com agitação, à 30 °C. Transcorridas as 2 horas, foram plaqueados 100 e 200  $\mu$ L em meio LB contendo ampicilina. Após 24 horas, foram selecionadas seis colônias que foram transferidas para tubos contendo 5 mL de meio LB com ampicilina. Após 24

horas, foi realizado o Miniprep das 6 colônias selecionadas (SAMBROOK; FRISCH; MANIATIS, 1989). A comprovação da integridade do plasmídeo foi verificada através da digestão com a enzima *EcoRI*. A fim de obter uma maior quantidade do pFIV, foi realizado o Midiprep de duas amostras selecionadas, seguindo o protocolo PureYield™ Plasmid Midiprep System, e, em seguida, o pFIV foi digerido por *EcoRI* (Promega, São Paulo, Brasil), *BamHI* (Thermo Fisher, São Paulo, Brasil), *HindIII* (Thermo Fisher), *KpnI* (Thermo Fisher), *SalI* (Thermo Fisher) e *XbaI* (Promega), confirmando a presença do DNA viral no plasmídeo, o qual foi quantificado por fluorimetria (QUBIT).

#### 4.2. Propagação, manutenção e obtenção de estoque de células permissíveis ao FIV

Para obtenção do estoque de células, foram utilizadas as células de linhagem de rim felino CRFK (Crandell Rees feline kidney) (ATCC/CCL-94) permissíveis ao vírus, as quais foram descongeladas e cultivadas em frascos de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> contendo meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - Sigma Chemical Co. St. Louis, USA), suplementadas com 5% de soro fetal bovino (SFB), 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, em uma atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C. Após serem tripsinizadas e contadas, foram congeladas em nitrogênio líquido, a fim de obter um estoque de células.

#### 4.3. Transfecção das células CRFK com o clone infeccioso

Para a transfecção das células foi utilizada uma placa de cultivo celular contendo 6 poços. Em cada poço da placa, foram semeadas 5x10<sup>4</sup> células em meio DMEM enriquecido por 5% de SFB. Após 24 horas, a 37 °C, a transfecção foi realizada utilizando uma quantidade total de pFIV de 2,5 µg e, como controle da transfecção, foi utilizado o plasmídeo contendo GFP (pEGFP), para fins de posterior visualização, na mesma quantidade. Utilizou-se o reagente comercial Lipofectamina como agente de transfecção, em três quantidades diferentes, a fim de determinar a quantidade mais adequada: 5, 7,5 e 10 µL. O DNA e a

Lipofectamina foram incubados juntos por 30 minutos, em 300  $\mu$ L de DMEM sem soro, com o propósito de formar um complexo. Após os 30 minutos, o sobrenadante da placa foi aspirado, e a placa foi lavada com solução PBS. A seguir, foram acrescentados os 300  $\mu$ L do complexo DNA + Lipofectamina nos poços. Depois de adicionar 1 mL por poço de DMEM sem soro, a placa foi incubada por 40 minutos, a 37 °C, e então adicionados mais 2 mL de DMEM 10% SFB. Após 24 horas, o meio da placa foi trocado. Três dias após a inoculação, foram adicionadas mais  $5 \times 10^4$  células em cada poço, e novamente o meio foi trocado. A placa foi observada ao microscópio a fim de verificar: (i) a quantidade de células fluorescentes, e (ii) a presença de efeito citopático (CPE) nas células transfectadas com pFIV. Após a observação, a placa foi congelada a -80 °C, e no dia seguinte o conteúdo dos poços em que foi observado CPE foi coletado, e, então, realizada a clarificação. Todo o conteúdo dos poços foi transferido para um tubo de 50 mL, centrifugado a 1.600 g por 20 minutos, transferido para novos tubos em alíquotas, e congelado a -80 °C para obtenção do estoque viral.

#### 4.4. Avaliação de citotoxicidade de substâncias e extratos de plantas nas CRFKs

##### 4.4.1. Obtenção dos extratos

Os extratos de plantas utilizados neste projeto foram cedidos pelo setor de Farmacognosia, da Faculdade de Farmácia da UFRGS. Foram avaliados: extrato metanólico proveniente de *Hypericum connatum* (HCME); extrato aquoso liofilizado proveniente de *Pterocaulon balansae* (PBLI2); e extrato hexano proveniente de *Pterocaulon balansae* (PBEH). Após a obtenção dos extratos, os mesmos foram dissolvidos em DMSO e DMEM. A partir dos extratos HCME e PBEH foram pesados 50 mg, dissolvidos em 10  $\mu$ L de DMSO, e, então, acrescentados 5 mL de DMEM de forma fracionada, gerando uma concentração final de 10 mg/mL. Foram pesados 25 mg do extrato PBLI2 e dissolvidos em 10  $\mu$ L de DMSO. Após a adição de DMEM, gerou uma concentração final de 5

mg/mL. Todas as diluições foram filtradas em membrana 0,22  $\mu$ M e conservadas em alíquotas à -20°C.

#### 4.4.2. Teste de citotoxicidade

As CRFKs foram tripsinizadas e semeadas em uma placa de cultivo celular de 96 poços, a uma quantidade de  $10^4$  células por orifício, em 200  $\mu$ L de DMEM, acrescidos de 5% de SFB e antibióticos. Após serem incubadas a 37 °C, por 24 h, o sobrenadante foi desprezado, e, então, adicionados 200  $\mu$ L por orifício das diluições dos extratos em quatro concentrações diferentes (150; 100; 75 e 50  $\mu$ g/mL). Como controle do ensaio, as células foram mantidas apenas com DMEM. Foram também avaliadas quatro porcentagens diferentes de DMSO (0,25; 0,12; 0,06 e 0,03%), a fim de determinar sua toxicidade frente às CRFKs. A placa de 96 poços foi incubada por 72 h a 37 °C. Após o período, para a análise dos efeitos citotóxicos, foi realizada a coloração do tapete celular pelo método May-Grünwald-Giemsa (MGG) e as células foram observadas ao microscópio quanto à integridade do tapete celular e alterações fenotípicas.

#### 4.5. Ensaio de inibição da replicação viral

CRFKs foram tripsinizadas, contadas e semeadas em uma placa de 24 orifícios, contendo  $4 \times 10^4$  células por orifício, em 1 mL de DMEM. Foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Após este período, o sobrenadante foi desprezado, e acrescentados 150  $\mu$ L do sobrenadante viral obtido na transfecção do FIV, mais 300  $\mu$ L de DMEM em cada orifício. No controle de células, foi acrescentado somente 450  $\mu$ L de DMEM. Após 2 horas da inoculação, período para as partículas virais aderirem ao tapete celular, o sobrenadante foi desprezado, e, então, foi acrescentado 1 mL de DMEM contendo a maior concentração de cada extrato que não apresentou toxicidade às CRFKs no ensaio anterior, sendo elas de 75  $\mu$ g/mL para os extratos PBEH e PBLI2, e de 25  $\mu$ g/mL para o HCME. Foi mantido um controle contendo somente células, e um controle viral. Cada tratamento foi realizado em quadruplicata. A placa foi incubada por 5 dias a 37 °C. Após este período, e a retirada do

sobrenadante para extração do RNA viral, foi realizada a coloração do tapete celular pelo método MGG para a visualização do efeito citopático.

#### 4.6. Quantificação da inibição da replicação viral através de RT-PCR quantitativa (RT-qPCR)

Após o período de incubação, o sobrenadante da placa foi retirado, e realizada a etapa de clarificação. Os tubos foram centrifugados a 8.500 g por 20 minutos, e, após transferir o sobrenadante para novos tubos, novamente centrifugados a 12.500 g por 60 minutos em centrífuga refrigerada. Os pellets obtidos pela centrifugação foram submetidos à extração do RNA viral pelo reagente Fastzol (Quatro G), utilizando 500 µL do reagente para cada *pool* de quatro poços. O RNA viral foi transcrito para cDNA pela técnica de RT, na qual em cada reação foram adicionados 10 µL do RNA viral obtido na extração, *primers* de sequências aleatórias e os demais reagentes seguindo o protocolo do fabricante (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Applied Biosystems). A RT foi realizada nas seguintes condições: um ciclo de 10 minutos a 25 °C, um ciclo de 2 horas a 37 °C, e, logo após, mais 5 minutos a 80 °C, seguido pela etapa de resfriamento. Após a obtenção do cDNA, o mesmo foi quantificado pela técnica de PCR em tempo real (qPCR), sendo o SYBR™ Green, ou equivalente, a plataforma utilizada para a detecção. Para isto, foram feitas reações contendo 4 µL do produto da RT, juntamente com 0,5 µL de uma solução a 10 µM de cada *primer* senso (5'- GAA AGA ATT CGG GAA ACT GGA A-3') e antisense (5'- TGG AGG TGC AGA TGG CAT TA-3') específicos para o gene *gag*, projetados com o *software* Primer Express®, versão 3.0 (Applied Biosystems). O restante da reação de qPCR foi realizada de acordo com o protocolo (GoTaq® qPCR Master Mix, Promega) para reações de 20 µL. Todas as reações foram realizadas em duplicatas. Para a quantificação, foi utilizada uma curva padrão representando o número de cópias de pFIV. O pFIV, já quantificado anteriormente, foi diluído até se obter uma concentração de 10<sup>6</sup> cópias/µL, a partir de cálculo realizado através do site da Thermo Fisher (THERMO FISHER, 2017) e, a partir disso, foram obtidas diluições de base 10 até 10<sup>0</sup> e acrescentados 4 µL na reação de qPCR, sendo 1 µL da diluição de



pFIV e 3  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . Para o experimento, foram utilizadas as diluições de  $10^2$  a  $10^5$  cópias/ $\mu\text{L}$ . No controle negativo da reação, foram acrescentados 4  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . A PCR em tempo real foi realizada nas seguintes condições: 10 minutos a  $95\text{ }^\circ\text{C}$ , seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a  $95\text{ }^\circ\text{C}$  e 1 minuto a  $60\text{ }^\circ\text{C}$ , finalizando pela curva de melting: 15 segundos a  $95\text{ }^\circ\text{C}$ , 1 minuto a  $60\text{ }^\circ\text{C}$  e 15 segundos a  $95\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 4.7. Avaliação da relação efeito-dose do extrato metanólico de *Hypericum connatum*

Sendo o extrato de *Hypericum connatum* o mais promissor como inibidor do FIV, foi realizado um experimento para confirmar o efeito antiviral do mesmo, utilizando diferentes concentrações do extrato. A etapa inicial do experimento, segue o mesmo protocolo descrito no item 4.5. Após as 2 horas da inoculação, o meio foi retirado e, então, acrescentado 1 mL de meio DMEM contendo 4 concentrações diferentes do extrato *Hypericum connatum*, sendo elas: 25; 12,5; 6,25 e 3,12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Foi mantido um controle contendo somente células, e um controle viral. A placa foi incubada a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  por 5 dias. Após o período, a placa foi corada pelo método MGG, e o sobrenadante submetido às etapas de clarificação, extração do RNA viral e RT como descritas no item 4.6. A qPCR foi realizada com a metade do volume descrito no item 4.6, utilizando 2  $\mu\text{L}$  de reação da RT, e os demais reagentes a partir das recomendações do fabricante para 10  $\mu\text{L}$  de reação (PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix, Thermo Fisher).

## 5. Resultados

### 5.1. Estoque viral

Após a confirmação da presença do plasmídeo pUC119 contendo o clone de FIV-34TF10, pela visualização da banda correspondente em gel de agarose, o mesmo foi quantificado por fluorimetria (QUBIT), na qual obteve-se uma concentração de pFIV de 150,5  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . Após os 5 dias da transfecção nas CRFKs, foi observado o efeito citopático de pFIV, e a quantidade de células

fluorescentes. A quantidade de lipofectamina mais eficiente para a transfecção do plasmídeo foi de 10  $\mu\text{L}$ , podendo ser observada uma maior quantidade de células fluorescentes no controle de GFP. As células transfectadas com o FIV apresentaram CPE com formação de células multinucleadas e morte celular. O sobrenadante viral foi utilizado para infectar novas células, a fim de se obter um estoque viral. As CRFKs inoculadas com o SN apresentaram formação de sincícios e morte celular após 5 dias da infecção viral (Figura 5).

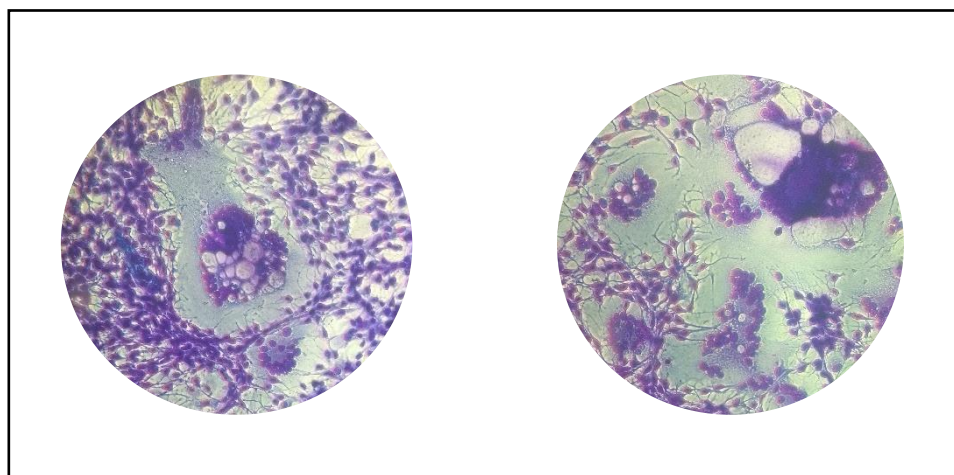


Figura 5. CPE em CRFKs inoculadas com SN de CRFKs transfectadas com FIV

## 5.2. Citotoxicidade de substâncias e extratos de plantas nas CRFKs

Após 72 horas da inoculação dos extratos, a citotoxicidade frente às CRFKs foi avaliada através da visualização de alteração na morfologia e morte celular. Todas as diluições testadas do extrato metanólico de *Hypericum connatum* apresentaram toxicidade às células, sendo observada intensa morte celular (Figura 6A), porém, na sua menor concentração, de 50  $\mu\text{g/mL}$ , demonstrou citotoxicidade reduzida (Figura 6B). A concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$  foi submetida ao ensaio de inibição da replicação viral. Em relação aos dois extratos provenientes de *Pterocaulon balansae*, nas concentrações de 150 e 100  $\mu\text{g/mL}$ , os extratos apresentaram toxicidade (Figura 6C e 6D), enquanto que nas concentrações de 75 e 50  $\mu\text{g/mL}$ , não demonstraram ser tóxicos às CRFKs, podendo ser observado um tapete íntegro, semelhante ao do controle (Figura 6E e Figura 6F). A maior concentração não tóxica (75  $\mu\text{g/mL}$ ) foi utilizada para o ensaio de

inibição da replicação viral. As duas maiores porcentagens de DMSO avaliadas (0,25 e 0,12%) demonstraram ser tóxicas, e as porcentagens 0,06 e 0,03% não apresentaram citotoxicidade.

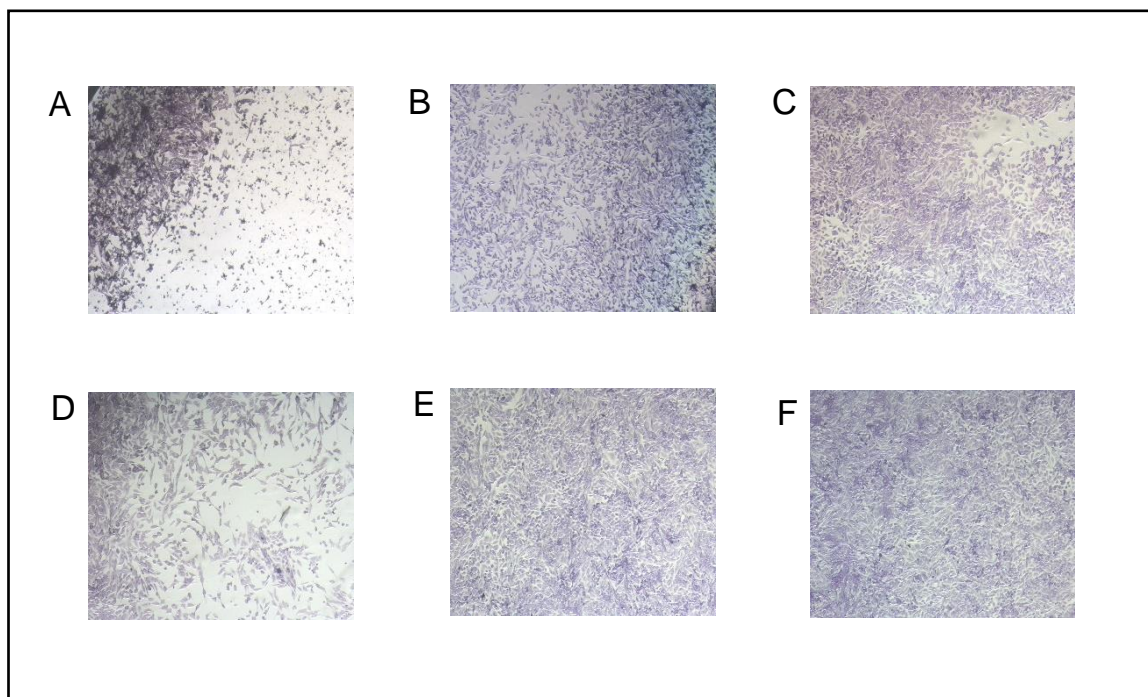


Figura 6. Citotoxicidade dos extratos frente às CRFKs. (A) HCME a 150 µg/mL; (B) HCME a 50 µg/mL; (C) PBEH a 100 µg/mL; (D) PBLI2 a 150 µg/mL; (E) PBLI2 a 50 µg/mL (F) Controle de células;

### 5.3. Quantificação da inibição da replicação viral através de RT-PCR quantitativa (RT-qPCR)

A avaliação qualitativa da inibição da replicação viral foi realizada 5 dias após a inoculação viral, através da visualização de CPE da placa corada, caracterizado por formação de sincício e morte celular. Pôde ser visualizado o aparecimento de células multinucleadas em todos os orifícios contendo os extratos, sendo o HCME de *Hypericum connatum*, o mais semelhante quando comparado ao controle contendo somente células. Quando comparados ao controle viral, todos os extratos apresentaram diminuição visível de CPE.

A quantificação foi realizada através da técnica de RT-qPCR. A curva padrão exhibe quatro diluições de pFIV, de  $10^2$  a  $10^5$  cópias/ $\mu$ L (Figura 7). No controle viral, na ausência de tratamento, foram detectadas aproximadamente 6.500

partículas virais no sobrenadante de cultivo celular infectado pelo FIV. A quantidade de vírus detectada no sobrenadante de cultivo infectado e tratado com o extrato HCME foi 23× menor que o resultado obtido no controle viral. Para o tratamento com o extrato PBEH, a quantificação foi de aproximadamente 5.400 cópias, enquanto que para o extrato PBLI2 detectou-se em torno da metade de partículas virais em relação ao controle de células infectadas sem nenhum tratamento (Tabela 1).

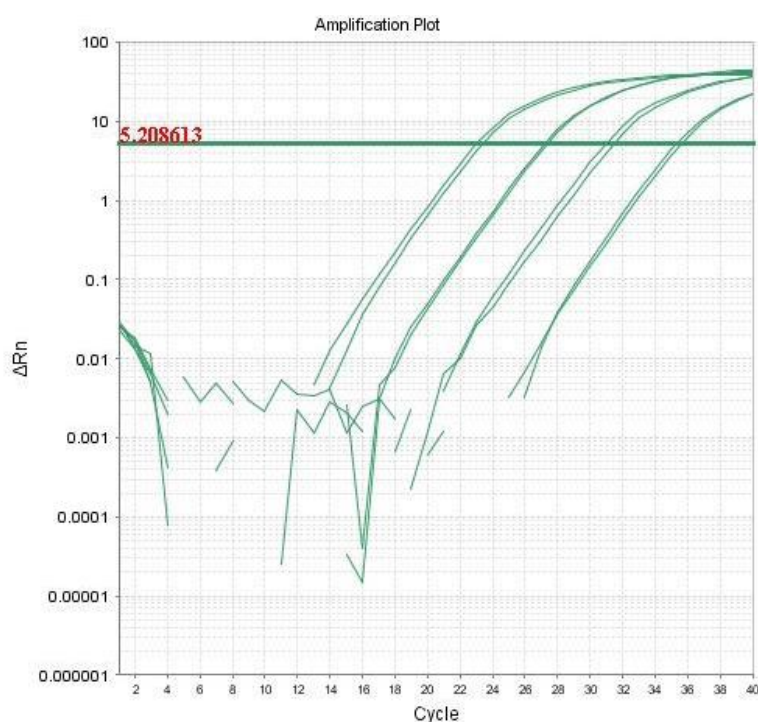


Figura 7. Curva padrão obtida pela PCR em tempo real. Diluições de pFIV de 10<sup>2</sup> a 10<sup>5</sup> cópias/μL.

Tabela 1 – Quantificação das partículas virais da avaliação da atividade antiviral por PCR em tempo real

<b>Extrato</b>	<b>Quantidade de partículas virais</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>CT</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>PBLI2</b>	3072.46	49.33	29.27	0.03
<b>PBEH</b>	5412.94	213.05	28.27	0.07
<b>HCME</b>	273.32	57.04	33.58	0.37
<b>Controle viral</b>	6498.84	183.81	27.95	0.05
<b>Controle de células</b>	-	-	-	-

#### 5.4. Relação efeito-dose do extrato metanólico de *Hypericum connatum*

A avaliação quantitativa da relação efeito-dose de HCME, mostrou, na sua maior concentração, apenas 35 partículas virais, aproximadamente. A medida em que a concentração do extrato diminuía, a tendência era o número de partículas detectado aumentar. A exceção pode ser visualizada na concentração de 6,25 µg/mL, a qual foi detectada uma quantidade maior a encontrada em 3,12 µg/mL. Foi observado um alto desvio padrão entre as duplicatas, possivelmente devido à sensibilidade elevada da técnica, sendo que neste experimento foram pipetados apenas 10 µL da reação por poço. O resultado evidencia uma contínua inibição do extrato de *Hypericum connatum* quando testado em menores concentrações, porém sua maior atividade antiviral se apresentou na concentração de 25 µg/mL (Tabela 2).

Tabela 2 – Quantificação por PCR em tempo real da relação efeito-dose de *Hypericum connatum*

Extrato	Quantidade de partículas virais	Desvio Padrão	CT	Desvio Padrão
25 µg/mL	35.35	10.36	31.05	0.46
12.5 µg/mL	455.91	26.36	27.06	0.09
6.25 µg/mL	10386.85	4002.32	22.27	0.61
3.12 µg/mL	7674.14	838.42	22.69	0.17
Controle viral	380138.88	105890.19	16.67	0.44
Controle de células	1.41	-	36.01	-

## 6. Discussão

O gênero *Hypericum* vêm sendo estudado por diversos autores devido as suas propriedades farmacológicas. Frações do extrato metanólico de *Hypericum Perforatum* demonstraram ação antiviral frente ao citomegalovírus (HCMV) *in vitro* (AXARLIS et al., 1998), assim como frente ao HIV-1 (BIRT et al., 2009). A maior parte dos estudos com *Hypericum* atribuem sua atividade antiviral à hipericina e pseudohipericina, visto que foi verificada frente a vírus de RNA e DNA, envelopados e não envelopados (HUDSON; LOPEZ-BAZZOCCHI; TOWERS, 1991; TANG et al., 1990). Porém, na falta dos mesmos, também pôde ser observado atividade antiviral, podendo ser atribuída a outros compostos, como flavonoides e taninos em *Hypericum connatum* (SCHMITT; RAVAZZOLO; VON POSER, 2001).

Diversos estudos com diferentes classes de cumarinas, composto presente em *Pterocaulon balansae*, o apontaram como tendo importante ação antiviral. Anilnocumarinas demonstraram atividade contra o vírus da hepatite C (HCV). Também foi comprovada atividade antiviral de piranocumarinas frente ao HIV-1 e de análogos de 7-Hidroxycumarinas frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e ao vírus respiratório sincicial (RSV) (HASSAN et al., 2016). GUT-70, um agente antitumoral caracterizado como uma cumarina triciclíca,

demonstrou atividade anti-HIV, através da inibição da entrada do vírus na célula pela redução da fluidez da membrana celular (MATSUDA et al., 2015).

CRFKs são altamente utilizadas em ensaios de soroneutralização, sendo que uma variedade de anticorpos neutralizantes de FIV já foi descrita (SIEBELINK et al., 1995). Não são células propícias à formação de sincícios pela ação do vírus, podendo ser confundidas com a formação natural da própria célula, porém, quando suplementadas com fatores de crescimento, se tornam suscetíveis à formação de sincícios maiores e em maior quantidade (TOZZINI et al., 1992). Neste estudo, além da visualização do efeito citopático nas CRFKs, optou-se pela quantificação de partículas virais através da técnica de PCR em tempo real. A ação de FIV frente às CRFKs, na infecção viral, mostrou formação de grandes sincícios, com núcleos aglomerados no centro do citoplasma, além da característica morte celular (Figura 5). Também foi observada uma pequena formação de sincício no controle de células sem vírus, como já descrito por Tozzini *et al.* (1992).

Os resultados do ensaio de inibição da replicação viral, pela qPCR, demonstraram uma redução em aproximadamente 23 vezes do número de cópias virais quando as células foram tratadas com o extrato metanólico proveniente de *Hypericum connatum* (HCME). Este dado corrobora com o estudo realizado anteriormente pelo grupo de pesquisa (SCHMITT; RAVAZZOLO; VON POSER, 2001), no qual não foi possível visualizar uma banda no gel de agarose na análise de RT-PCR correspondente ao tratamento com o extrato de *Hypericum connatum*, demonstrando sua ação antirretroviral. Hoje, com técnicas mais avançadas de detecção, é possível a quantificação do número de partículas virais, embora a sensibilidade da técnica possa detectar pequenas diferenças de volume (micropipetas), que foram evidenciadas nos altos desvios padrão observados, principalmente quando a qPCR foi realizada em volumes menores (10 µL, Tabela 2). O PBLI2, extrato aquoso liofilizado proveniente de *Pterocaulon balansae*, reduziu aproximadamente pela metade o número de cópias virais. Substâncias isoladas deste composto foram obtidas e serão avaliadas quanto as suas propriedades antivirais frente ao FIV em estudos futuros, assim como serão isoladas substâncias de *Hypericum connatum*. O extrato hexano de *Pterocaulon balansae* não foi capaz de reduzir de maneira

expressiva a quantidade de partículas virais, o que possivelmente se deve à dificuldade na solubilização do extrato. A partir das substâncias isoladas será possível identificar qual ou quais os compostos são ativos contra o vírus.

Na avaliação da relação efeito-dose do extrato metanólico de *Hypericum connatum*, pôde-se observar um aumento no número de partículas virais a medida em que a concentração do mesmo diminuía. Na menor concentração, de 3.12 µg/mL, a redução foi de aproximadamente 50 vezes. Na concentração de 6.25 µg/mL foi observado um valor maior de partículas virais quando comparado a de 3.12 µg/mL. Esta discordância possivelmente está associada a erros de pipetagem, tendo em vista que neste experimento foi utilizado apenas 10 µL de volume da reação, e a técnica de qPCR possui alta sensibilidade.

Substâncias isoladas de *Pterocaulon balansae* foram obtidas para dar continuidade a este projeto. Além destas, também serão avaliadas frações do extrato de *Hypericum connatum* para elucidar o composto ativo anti-FIV. Testes mais específicos podem ser usados para determinar a fase do ciclo viral na qual o composto está agindo. A partir dos resultados encontrados neste trabalho, o extrato metanólico de *Hypericum connatum* demonstrou uma importante ação antiviral e compostos do gênero *Hypericum* são potenciais para a busca de novos tratamentos anti-HIV.



## 7. Referências Bibliográficas

AKEMI, S. et al. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases Virus – host interaction in feline immunodeficiency virus (FIV) infection. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, n. 6, p. 549–557, 2013.

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

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

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

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

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

CHUNG, C. T.; NIEMELA, S. L.; MILLER, R. H.; One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. **Biochemistry**, v. 86, p. 2172-2175, 1989.

DUNHAM, S. P.; GRAHAM, E. Retroviral Infections of Small Animals. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 38, n. 4, p. 879–901, 2008.

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

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

FRITZ, D. **Análise química e avaliação da atividade antiviral de *Hypericum connatum* Lam.** 2006. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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

- GANJHU, R. K. et al. Herbal plants and plant preparations as remedial approach for viral diseases. **VirusDisease**, v. 26, n. 4, p. 225–236, 2015.
- HARTMANN, K.; STENGEL, C. FIV as a Model for HIV Treatment. In: FRIEDMAN, H.; SPECTER, S.; BENDINELLI, M. (Eds.). **In vivo Models of HIV Disease and Control**. Munich: Springer, 2006. p. 333–364.
- HARTMANN, K.; WOODING, A.; BERGMANN, M. Efficacy of Antiviral Drugs against Feline Immunodeficiency Virus. **Veterinary Sciences**, v. 2, n. 4, p. 456–476, 2015.
- HASSAN, M. Z. et al. Therapeutic potential of coumarins as antiviral agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 123, p. 236–255, 2016.
- HOSSEINIPOUR, M. C. et al. Emergence of HIV drug resistance during first- and second-line antiretroviral therapy in resource-limited settings. **Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. SUPPL.2, p. 49–56, 2013.
- HUANG, C. et al. Dual-subtype feline immunodeficiency virus vaccine provides 12 months of protective immunity against heterologous challenge. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, n. 6, p. 451–457, 2010.
- HUANG, J. et al. Antiviral herbs - present and future. **Infectious Disorders - Drug Targets**, v. 14, n. 1, p. 61–73, 2014.
- HUDSON, J. B.; LOPEZ-BAZZOCCHI, I.; TOWERS, G. H. N. Antiviral activities of hypericin. **Antiviral Research**, v. 15, n. 2, p. 101–112, 1991.
- JIANG, Y. et al. Inhibitors from natural products to HIV-1 reverse transcriptase, protease and integrase. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 10, n. 14, p. 1331–44, 2010.
- KENYON, J. C.; LEVER, A. M. L. The molecular biology of feline immunodeficiency virus (FIV). **Viruses**, v. 3, n. 11, p. 2192–2213, 2011.
- KURAPATI, K. R. V. et al. Natural products as Anti-HIV agents and role in HIV-associated neurocognitive disorders (HAND): A brief overview. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. JAN, p. 1–14, 2016.
- LECOLLINET, S.; RICHARDSON, J. Vaccination against the feline immunodeficiency virus: The road not taken. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, n. 2–3, p. 167–190, 2008.
- MATSUDA, K. et al. Inhibition of HIV-1 entry by the tricyclic coumarin GUT-70 through the modification of membrane fluidity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 457, n. 2015, p. 288–294, 2015.
- MCDONNELL, S. J.; SPARGER, E. E.; MURPHY, B. G. Feline immunodeficiency virus latency. **Retrovirology**, v. 10, n. 1, p. 69, 2013.

- MOHAMMADI, H.; BIENZLE, D. Pharmacological inhibition of feline immunodeficiency virus (FIV). **Viruses**, v. 4, n. 5, p. 708–724, 2012.
- MUKHTAR, M. et al. Antiviral potentials of medicinal plants. **Virus Research**, v. 131, n. 2, p. 111–120, 2008.
- PRASAD, S.; TYAGI, A. K. Curcumin and its analogues: a potential natural compound against HIV infection and AIDS. **Food Funct.**, v. 6, n. 11, p. 3412–3419, 2015.
- SAMBROOK, J; FRISCH, E. F; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 2nd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SCHMITT, A. C.; RAVAZZOLO, A. P.; VON POSER, G. L. Investigation of some *Hypericum* species native to Southern of Brazil for antiviral activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 2–3, p. 239–245, 2001.
- SIEBELINK, K. H. J. et al. A determinant of feline immunodeficiency virus involved in Crandell feline kidney cell tropism. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 46, n. 1–2, p. 61–69, 1995.
- SILVEIRA, C. S. et al. In vitro cytotoxic, antioxidant and antiviral effects of *Pterocaulon alopecuroides* and *Bidens segetum* extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2 A, p. 343–348, 2009.
- STICKNEY, A. L.; DUNOWSKA, M.; CAVE, N. J. Sequence variation of the feline immunodeficiency virus genome and its clinical relevance. **Veterinary Record**, v. 172, n. 23, p. 607–614, 2013.
- TANG, J. et al. Virucidal activity of hypericin against enveloped and non-enveloped DNA and RNA viruses. **Antiviral Research**, v. 13, n. 6, p. 313–325, 1990.
- TEIXEIRA, B. M.; JUNIOR, A. R.; HAGIWARA, M. K. Vírus da imunodeficiência felina - uma atualização Vírus da imunodeficiência felina - uma atualização. **Clínica Veterinária**, v. 88, p. 54–66, 2010.
- THERMO FISHER. **DNA Copy Number and Dilution Calculator**. 2017. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/dna-copy-number-calculator.html>>. Acesso em: 16 dez. 2017.
- TOZZINI, F. et al. Simple in vitro methods for titrating Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and FIV neutralizing antibodies. **Journal of Virological Methods**, v. 37, n. 3, p. 241–252, 1992.
- VENUGOPALA, K. N.; RASHMI, V.; ODHAV, B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. **BioMed Research International**, v. 2013, n. Table 1, p. 14, 2013.

VERA, N. et al. New coumarins from *Pterocaulon polystachyum*. **Planta Medica**, v. 67, n. 7, p. 674–677, 2001.

## ANEXO

### **A) Coloração de células pelo método May-Grünwald-Giemsa (MGG)**

- a. Corante azul de metileno-eosina foi adicionado aos orifícios contendo células e deixado por 3 minutos. Transcorrido este tempo, acrescentou-se o mesmo volume de água;
- b. Após 3 minutos, as células foram lavadas com água corrente, e aos mesmos orifícios, foi adicionado corante Giemsa a 5%;
- c. Após 12 minutos, as células foram lavadas com água corrente.