



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
LABORATÓRIO DE VIROLOGIA APLICADA



LAURITA BOFF

**POTENCIAL AÇÃO ANTIVIRAL E CITOTÓXICA DE NOVOS
DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DE CARDENOLÍDEOS**

Florianópolis

2020

Laurita Boff

**POTENCIAL AÇÃO ANTIVIRAL E CITOTÓXICA DE NOVOS DERIVADOS
SEMISSINTÉTICOS DE CARDENOLÍDEOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Farmácia.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Maria Oliveira Simões

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Boff, Laurita
POTENCIAL AÇÃO ANTIVIRAL E CITOTÓXICA DE NOVOS DERIVADOS
SEMISSINTÉTICOS DE CARDENOLÍDEOS / Laurita Boff ;
orientador, Cláudia Maria Oliveira Simões, 2020.
120 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Cardenolídeos semissintéticos. 3.
efeitos citotóxicos. 4. anti-herpes. 5. anti-influenza. I.
Simões, Cláudia Maria Oliveira. II. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.
III. Título.

Laurita Boff

**AVALIAÇÃO DA POTENCIAL AÇÃO ANTIVIRAL E CITOTÓXICA DE NOVOS
DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DE CARDENOLÍDEOS**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Dr.^a Thaís Cristine Marques Sincero

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto

Universidade Federal de Santa Catarina

Dr.^a Aline da Rocha Matos

Fundação Oswaldo Cruz

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Farmácia.

Prof.^a Dr.^a Elenara Maria Teixeira Lemos Senna

Coordenadora do Programa

Prof.^a Dr.^a Claudia Maria Oliveira Simões

Orientadora

Florianópolis, 12 de março de 2020.

Dedico este trabalho aos meus pais, Lauri e Beatriz, à minha irmã Lizandra e minha nona Angela.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar, iluminar e dar sabedoria para seguir sempre em frente.

Aos meus pais, Lauri e Beatriz, por me incentivarem a buscar meus objetivos, pela educação que me proporcionaram, pelo apoio, amor e compreensão.

À minha irmã Lizandra e minha nona Angela, por estarem sempre torcendo pelas minhas conquistas, pela amizade, companheirismo e carinho incondicional.

À minha querida orientadora Professora Cláudia Maria Oliveira Simões, pela amizade, motivação, apoio, incentivo, pelo imenso aprendizado propiciado, fundamentais não apenas para a minha formação acadêmica e profissional, mas também pessoal.

Aos Professores Fernão Castro Braga, Ricardo José Alves e Rodrigo Maia de Pádua (UFMG) e ao Professor Wolfgang Kreis e Dra. Jennifer Munkert (Universidade de Erlangen-Nuremberg, Alemanha), por terem gentilmente cedido as amostras que foram aqui testadas.

Ao Instituto de Virologia Molecular da Universidade de Münster – Alemanha, por terem me acolhido e propiciado o aprendizado de uma nova rotina laboratorial em outro país. Em especial, ao meu supervisor Dr. André Schreiber e ao orientador Professor Stephan Ludwig por todo o suporte. *Vielen dank!*

Às minhas amigas e colegas brasileiras que a Alemanha me presenteou, Aline da Rocha Matos e Juliana Del Sarto, pelos valiosos ensinamentos, conversas, risadas e pelo apoio durante a realização do meu estágio de doutorado sanduíche.

À minha querida amiga Naira Fernanda Zanchett Schneider, que acompanhou de perto minha trajetória, estando presente em todos os momentos, bons ou ruins, me ajudando e aconselhando.

Não menos importante, a todos os meus amigos do Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) pela excelente convivência diária. Registro aqui meu muito obrigada para Ariadne, Camila, Clarissa, Débora, Dóris, Elisabet, Gislaine, Izabella, Lara, Lucas Abu, Paula, Thiago, Talitha, Vanessa e Vitor.

Aos membros da banca examinadora pelas pertinentes contribuições, as quais melhoraram significativamente a qualidade deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas e pelo apoio financeiro, à Universidade Federal de Santa

Catarina (UFSC) e ao Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) pela infraestrutura disponibilizada para a realização deste trabalho.

Estendo meus agradecimentos a todos que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento e conclusão desta Tese.

RESUMO

Nos últimos anos, novas possibilidades terapêuticas foram apresentadas para os cardenolídeos, amplamente utilizados como agentes inotrópicos positivos, tais como os efeitos antivirais, citotóxicos e antitumorais. Nesse sentido, com o objetivo de contribuir para o aumento do conhecimento sobre este tema, 16 novos derivados de cardenolídeos foram obtidos a partir da digitoxigenina e foram submetidos às triagens citotóxica, anti-herpética e anti-influenza. Como resultado das três triagens, dois compostos: **C10** { 3β -[(N-(2-hidroxi)etil)aminoacetil]amino-3-deoxidigitoxigenina} e **C11** { 3β -(hidroxiacetil)amino-3-deoxidigitoxigenina}, destacaram-se por suas potentes ações e foram selecionados para a elucidação dos mecanismos das ações anti-herpética, anti-influenza e citotóxica, utilizando diferentes estratégias metodológicas. Na primeira abordagem, **C10** e **C11** interferiram, principalmente, nas etapas intermediárias e finais da replicação do HSV, ou seja, na replicação do DNA viral [HSV-1 (cepa KOS)] por inibirem completamente a expressão das proteínas (β) UL42 e (γ) gD e, parcialmente, da proteína (α) ICP27; além de interferirem na montagem e na liberação das novas partículas virais e reduzirem, quase que totalmente, a propagação intercelular viral [HSV-1 (cepas KOS e 29-R) e HSV-2 (cepa 333)]. Esses compostos não apresentaram efeitos profiláticos em relação aos HSV-1 e HSV-2, não inativaram diretamente esses vírus, e não interferiram nas etapas iniciais da replicação (adsorção, pós-adsorção e penetração viral). Em relação aos vírus influenza, **C10** e **C11** apresentaram efeitos anti-influenza, especialmente para os vírus do tipo A [cepa A/WSN/33(H1N1)] por reduzirem a expressão das proteínas virais (PB1, NP e NS1) nos estágios iniciais do ciclo de replicação, a transcrição do RNA e, conseqüentemente, a síntese de novas proteínas virais. Tal ação foi devida à interferência na montagem do complexo da polimerase viral, resultando em uma atividade enzimática deficiente e, portanto, reduzindo a replicação viral. Ainda, esses compostos (especialmente **C10**) reduziram, de forma significativa, a replicação dos vírus influenza do tipo A [cepa A/Panama/2007/1999 (H3N2)] em um relevante modelo *ex vivo* de pulmão humano isento de células tumorais, confirmando os resultados obtidos *in vitro*. Quanto aos efeitos citotóxicos, apenas o **C10** foi selecionado para a investigação do mecanismo de morte por ele causado, em células não pequenas de pulmão humano H460. Esse composto induziu um aumento significativo dessas células na fase subG1 do ciclo celular, assim como das células apoptóticas precoces e tardias por meio da externalização da fosfatidilserina, e dos núcleos pequenos e irregulares; característico de apoptose. Tal morte celular foi confirmada pelo ensaio das caspases-3/7. O **C10** também reduziu o potencial proliferativo a longo prazo e induziu uma diminuição significativa, tanto da área quanto da viabilidade celular no modelo tridimensional de tumor (esferoides). Ainda, **C10** e **C11** apresentaram os maiores potenciais de inibição da Na^+/K^+ -ATPase, sendo que tal potencial se correlaciona adequadamente com as bioatividades demonstradas para esses compostos contra as diferentes células tumorais humanas testadas, bem como contra a replicação dos HSV tipos 1 e 2 e dos vírus influenza. Nesse contexto, os compostos **C10** e **C11** podem ser considerados candidatos promissores a serem explorados na pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antivirais e quimioterápicos.

Palavras-chave: Cardenolídeos semissintéticos; efeitos citotóxicos; anti-herpes; anti-influenza; mecanismo de ação.

ABSTRACT

In recent years, new therapeutic possibilities were proposed for cardenolides traditionally used to treat heart diseases, such as anticancer and antiviral activities. In this sense, 16 new cardenolide digitoxigenin-derivatives were obtained, and submitted to cytotoxic, anti-herpes and anti-influenza screenings. Two derivatives emerged as the most promising compounds from these screenings: **C10** { 3β -[(*N*-(2-hydroxyethyl)aminoacetyl)amino-3-deoxydigitoxigenin]} and **C11** { 3β -(hydroxyacetyl)amino-3-deoxydigitoxigenin}. They were selected to have their mechanism of anti-HSV, anti-influenza and cytotoxic actions elucidated by using different methodological strategies. In the first approach, the results demonstrated that **C10** and **C11** interfere with the intermediate and final steps of HSV replication that is the viral DNA replication [HSV-1 (KOS strain)] by completely abolishing the expression of (β) U_L42 and (γ) gD proteins, and partially reducing that of (α) ICP27; as well as with the assembly and release of new virions, and with cell to cell spread [HSV-1 (KOS and strains 29 -R) and HSV-2 (strain 333)]. Additionally, they were not virucidal, had no HSV-1 and HSV-2 prophylactic effects, and did not interfere with the early stages of viral replication (adsorption, post-adsorption and penetration). Regarding the anti-influenza effects, **C10** and **C11** showed anti-influenza A [strain A/WSN/33(H1N1)] virus activity by reducing the expression of viral proteins (PB1, NP and NS1) at the earlier stages of replication cycle, the RNA transcription and, consequently, the synthesis of new viral proteins. Such antiviral action occurred due to the interference in the assembly of viral polymerase resulting in a deficient enzymatic activity and, therefore, reducing viral replication. Attesting all these results obtained *in vitro*, a clinically relevant model of influenza infection by using *ex vivo* human tumor-free lung tissues confirmed the potential of these compounds, especially **C10**, by reducing influenza virus A [strain A/Panama/2007/1999 (H3N2)] replication. Concerning the cytotoxic effects, only **C10** was selected to investigate the mechanism by which cytotoxicity was induced on non-small human lung cells H460. This compound induced a significant increase of H460 cells in subG1, as well as in the number of early and late apoptotic cells, and the small and irregular nuclei; which are characteristics of apoptosis. This type of cell death was confirmed by caspases 3/7 assay. **C10** also reduced H460 cells proliferative potential by long-term action and significantly decreased the area and viability of H460 spheroids. In addition, **C10** and **C11** showed the highest ability to inhibit Na⁺/K⁺-ATPase, and such inhibition rate correlates suitably with the bioactivities demonstrated by both compounds against the different human cancer cells tested as well as against HSV types 1 and 2, and influenza virus replication. In this context, they can be considered promising compounds to be explored in the research and development of new antiviral and chemotherapeutic agents.

Keywords: Semisynthetic cardenolides; cytotoxic effects; anti-herpes; anti-influenza; mechanism of action.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Estrutura básica de um cardenólídeo.....	22
Figura 3.1 – Estrutura da partícula viral dos HSV.....	36
Figura 3.2 – Ciclo de replicação dos HSV.....	38
Figura 4.1 – Estrutura da partícula viral dos vírus influenza.....	46
Figura 4.2 – Ciclo de replicação dos vírus influenza do tipo A.....	49
Figura 5.1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2020 por sexo.....	53

DISCUSSÃO GERAL

Figura 1 – Estruturas químicas dos compostos C10 e C11	108
Figura 2 – Proposta do mecanismo de morte celular induzida pelo composto C10 em células não pequenas de pulmão humano H460.....	111
Figura 3 – Proposta do mecanismo da ação anti-HSV-1 e anti-HSV-2 dos compostos C10 e C11	113
Figura 4 – Proposta do mecanismo da ação anti-influenza dos compostos C10 e C11	114

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1 – Classificação geral dos herpes vírus humanos.....	32
Quadro 3.2 – Propriedades biológicas das subfamílias α , β e γ - <i>Herpesvirinae</i>	33
Quadro 3.3 – Estruturas químicas dos fármacos anti-herpéticos disponíveis e seus alvos moleculares.....	43
Quadro 4.1 – Principais proteínas expressas pelos vírus influenza e suas funções.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 6.1 – Resultados da avaliação da citotoxicidade de cardenolídeos semissintéticos em células Vero e da atividade anti-Zika	103
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-*O*-S-HS: 3-*O*-sulfato de heparana sulfatado

A549: linhagem de células tumorais humanas de pulmão do tipo não-pequenas

ABTS: ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

CC₅₀: concentração de cada amostra que reduz em 50% a viabilidade celular

CI₅₀: concentração de cada amostra que inibe 50% da infecção viral

CMC: carboximetilcelulose

CON: convalatoxina

DGX: digitoxigenina monodigitoxosídeo

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EC₅₀: concentração de cada amostra que reduz em 50% a concentração inicial do radical ABTS ou DPPH

FGF-2: fator de crescimento de fibroblastos-2

GEV: glucoevatromonosídeo

GISRS: Sistema Global de Vigilância e Resposta à Gripe

H460: linhagem de células de carcinoma de efusão pleural humano

HA: hemaglutinina

HCT-8: linhagem de células de adenocarcinoma ileocecal humano

HGF: linhagem de células de fibroblastos de gengiva humano

HIV: vírus da imunodeficiência humana

HSV: Herpes Simplex Virus

HSV-1: Herpes Simplex Virus tipo 1

HSV-2: Herpes Simplex Virus tipo 2

HVEM: *Herpesvirus Entry Mediator*

INCA: Instituto Nacional de Câncer

IS: índice de seletividade

LPS: lipopolissacarídeo

MDCK: linhagem de células de rim canino Madin-Darby

RAW 264.7: linhagem de células de macrófagos murinos

Vero: linhagem de células de rim de macaco verde africano

vhs: virion host shutoff

VI: vírus influenza

VIA: vírus influenza do tipo A

VIB: vírus influenza do tipo B

VIC: vírus influenza do tipo C

VID: vírus influenza do tipo D

LNCaP: linhagem de células de adenocarcinoma de próstata humana andrógeno sensíveis

MRC-5: linhagem de células de fibroblastos fetais de pulmão humano

MS: Ministério da Saúde

NA: neuraminidase

NP: nucleoproteína

NS2: proteína não estrutural 2

NSCLC: câncer de pulmão de células não pequenas

NSP: proteínas de exportação nuclear

OMS: Organização Mundial da Saúde

P&D: Pesquisa & Desenvolvimento

PA: polimerase ácida

PB1: polimerase básica 1

PB2: polimerase básica 2

PC3: linhagem de células de adenocarcinoma prostático humano não sensível a hormônios

RNPs: ribonucleoproteínas

SCLC: câncer de pulmão de células pequenas

THP-1: linhagem de células de leucemina monocítica

U937: linhagem de células de leucemia mieloide aguda

UFP: unidades formadoras de placas de lise

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	17
OBJETIVO GERAL.....	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
1. COMPOSTOS DE ORIGEM NATURAL.....	21
2. CARDENOLÍDEOS.....	22
2.1 Estrutura química.....	22
2.2 Emprego terapêutico.....	23
2.3 Mecanismo da ação cardiotônica.....	23
2.4 Outras atividades farmacológicas.....	24
2.4.1 Potenciais efeitos antivirais.....	24
2.4.2 Potenciais efeitos citotóxicos e antitumorais.....	26
3. VÍRUS HERPÉTICOS.....	31
3.1 Herpes Simplex Vírus (HSV) dos tipos 1 e 2.....	33
3.1.1 Epidemiologia.....	34
3.1.2 Estrutura dos HSV.....	35
3.1.3 Ciclo de replicação viral.....	36
3.1.4 Terapia anti-herpética.....	42
4. VÍRUS INFLUENZA.....	43
4.1 Epidemiologia.....	44
4.2 Classificação e estrutura dos vírus influenza	45
4.3 Ciclo de replicação dos vírus influenza	48
4.4 Controle e terapia anti-influenza.....	50
5. CÂNCER.....	51
5.1 Informações gerais.....	51
5.2 Epidemiologia.....	52
5.3 Câncer de pulmão.....	53
REFERÊNCIAS DO CAPÍTULO 1.....	56
CAPÍTULO 2 - POTENCIAL AÇÃO ANTI-HERPES E ANTITUMORAL DE NOVOS DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DA DIGITOXIGENINA.....	67
APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO 1.....	67
CAPÍTULO 3 - INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE DOIS NOVOS ANÁLOGOS DA DIGITOXIGENINA (C10 E C11) EM CÉLULAS DE CÂNCER DE PULMÃO H460	68
APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO 2.....	68

CAPÍTULO 4 – ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTI-HERPES DE DOIS NOVOS DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS (C10 E C11) DE CARDENOLÍDEOS.....	69
APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO 3.....	69
CAPÍTULO 5 – DOIS NOVOS CARDENOLÍDEOS SEMISSINTÉTICOS (C10 E C11) QUE ATUAM COMO INIBIDORES DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO POLIMERASE DO VÍRUS INFLUENZA.....	70
APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO 4.....	70
CAPÍTULO 6 - ATIVIDADES ANTIVIRAL, ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DOS COMPOSTOS C10 E C11.....	101
6. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO.....	101
6.1 Avaliação da potencial atividade antiviral.....	101
6.1.1 Norovírus.....	101
6.1.1.1 Metodologia.....	101
6.1.1.2 Resultados.....	102
6.1.2 Vírus Zika.....	102
6.1.2.1 Metodologia.....	102
6.1.2.2 Resultados.....	103
6.2 Avaliação do potencial antioxidante.....	103
6.2.1 Ensaio com o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).....	103
6.2.2 Ensaio com o radical ABTS [ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)].....	104
6.2.2.1 Resultados.....	104
6.3 Avaliação da potencial atividade anti-inflamatória.....	104
REFERÊNCIAS DO CAPÍTULO 6.....	106
DISCUSSÃO GERAL.....	107
CONCLUSÕES.....	119

INTRODUÇÃO

Os compostos de origem natural possuem grande importância na P&D (Pesquisa & Desenvolvimento) de novos fármacos utilizados no tratamento das mais diversas doenças, incluindo as de origem microbiana e parasitária, diferentes tipos de câncer, e para controle dos níveis sanguíneos de lipídios (BUTLER; NEWMAN, 2008). Além disso, eles são frequentemente utilizados como modelos para a síntese e/ou semissíntese de derivados, que é uma ferramenta extremamente útil para tal fim (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Os cardenolídeos são heterosídeos cardioativos encontrados, especialmente, em algumas espécies vegetais (RATES et al., 2017). Eles têm sido utilizados para tratar doenças cardíacas há mais de 200 anos (BESSEN, 1986), e são caracterizados por sua alta especificidade e poderosa ação cardiotônica. O mecanismo dos efeitos cardiotônicos ocorre pela inibição da Na^+/K^+ -ATPase, responsável por regular os níveis dos íons Na^+ e K^+ , que promovem a contração do músculo cardíaco (CLAUSEN, 1998).

Apesar da ampla utilização dos cardenolídeos como agentes inotrópicos positivos, a investigação dos efeitos desses compostos em outras patologias se intensificou nos últimos anos, apresentando novas possibilidades terapêuticas (PRASSAS; DIAMANDIS, 2008).

Uma dessas possibilidades é a potencial ação anticâncer, conforme pode-se constatar em revisões recentes (entre outras: CERELLA; DICATO; DIEDERICH, 2013; DE et al., 2016; DIEDERICH; MULLER; CERELLA, 2017; SCHNEIDER et al., 2017b; EL-SEEDI et al., 2019).

Outra possibilidade sugerida é a sua potencial ação antiviral (entre outras: SU et al., 2008; BERTOL et al., 2011; CAI et al., 2014; GARDNER et al., 2015; ASHBROOK et al., 2016; GROSSO et al., 2017; NORRIS et al., 2018; WONG et al., 2018); porém, há necessidade de complementar os estudos já relatados na literatura.

O câncer é uma doença global, sendo a segunda principal causa de morte no mundo. Somente em 2018, foi responsável por cerca de 9,6 milhões de mortes (WHO, 2020a). O

tratamento do câncer depende de vários fatores, os quais geralmente estão relacionados ao estágio da doença e às características do tumor. Dentre os diferentes tipos de câncer existentes, destaca-se o de pulmão devido à sua agressividade. A alta letalidade e incidência desse câncer reforçam a necessidade imediata de renovação terapêutica, considerando que o arsenal disponível ainda não é capaz de estender significativamente a sobrevivência do paciente, após seu diagnóstico. Vários fármacos quimioterápicos atualmente disponíveis são derivados de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Com base na estratégia de P&D de novos fármacos a partir de produtos naturais, podemos citar os estudos realizados com os cardenolídeos, que dispõem de histórico de uso, de recentes e numerosas comprovações *in vitro* e de dados clínicos sobre seu potencial antitumoral, fazendo com que as pesquisas dos mesmos para este fim continuem a ser estimuladas e desenvolvidas.

Além do câncer, algumas das mais importantes doenças humanas são de origem viral, como as causadas pelo Herpes Simplex Virus (HSV-1 e HSV-2), responsáveis por lesões orais, esofágicas, genitais e retais (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013); e aquelas pelos vírus influenza (VI), que causam doença respiratória, na maioria dos casos branda, mas com potencial de ser grave e contagiosa (CDC, 2020).

Estima-se que 60-95% da população mundial adulta esteja infectada por, pelo menos, um dos tipos de HSV. Esses vírus causam infecções agudas e recorrentes, e estão relacionados com um aumento na transmissão efetiva do HIV (GUPTA; WARREN; WALD, 2007; KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014; MCALLISTER; SCHLEISS, 2014).

Os VI são responsáveis por epidemias anuais e pandemias intermitentes, que acometem milhares de pessoas no mundo todo (LULIANO et al., 2018; CDC, 2020).

Sendo assim, ambos os vírus constituem um grave problema de saúde pública. O arsenal terapêutico antiviral hoje disponível é reduzido e carece de fármacos para combater algumas infecções virais, para as quais não existem, ainda, fármacos para combatê-las (como por exemplo, infecções causadas pelo norovírus e pelo vírus Zika), ou para as quais os vírus tornaram-se resistentes aos fármacos existentes (como por exemplo, infecções causadas pelos HSV e VI). Desta forma, novas terapias antivirais são necessárias, sejam elas individuais ou combinadas, com o intuito de melhorar a eficácia e prevenir o surgimento de resistência, por meio da utilização de novos agentes antivirais, que apresentem efeitos adversos mínimos e que funcionem por diferentes mecanismos de ação.

Diante do exposto, constata-se a importância de continuar os estudos com cardenolídeos, já que os mesmos demonstraram potenciais atividades antiviral e antitumoral.

Esta Tese de Doutorado foi dividida em seis capítulos.

O **Capítulo 1** apresenta a revisão bibliográfica sobre o tema.

No **Capítulo 2** estão descritos os resultados relativos às triagens anti-herpética e citotóxica de 16 novos derivados semissintéticos da digitoxigenina, na forma de um artigo já publicado.

No **Capítulo 3** estão apresentados, na forma de um artigo já publicado, os resultados relativos à elucidação do mecanismo da ação citotóxica de um derivado semissintético da digitoxigenina (**C10**), que se destacou por sua ação promissora na etapa de triagem.

No **Capítulo 4** estão apresentados, na forma de um artigo, os resultados relativos à elucidação do mecanismo da ação anti-herpética dos dois derivados semissintéticos da digitoxigenina, que se mostraram mais ativos na etapa de triagem (**C10** e **C11**), já aceito para publicação.

No **Capítulo 5** estão apresentados, na forma de um artigo, a triagem anti-influenza dos 16 compostos citados acima e os resultados relativos à elucidação do mecanismo da ação dos mesmos dois derivados (**C10** e **C11**), que se mostraram mais ativos na etapa de triagem, submetido à avaliação.

No **Capítulo 6** estão apresentados, de forma resumida, outros experimentos realizados, com ênfase em outras atividades farmacológicas, tais como as ações antiviral (anti-norovírus e anti-Zika), anti-inflamatória e antioxidante.

Para finalizar, estão apresentadas a **Discussão geral** desta tese e suas **Conclusões**.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar as atividades antiviral e citotóxica de 16 novos derivados semissintéticos de cardenolídeos.

Objetivos Específicos

Em relação ao estudo da ação antiviral:

- Realizar a triagem antiviral dos novos derivados semissintéticos de cardenolídeos frente aos vírus HSV-1 [cepas KOS (sensível ao aciclovir) e 29-R (resistente ao aciclovir)], HSV-2 (cepa 333), vírus influenza do tipo A [cepas A/WSN/33 (H1N1), A/Hamburg/04/2009 (H1N1pdm09), A/Seal/Mass/1-SC35M/80 (H7N7) (SC35M) e A/Panama/2007/1999 (H3N2)], vírus influenza do tipo B (cepa B/Lee/40), norovírus murino tipo 1 (cepa NVM-1) e vírus Zika (isolado clínico);
- Selecionar, com base nos resultados obtidos nestas triagens, o(s) derivado(s) mais ativo(s);
- Elucidar o(s) mecanismo(s) de ação antiviral do(s) derivado(s) mais ativo(s), por meio de diferentes estratégias metodológicas.

Em relação à triagem citotóxica frente a diferentes células tumorais humanas:

- Realizar a triagem citotóxica dos novos derivados semissintéticos de cardenolídeos frente a cinco diferentes linhagens celulares tumorais humanas: PC3, A549, HCT-8, LNCaP e H460;
- Avaliar a seletividade dos derivados testando-os também frente a duas linhagens celulares não tumorais humanas (MRC-5 e HGF);
- Selecionar a linhagem celular tumoral mais sensível à ação desses derivados;
- Selecionar, com base nos resultados obtidos nestas triagens, o(s) derivado(s) mais ativo(s);
- Investigar o(s) mecanismo(s) de ação citotóxica do(s) derivado(s) mais ativo(s), frente a linhagem celular tumoral mais sensível, por meio de diferentes estratégias metodológicas.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 COMPOSTOS DE ORIGEM NATURAL

Desde sempre, as plantas, os animais e os micro-organismos exercem um importante papel para a evolução da humanidade. Os seres humanos utilizam produtos de origem natural, muitas vezes por meio da medicina tradicional, para melhorar sua qualidade de vida e combater doenças. Esses produtos possuem uma diversidade estrutural e complexidade únicas, e por isso, originaram e continuam a dar origem a inúmeros compostos/fármacos com potencial atividade biológica e/ou farmacológica (NEWMAN; CRAGG, 2007; LEE, 2010; BUTLER; ROBERTSON; COOPER, 2014; AZAB; NASSAR; AZAB, 2016; NEWMAN; CRAGG, 2016; XU et al., 2016; BERTELLI et al., 2019).

No período de 2005 a 2010, foram introduzidos no mercado farmacêutico mundial 39 fármacos derivados, direta ou indiretamente, de substâncias de origem natural para o tratamento das mais diversas patologias (NEWMAN; CRAGG, 2012). De 2010 a 2013, foram 17 (BUTLER; ROBERTSON; COOPER, 2014); e somente no ano de 2014 foram introduzidos 10 novos fármacos também derivados de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2016). Dados mais atualizados mostraram que nos anos de 2015 a 2019 foram introduzidos 42 novos fármacos de origem natural (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Apesar dos avanços da química orgânica sintética, em muitos casos, ainda se depende de fontes naturais para a obtenção de vários fármacos importantes, tais como morfina, artemisinina, quinina e digoxina (KREIS, 2017). Portanto, a síntese ou semissíntese de novos fármacos com diversas ações farmacológicas devem ser estimuladas para que os profissionais da saúde tenham à sua disposição medicamentos eficazes, com reduzida toxicidade e de qualidade para o tratamento de seus pacientes.

Dentre os inúmeros metabólitos secundários bioativos podem-se citar os heterosídeos cardioativos encontrados, especialmente, em algumas espécies vegetais, mas também no reino

animal (anfíbios, lepidópteros, besouros e mamíferos) (RATES et al., 2017), e que são o objeto de estudo desta Tese.

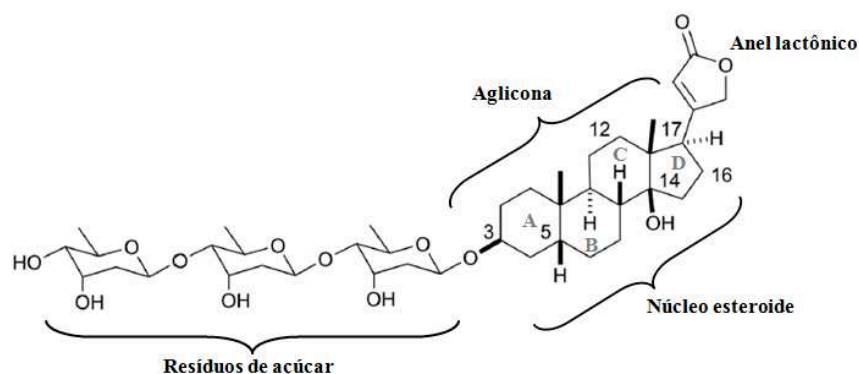
2 CARDENOLÍDEOS

Os cardenolídeos fazem parte do grupo dos heterosídeos cardioativos encontrados em algumas famílias vegetais, tais como Apocynaceae (*Nerium oleander* L.) e Plantaginaceae (*Digitalis lanata* Ehrh. e *D. purpurea* L.), bem como em animais (hipotálamo bovino) (TYMIAK et al., 1993). Existem estudos relatando que os humanos também são capazes de produzir substâncias endógenas semelhantes à ouabaína (HAMLYN et al., 1991) e digoxina (GOTO et al., 1990).

2.1 Estrutura química

Com relação à estrutura química, os heterosídeos cardioativos apresentam um núcleo esteroidal com quatro anéis (A, B, C e D) e um anel lactônico insaturado na posição C-17 β (porção aglicona), além de uma porção açúcar ligada ao C-3. A natureza da lactona na posição C-17 β divide-os em dois subgrupos: cardenolídeos (anel γ -butirolactona- α,β -insaturado pentagonal) e bufadienolídeos (anel 2-pirona $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -di-insaturado hexagonal). Nos cardenolídeos, os anéis A/B e C/D apresentam-se na conformação *cis*, enquanto os anéis B/C encontram-se fusionados na conformação *trans* (RATES et al., 2017). A Figura 2.1 mostra o esqueleto básico dos cardenolídeos.

Figura 2.1 – Estrutura básica de um cardenolídeo.



Fonte: adaptado de MICHALAK; MICHALAK e WICHA (2017).

Uma grande variedade de açúcares pode estar ligada à porção aglicona dos cardenolídeos, mais especificamente no C-3. Os açúcares mais comuns são digitoxose, oleandrose, diginose,

frutose, ramnose e glicose. Embora a ligação dos açúcares ao núcleo esteroidal não seja responsável pela atividade cardiotônica dos cardenolídeos, ela afeta a farmacodinâmica e a farmacocinética dessa classe de compostos. Por exemplo, as agliconas são absorvidas mais rapidamente, armazenadas em maior extensão no sistema nervoso central e metabolizadas mais facilmente que os cardenolídeos glicosilados. No entanto, a presença dos açúcares confere maior solubilidade, fator importante na distribuição dessas moléculas pelo corpo; e a conformação estereoquímica dos açúcares influencia a afinidade da ligação pelo sítio ligante da proteína receptora (RATES et al., 2017).

2.2 Emprego terapêutico

Os cardenolídeos têm sido utilizados no tratamento de doenças cardíacas há mais de 200 anos (BESSEN, 1986). Eles são caracterizados por sua alta especificidade e poderosa ação cardiotônica. Por isso, são utilizados para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva, e controle da taxa de resposta ventricular em pacientes com fibrilação arterial crônica (RHODE; FUCHS, 2010). Os cardenolídeos mais conhecidos são digoxina, digitoxina, digitoxigenina, lanatosídeo C e ouabaína; e do ponto de vista terapêutico, os mais importantes são digoxina e digitoxina (PONGRAKHANANON, 2013).

2.3 Mecanismo da ação cardiotônica

Os glicosídeos cardiotônicos aumentam o débito cardíaco, melhoram o retorno venoso e diminuem a resistência à ejeção. O débito renal e a diurese aumentam, o consumo de oxigênio diminui, e a frequência cardíaca é retardada. Eles exercem ação inotrópica positiva sobre o músculo cardíaco, aumentando sua força contrátil (RATES et al., 2017).

Os efeitos inotrópicos ocorrem por meio de uma ligação específica e com alta afinidade à subunidade alfa da enzima Na^+/K^+ -ATPase, que é envolvida no mecanismo da bomba Na^+/K^+ . Com a inibição desta bomba, os níveis de Na^+ no interior dos miócitos aumentam, ao contrário do que acontece com os íons K^+ , que são expelidos da célula, sendo que esta troca iônica ocorre por meio do gasto de moléculas de ATP. O aumento intracelular dos íons Na^+ modula a atividade de um carreador de membrana, envolvido nas trocas do íon Ca^{2+} por íons Na^+ , promovendo o aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} , por influxo ou mobilização dos reservatórios sarcoplasmáticos. Tal elevação da concentração intracelular dos íons Ca^{2+} resulta

no aumento da força contrátil cardíaca, pois o Ca^{2+} fica disponível para as proteínas contráteis (CLAUSEN, 1998).

No coração relaxado, a tropomiosina oculta o local de ligação da miosina por meio de um bloqueio estérico. Quando o músculo cardíaco se contrai, o Ca^{2+} interage com a troponina, resultando em uma mudança conformacional da tropomiosina. Isto acaba revelando o local de ligação da miosina e permite a formação do complexo actina-miosina, induzindo a contração miocárdica dependente de ATP. Portanto, o aumento nos níveis intracelulares de Ca^{2+} desencadeado pelos cardenolídeos causa um aumento no tônus muscular e no volume de sangue circulante por minuto, reduzindo a frequência cardíaca e o volume sistólico (RAHIMTOOLA; TAK, 1996; RATES et al., 2017).

2.4 Outras atividades farmacológicas

Apesar da ampla utilização dos cardenolídeos como agentes inotrópicos positivos, a investigação dos efeitos desses compostos em outras situações patológicas se intensificou nos últimos anos, apresentando novas possibilidades terapêuticas (PRASSAS; DIAMANDIS, 2008).

Entre essas possibilidades, pode-se citar os efeitos antiartríticos (LIU et al., 2018), anti-inflamatórios (ZEITLIN et al., 2017), antiprotozoários (HOOPES et al., 2018), anti-oxidantes e anti-envelhecimento (XU et al., 2017), além dos efeitos antivirais, citotóxicos e antitumorais, cujo estado da arte será apresentado abaixo, pois são objetivos desta Tese.

2.4.1 Potenciais efeitos antivirais

Em relação à potencial atividade antiviral, os estudos com cardenolídeos naturais e semissintéticos vêm crescendo, já tendo sido relatada por diversos grupos de pesquisa contra diferentes vírus, tais como adenovírus (GROSSO et al., 2017), vírus chikungunya (ASHBROOK et al., 2016), citomegalovírus (CAI et al., 2014; GARDNER et al., 2015; COHEN et al., 2016), coronavírus (YANG et al., 2017; YANG et al., 2018), vírus da dengue (CHEUNG et al., 2014), HIV (SINGH et al., 2013; WONG et al., 2013; WONG et al., 2018), HPV (VAN DER KOLK, et al., 2017), vírus sincicial respiratório (NORRIS et al., 2018), vírus herpéticos e influenza. Tendo em vista que esta Tese objetiva, principalmente, avaliar as ações anti-herpética e anti-influenza destes compostos, serão apresentados aqui com detalhes os estudos com esses vírus relatados na literatura até então.

O efeito inibitório do vírus herpético humano do tipo 1 (HSV-1) foi observado para digoxina (HARTLEY et al., 2006), ouabaína (DODSON et al., 2007) e digitoxina (SU et al., 2008). A atividade antiviral da digoxina foi, ainda, relatada por Hartley e colaboradores (2006) para outros vírus DNA (HSV-2, vírus da varicela zoster, citomegalovírus e adenovírus); por Deng e colaboradores (2007) para um vírus DNA dupla fita (vírus da vaccínia); e por Hoffmann, Palese e Shaw (2008) para vírus RNA (vírus influenza, vírus da doença de New Castle e vírus da estomatite vesicular). Um dos mecanismos de ação antiviral, sugeridos por Hartley e colaboradores (2006) e por Hoffmann, Palese e Shaw (2008), enfatiza a importância dos íons intracelulares na replicação viral já que os primeiros autores discutiram a importância da concentração intracelular dos íons K^+ para a replicação viral, e os segundos destacaram a importância da concentração dos íons Na^+ para a inibição do ciclo viral. Segundo estes estudos, os cardenólídeos testados inibiram a bomba Na^+/K^+ , diminuindo a concentração intracelular de íons K^+ , aumentando a concentração intracelular dos íons Na^+ e, conseqüentemente, a dos íons Ca^{2+} , resultando na inibição da replicação viral, pois os vírus testados parecem depender da concentração intracelular fisiológica de K^+ .

Nosso grupo de pesquisa elucidou o mecanismo da ação inibitória da replicação do HSV-1 por um cardenólídeo natural, denominado de glucoevatomonosídeo (GEV), isolado de um cultivar brasileiro da *Digitalis lanata* Ehrh. Esse composto inibiu a síntese de proteínas virais, tais como ICP27, UL42, gB e gD, bloqueou a liberação viral e reduziu a dispersão viral célula-a-célula (*cell-to-cell spread*). Também apresentou atividade anti- Na^+/K^+ -ATPase, sugerindo que alterações no gradiente eletroquímico celular podem estar envolvidas no mecanismo de inibição viral (BERTOL et al., 2011).

Em relação aos vírus influenza, Hoffmann, Palese e Shaw (2008) descreveram o papel da regulação dos íons Na^+ na replicação do vírus influenza do tipo A [cepa A/WSN/33 (H1N1)] e do tipo B (cepa B/Yamagata/88). Segundo esses autores, o tratamento com um composto que promove a abertura dos canais de Na^+ reduz significativamente a replicação viral; por outro lado, a inibição dos canais de Na^+ leva a uma maior produção de vírus em cultura de tecidos. Kiyohara et al. (2012) avaliaram o potencial anti-influenza de seis extratos metanólicos contra o vírus influenza do tipo A [cepa A/PR8/34 (H1N1)]. Dessa avaliação, um heterosídeo cardioativo foi isolado da planta “rosa-do-deserto” (*Adenium obesum*) e reduziu em 69,3% o título viral, na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ (CI_{50} : 0,86 $\mu\text{g/mL}$). Por fim, Amarelle et al. (2019)

mostraram *in vitro* que a inibição da Na⁺/K⁺-ATPase pela ouabaína, um cardenolídeo bastante estudado, diminuiu a replicação do vírus influenza do tipo A [cepa A/WSN/33(H1N1)] nas células A549, diminuindo o teor do K⁺ intracelular, que, por sua vez, inibiu a tradução das proteínas virais NP e M1. Esses resultados foram confirmados em modelos *ex vivo* e *in vivo*, em explantes de tecidos de pulmões de ratos e em ratos, respectivamente, que foram geneticamente modificados para expressarem a subunidade alfa 1 da enzima Na⁺/K⁺-ATPase.

2.4.2 Potenciais efeitos citotóxicos e antitumorais

Apesar dos efeitos citotóxicos *in vitro* dos cardenolídeos frente a diferentes linhagens celulares tumorais humanas e sua potencial ação antitumoral *in vivo* já terem sido relatados na segunda metade do século passado (KELLY; DANIELS; SPAULDING, 1965; STENKVIST et al., 1979), o significado prático de tais efeitos foi revelado, tempos depois, por meio de estudos epidemiológicos, que relataram que pacientes com câncer de mama, tratadas concomitantemente com digoxina ou digitoxina para o controle de problemas cardíacos, apresentaram taxas de mortalidade por esse câncer inferiores àquelas de pacientes que não utilizavam esses medicamentos. As pacientes não tratadas, após cinco anos da mastectomia, apresentaram recorrência do câncer 9,6 vezes superior às taxas de pacientes tratadas com esses cardenolídeos (STENKVIST et al., 1979; STENKVIST, 2001). Em 2001, também foi publicado um estudo analítico-descritivo com 9.271 pacientes sobre os efeitos antineoplásicos da digitoxina no tratamento dos cânceres dos rins, do trato urinário e leucemias. Esse estudo apontou que as doses ativas eram semelhantes às concentrações plasmáticas terapêuticas encontradas nos pacientes cardíacos tratados com tal fármaco (HAUX et al., 2001). Posteriormente, vários estudos foram realizados com diferentes cardenolídeos frente a diversas linhagens celulares tumorais humanas e os resultados foram compilados em artigos de revisão sobre a pesquisa e o desenvolvimento de cardenolídeos como potenciais fármacos antitumorais (entre outros: WINNICKA; BIELAWSKI; BIELAWSKA, 2006; PRASSAS; DIAMANDIS, 2008; MIJATOVIC; KISS, 2013; DE et al., 2016; DIEDERICH; MULLER; CERELLA, 2017; SCHNEIDER et al., 2017b).

Até o momento, alguns produtos à base de cardenolídeos foram investigados para o tratamento de câncer em ensaios clínicos de fases I e II. O AnvirzelTM, um extrato aquoso liofilizado de *Nerium oleander* L. (espirradeira); o PBI-05204, outro extrato dessa planta produzido por extração com CO₂ supercrítico; o composto UNBS1450, um cardenolídeo semissintético derivado da 2-oxovuscharina, extraído do arbusto tropical *Calotropis procera*

(Aiton) WT, Asclepiadaceae; e HuaChanSu, um remédio da medicina tradicional chinesa extraído do sapo *Bufo* sp.; além do conhecido cardenolídeo digoxina (MENGER et al., 2013; SLINGERLAND et al., 2013; <https://clinicaltrials.gov/>).

O extrato Anvirzel™ contém vários cardenolídeos, tais como os glicosídeos oleandrina e neritalosídeo e a aglicona oleandrigenina. A oleandrina e a oleandrigenina inibiram a atividade catalítica da Na⁺/K⁺-ATPase e inibiram a expressão do fator de crescimento de fibroblastos-2 (FGF-2) em células de câncer de próstata (PATHAK et al., 2000; SMITH et al., 2001). Outro estudo foi conduzido para determinar a dose máxima tolerada e a segurança desse extrato em pacientes com tumores sólidos avançados. Os resultados indicaram que o Anvirzel™ pode ser administrado com segurança em doses de até 0,0083mg/kg/dia. Dezoito pacientes foram incluídos nesse estudo e completaram pelo menos um ciclo de três semanas de tratamento (MEKHAIL et al., 2006). O Anvirzel™ foi testado sozinho em fase I para tratar tumores sólidos e em combinação com carboplatina e docetaxel para câncer de pulmão de células não pequenas (MENGER et al., 2013; <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01562301?term=anvirzel&draw=2&rank=1>).

Em relação ao PBI-05204, o estudo de fase I foi concluído e a sua dose máxima recomendada para estudos de fase II foi determinada por parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos em pacientes com cânceres avançados de bexiga, cólon, reto, trompas de Falópio, mama e pâncreas. Nesse estudo, 46 pacientes receberam oito diferentes doses do extrato PBI-05204 (0,6 a 10,2 mg/dia) e sete pacientes permaneceram estáveis por mais de quatro meses. Os autores concluíram que o extrato PBI-05204 foi bem tolerado na dose máxima testada (10,2 mg/dia) não apresentando efeitos adversos comuns nem cardiotoxicidade (HENARY et al., 2011; SLINGERLAND et al., 2013). A dose recomendada para a fase II foi de 0,225 mg/kg (HONG et al., 2014). O PBI-05204 estava passando por um estudo de fase II para o adenocarcinoma pancreático metastático em estágio IV até setembro de 2016, porém atualmente o status do estudo é desconhecido pelo *Clinical Trials* (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02329717>).

O UNBS1450 é um composto semissintético derivado do cardenolídeo 2"-oxovoruscharina, que sua por sua vez foi extraído da planta *Calotropis procera* (JUNCKER et al., 2009). Ele apresentou atividade antiproliferativa *in vitro* com valores de CI₅₀ de 10 a 50 nM

em 58 linhagens de células tumorais humanas de 11 tipos histológicos distintos, inibindo a atividade da Na⁺/K⁺-ATPase (VAN QUAQUEBEKE et al., 2005). Este mesmo composto induziu o rompimento dos filamentos de actina e afetou várias vias de sinalização após a ligação a Na⁺/K⁺-ATPase (MIJATOVIC et al., 2007). O UNBS1450 foi investigado em ensaio de fase I na Comunidade Europeia para tratamento de pacientes com linfomas e tumores sólidos, mas o ensaio foi finalizado em 2011 (SLINGERLAND et al., 2013).

O HuaChanSu, um remédio da medicina tradicional chinesa extraído do sapo *Bufo* sp., que é conhecido por seus efeitos antitumorais, também foi testado. Um estudo piloto, envolvendo pacientes com câncer de pulmão, carcinoma hepatocelular ou câncer pancreático, demonstrou que esse produto foi bem tolerado e promoveu a estabilização da doença. Em um ensaio clínico de fase II, o perfil de segurança e o potencial terapêutico do HuaChanSu combinado com gemcitabina foram investigados em indivíduos com câncer pancreático avançado ou metastático. Nesse, o extrato foi bem tolerado, mas não conseguiu melhorar as taxas de resposta radiográfica, tempo de progressão da doença, qualidade e prolongamento da vida do paciente (MENGER et al., 2013). Para esse composto, atualmente existe um estudo clínico recrutando pacientes para investigar seus efeitos no carcinoma de células escamosas do esôfago (<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=huachansu&cntry=&state=&city=&dist=>).

Por fim, atualmente existem 22 ensaios clínicos registrados com a digoxina: 10 ensaios foram concluídos, quatro estão recrutando pacientes, seis estão ativos, um foi removido porque nenhum voluntário se inscreveu para o estudo e um é desconhecido pelo *Clinical Trials* (<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=cancer&term=digoxin&cntry=&state=&city=&dist=&Search=Search>). Vários tipos de câncer foram ou estão sendo investigados, incluindo os de cabeça e pescoço, próstata, mama, pancreático, pulmão, esôfago, melanomas, tumores malignos sólidos avançados, Sarcoma de Kaposi, leucemia mieloide aguda, queratose actínica e verrugas cutâneas. A digoxina foi ou está sendo testada sozinha e em combinação com agentes quimioterápicos e imunoterapêuticos com diferentes mecanismos de ação (<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=cancer&term=digoxin&cntry=&state=&city=&dist=&Search=Search>).

Uma triagem citotóxica realizada no nosso laboratório com 46 cardenolídeos, em células tumorais humanas de pulmão do tipo não-pequenas (A549), revelou que o composto mais citotóxico foi o glucoevatromonosídeo (GEV). Ele foi então selecionado para uma triagem em

diferentes linhagens celulares tumorais. A morte celular induzida por este composto foi independente de caspases nas células A549 e dependente dessas cisteíno-proteases em células de leucemia mieloide aguda (U937). Ele também provocou o bloqueio do ciclo celular na fase G2/M, o que foi atribuído à diminuição da expressão das proteínas ciclina B1 e p53 em células A549, mas não em células U937, nas quais induziu aumento das células na subG0/G1. O mecanismo completo da ação citotóxica deste composto foi recentemente publicado (SCHNEIDER et al., 2018a).

Em outro trabalho, os cardenolídeos digitoxigenina monodigitoxosídeo (DGX) e convalatoxina (CON) foram testados frente a quatro linhagens de células tumorais humanas. Ambos os compostos se mostraram citotóxicos para todas as linhagens, sendo que a linhagem A549 foi a mais sensível e, por isso os efeitos antiproliferativos, antimigratórios e anti-invasivos desses cardenolídeos foram investigados nessa linhagem celular. Os compostos foram capazes de reduzir a migração e a invasão celulares. Com relação à expressão de reguladores-chave do mecanismo metastático, houve redução da expressão das metaloproteinases MMP-2, MMP-9 e p-FAK (SCHNEIDER et al., 2016). Como continuidade dessa investigação, os efeitos da CON foram avaliados, de forma aprofundada, frente às células A549. Esse composto induziu efeitos citostáticos e citotóxicos na linhagem testada causando morte por apoptose, que foi confirmada pelo ensaio com dupla marcação anexina V / iodeto de propídeo e pelas alterações morfológicas das células. Além disso, houve bloqueio na fase G2/M e redução da expressão da ciclina B1 (SCHNEIDER et al., 2017a). Em relação a DGX, os estudos foram aprofundados com duas linhagens humanas de células de câncer de pulmão (A549 e H460). Foram comprovados seus efeitos citotóxicos e citostáticos por meio de várias estratégias metodológicas (SCHNEIDER et al., 2018b).

Como já é conhecido, a interação dos cardenolídeos com a enzima Na^+/K^+ -ATPase e a ativação de cascatas de sinalização intracelular podem culminar em diferentes tipos de morte. Assim, sabe-se que os cardenolídeos podem induzir apoptose ou autofagia, dependendo do tipo celular e das suas características químicas, sendo que esse potencial citotóxico duplo poderia ser uma alternativa para os tumores resistentes à quimioterapia realizada com agentes indutores de apoptose (SLINGERLAND et al., 2013). Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa confirmou a interação dos compostos DGX e CON com a enzima Na^+/K^+ -ATPase por meio de análises *in silico* e *in vitro* (SCHNEIDER et al., 2017a; SCHNEIDER et al., 2018b).

Além dos cardenolídeos naturais, nosso grupo de pesquisa, juntamente com alguns parceiros alemães, realizou outros estudos envolvendo cardenolídeos semissintéticos, tais como a proposta de obtenção do GEV por semissíntese a partir do evatromonosídeo, obtido pela degradação química da digitoxina (MUNKERT et al., 2017), e os estudos com o cardenolídeo AMANTADIG, capaz de inibir o crescimento de células de carcinoma renal e bloquear a fase G2/M do ciclo celular (NOLTE et al., 2017) e de inibir crescimento de células de câncer de próstata, bloquear a fase G2/M do ciclo celular e modular alguns intermediários do ciclo celular (por exemplo: CDK1, survivina, ciclina b1 e p21) (SILVA et al., 2018). Além destes, como parte desta Tese de Doutorado, foram publicados recentemente dois artigos sobre este tema (BOFF et al., 2019 e 2020), apresentados nos Capítulos 2 e 3, respectivamente.

Apesar dos inúmeros estudos já realizados com estes compostos, o mecanismo pelo qual eles agem nas células tumorais não foi totalmente elucidado. Muitas são as teorias propostas e vários intermediários intracelulares e vias moleculares independentes foram descritas como sendo moduladores dos efeitos observados. No entanto, nenhuma destas teorias parece ser suficientemente robusta para a proposição de uma conclusão definitiva, já que o mecanismo de ação em questão é complexo. A heterogeneidade dos mecanismos propostos foi descrita como consequência dos tipos celulares específicos, contra os quais os compostos foram testados (RIGANTI et al., 2011; CERELLA; DICATO; DIEDERICH, 2013).

Alguns mecanismos antineoplásicos já foram propostos para os cardenolídeos, como doses elevadas e tratamentos longos com esses resultando em apoptose ou necrose, devido ao distúrbio iônico provocado (CERELLA et al., 2015; DIEDERICH; MULLER; CERELLA, 2017). A indução de autofagia foi descrita para cânceres de mama (FARAH et al., 2016), ovário (HSU et al., 2016), colorretal (KANG et al., 2016), sistema nervoso (RADOGNA et al., 2016) e pulmão (SCHNEIDER et al., 2018a,b; SCHNEIDER et al., 2017a; SCHNEIDER et al., 2016). Outro mecanismo antitumoral descrito para essa classe de compostos está relacionado com a inibição direta da proliferação, por interferência no ciclo celular (CERELLA; DICATO; DIEDERICH, 2013).

Pongrakhananon e colaboradores (2014) descreveram anoikis em câncer de pulmão de células não pequenas, enquanto Menger e colaboradores (2012) foram os primeiros a sugerir a indução de morte celular imunogênica [forma peculiar de morte celular programada que é suficiente para ativar uma resposta imune adaptativa específica para antígenos endógenos (celulares) ou exógenos (virais) expressos por células em processo de morte celular] para todos

os glicosídeos cardiotônicos, quando utilizados sozinhos ou em combinação com outros quimioterápicos. A indução da morte celular imunogênica tem sido alvo de discussões mais recentes para essa classe de compostos (DIEDERICH; MULLER; CERELLA, 2017; SCHNEIDER et al., 2017b; DIEDERICH, 2019). As células tumorais geralmente superexpressam algumas subunidades da $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$, justificando a seletividade dos cardenolídeos (MIJATOVIC et al., 2007; LEFRANC et al., 2008; MATHIEU et al., 2009). O uso tradicional dessa classe de compostos para o tratamento de patologias cardíacas já permitiu traçar seu perfil de segurança, e o número crescente de relatos do seu potencial citotóxico seletivo incentivam a continuidade dos estudos mecanísticos dos mesmos.

3 VÍRUS HERPÉTICOS

Os vírus herpéticos são patógenos antigos que coevoluíram com o homem e outras espécies ao longo de mais de 200 milhões de anos. Esses vírus fazem parte da família *Herpesviridae*, a qual inclui mais de 200 espécies, sendo oito dessas infecciosas para o homem (Quadro 3.1) (FORSGREN; KLAPPER, 2009).

Quadro 3.1 – Classificação geral dos herpes vírus humanos.

Nome oficial	Subfamília	Gênero	Nome comum e abreviação	Sítio de latência
Herpes vírus Humano-1	<i>α-Herpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i>	Herpes Simplex Vírus tipo 1 (HSV-1)	Gânglios nervosos sensoriais
Herpes vírus Humano-2	<i>α-Herpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i>	Herpes Simplex Vírus tipo 2 (HSV-2)	Gânglios nervosos sensoriais
Herpes vírus Humano-3	<i>α-Herpesvirinae</i>	<i>Varicellovirus</i>	Vírus da Varicella-Zoster (VZV)	Gânglios nervosos sensoriais
Herpes vírus Humano-4	<i>γ-Herpesvirinae</i>	<i>Lymphocryptovirus</i>	Vírus Epstein-Barr (EBV)	Leucócitos e células epiteliais
Herpes vírus Humano-5	<i>β-Herpesvirinae</i>	<i>Cytomegalovirus</i>	Citomegalovírus humano (CMV)	Linfócitos B
Herpes vírus Humano-6A	<i>β-Herpesvirinae</i>	<i>Roseolovirus</i>	Vírus Herpes Humano Tipo 6A (HHV-6A)	Linfócitos T CD4 ⁺ e células epiteliais
Herpes vírus Humano-6B	<i>β-Herpesvirinae</i>	<i>Roseolovirus</i>	Vírus Herpes Humano Tipo 6B (HHV-6B)	Linfócitos T CD4 ⁺ e células epiteliais
Herpes vírus Humano-7	<i>β-Herpesvirinae</i>	-	Vírus Herpes Humano Tipo 7 (HHV-7)	Linfócitos T CD4 ⁺
Herpes vírus Humano-8	<i>γ-Herpesvirinae</i>	<i>Rhadinovirus</i>	Herpesvírus associado ao Sarcoma de Kaposi (KSHV)	Linfócitos B e células epiteliais

Fonte: adaptado de FORSGREN; KLAPPER (2009).

De acordo com suas propriedades biológicas, o Grupo de Estudo em Herpesvírus do Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV, 2018) classificou os vírus herpéticos em três subfamílias: *α-Herpesvirinae*, *β-Herpesvirinae* e *γ-Herpesvirinae* (Quadro 3.2).

Quadro 3.2 – Propriedades biológicas das subfamílias α , β e γ – *Herpesvirinae*.

Subfamília	Hospedeiros	Ciclo replicativo	Infecção
α - <i>Herpesvirinae</i>	Variados	Relativamente curto	Disseminação rápida em cultura de células, destruição irreversível das células infectadas e capacidade de estabelecer infecção latente, primariamente, mas não exclusivamente, em gânglios sensoriais
β - <i>Herpesvirinae</i>	Restritos	Longo	Processo lento de infecção em cultura de células. Os vírus podem permanecer na forma latente em glândulas secretoras, células linforreticulares, rins e outros tecidos
γ - <i>Herpesvirinae</i>	Limitados	Todos se replicam em células linfoblastoides (<i>in vitro</i>), sendo que alguns causam infecções com destruição irreversível em certos tipos de células fibroblásticas e epitelioides	Os vírus são específicos de linfócitos T ou B. Nos linfócitos, a infecção pode estabelecer-se como latente ou lítica, mas sem produção de uma progênie infecciosa. Com frequência, demonstra-se a presença do vírus latente no tecido linfoide

Fonte: adaptado de LUPI; PEREIRA JR (2000) e FORSGREN; KLAPPER (2009).

3.1 Herpes Simplex Virus (HSV) dos tipos 1 e 2

As infecções pelos HSV dos tipos 1 e 2 são comuns e onipresentes, possuindo um impacto considerável em todas as divisões geográficas e socioeconômicas. O homem é o único hospedeiro natural dos HSV. A transmissão dos vírus requer o contato direto entre um indivíduo susceptível e outro que liberará ativamente os vírus. A contaminação viral é obtida pela infecção das superfícies mucosas ou por meio de abrasões ou cortes na pele. A replicação dos vírus ocorre no local da infecção e produz uma viremia de curta duração. Esta infecção primária é normalmente assintomática, mas, em uma minoria de casos, pode

provocar sintomas locais e até mesmo sistêmicos (STEINER; KENNEDY; PACHNER, 2007; FORSGREN; KLAPPER, 2009).

Geralmente, o HSV-1 é associado a infecções orofaciais e o HSV-2 com infecções do trato genitourinário. Contudo, esta distinção anatômica não é mais considerada tão rígida como antes (STEINER; KENNEDY; PACHNER, 2007; MCALLISTER; SCHLEISS, 2014).

Devido ao tropismo específico, o HSV-1 infecta predominantemente as membranas da mucosa e pele da região orolabial; no entanto, nas últimas décadas passou a ser visto com mais frequência na genitália, devido ao aumento do contato orogenital desprotegido. Apesar desse tropismo por regiões “acima e abaixo da cintura”, não existe um local específico para cada tipo de HSV, já que ocorre frequentemente uma coinfeção (GARLAND; STEBEN, 2014). Além disso, os HSV-1 podem permanecer latentes no gânglio sensorial, sendo reativados em infecções recorrentes sintomáticas ou assintomáticas (BRADY; BERNSTEIN, 2004). Infecções oculares por HSV-1 são a principal causa de cegueira no mundo desenvolvido, com episódios recorrentes de reativação viral levando a cicatrizes progressivas e opacidade da córnea; o HSV-1 também pode causar encefalite e várias desordens do sistema nervoso periférico (SCHUPPE et al., 2008; BELLO-MORALES et al., 2012).

O HSV-2 é sexualmente transmissível, sendo responsável por causar meningite em adultos e meningoencefalite em neonatos (KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014; MCALLISTER; SCHLEISS, 2014).

3.1.1 Epidemiologia

A prevalência do HSV-1, na faixa etária de 0-49 anos, em todo o mundo, no ano de 2012, foi em torno de 67% (correspondendo a aproximadamente 3,709 bilhões de pessoas), sendo maior na África, Sudoeste da Ásia e Pacífico Ocidental. Já para o HSV-2, na faixa etária de 15-49 anos, foi em torno de 11,3% (correspondendo a aproximadamente 417 milhões de pessoas), sendo também maior na África, Sudoeste da Ásia e Pacífico Ocidental (LOOKER et al., 2015a; LOOKER et al., 2015b). Esses estão de acordo com os dados mais atualizados da Organização Mundial da Saúde (OMS), onde se acredita que o HSV-1 infecta 3,7 bilhões de pessoas com menos de 50 anos (67%) e o HSV-2, 417 milhões de pessoas entre 15-49 anos (11%) (WHO, 2020b). Os sintomas causados pela infecção são geralmente autolimitantes em indivíduos imunocompetentes,

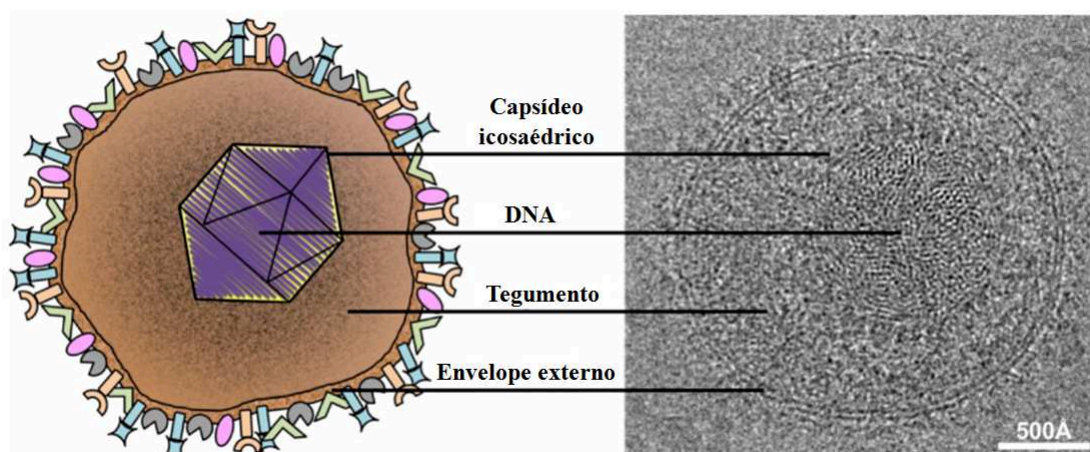
mas podem ser graves e prolongados em pacientes imunocomprometidos (MCALLISTER; SCHLEISS, 2014; NAVID et al., 2014).

Outro aspecto epidemiológico importante é a coinfeção dos tipos do HSV com outros vírus de interesse público. Segundo Gupta, Warren e Wald (2007), a infecção genital pelo HSV aumenta em três vezes o risco de adquirir HIV. O HSV-2, considerado o vírus mais comum causador de úlceras genitais no mundo, possui soroprevalência de 60-90% em pessoas infectadas pelo HIV. Os sintomas são geralmente leves ou não reconhecidos na maioria das pessoas infectadas com o HIV-1, mas podem causar úlceras genitais graves em pessoas com aids em estágio avançado. Estudos laboratoriais e epidemiológicos também sugerem que o HSV-2 pode aumentar a infecciosidade do HIV-1; todavia, ao utilizar um tratamento adequado para o HSV-2 torna-se possível diminuir a transmissão do HIV-1 (CELUM et al., 2010).

3.1.2 Estrutura dos HSV

As partículas virais são esféricas possuindo 186 nm de diâmetro com espículas salientes de glicoproteínas, fazendo com que o seu diâmetro total seja de aproximadamente 225 nm (GRUNEWALD et al., 2003). Essas são constituídas por quatro componentes básicos: ocupando uma posição excêntrica, o núcleo com **DNA** de fita dupla linear (152 kpb no HSV-1 e 155 kpb no HSV-2) rica em Guanina-Citosina (68% para o HSV-1 e 69% para o HSV-2), circundado por um **capsídeo icosaédrico**, que contém de 162 capsômeros (150 hexâmeros e 12 pentâmeros), rodeado por uma matriz de proteína não estrutural chamada de **tegumento**. Tal consiste em uma camada amorfa com algumas regiões estruturadas contendo filamentos de 7 nm de largura apostos à membrana, sendo composto por 26 proteínas com diversas funções (LUPI; PEREIRA JR, 2000; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013). Por fim, há o **envelope externo**, composto por uma bicamada lipídica e 11 glicoproteínas (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL e gM) e, pelo menos, duas proteínas de membrana não glicosiladas (U_L20 e U_S9). A fixação inicial das partículas virais nos receptores celulares e a subsequente penetração das mesmas nas células hospedeiras são mediadas pelas glicoproteínas presentes no envelope viral e já foram bastante estudadas (BERGSTRÖM; TRYBALA, 1996; KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014) (Figura 3.1).

Figura 3.1 – Estrutura da partícula viral dos HSV.



Fonte: adaptado de HEMING; CONWAY e HOMA (2017).

Os principais alvos da resposta dos anticorpos na infecção pelos HSV são as glicoproteínas de superfície. Alguns epítomos nelas presentes são compartilhados pelos HSV-1 e HSV-2, o que faz com que eles tenham um grau de reatividade cruzada bastante alto. Além disso, as glicoproteínas gB, gC, gD e gE podem desencadear respostas imunes potentes. No entanto, nenhuma reatividade cruzada entre a glicoproteína gG1 do HSV-1 e a gG2 do HSV-2 foi detectada e, por isso, os anticorpos contra tais glicoproteínas são utilizados para discriminar o tipo viral por sorologia, quando necessário. As principais diferenças antigênicas entre o HSV-1 e o HSV-2 referem-se aos epítomos tipo-específicos encontrados em algumas das glicoproteínas envolvidas (FORSGREN; KLAPPER, 2009; LEGOFF; PÉRE; BÉLEC, 2014).

O HSV-1 e o HSV-2 compartilham homologia genômica de 40%, que atinge 83% para as regiões de codificação de proteínas, o que pode explicar as numerosas semelhanças biológicas e a reatividade antigênica entre eles. Seus genomas codificam pelo menos 80 polipeptídeos estruturais e não estruturais diferentes, incluindo pelo menos 10 glicoproteínas virais diferentes, das quais a maioria está ancorada no envelope viral (GARLAND; STEBEN, 2014; LEGOFF; PÉRE; BÉLEC, 2014).

3.1.3 Ciclo de replicação viral

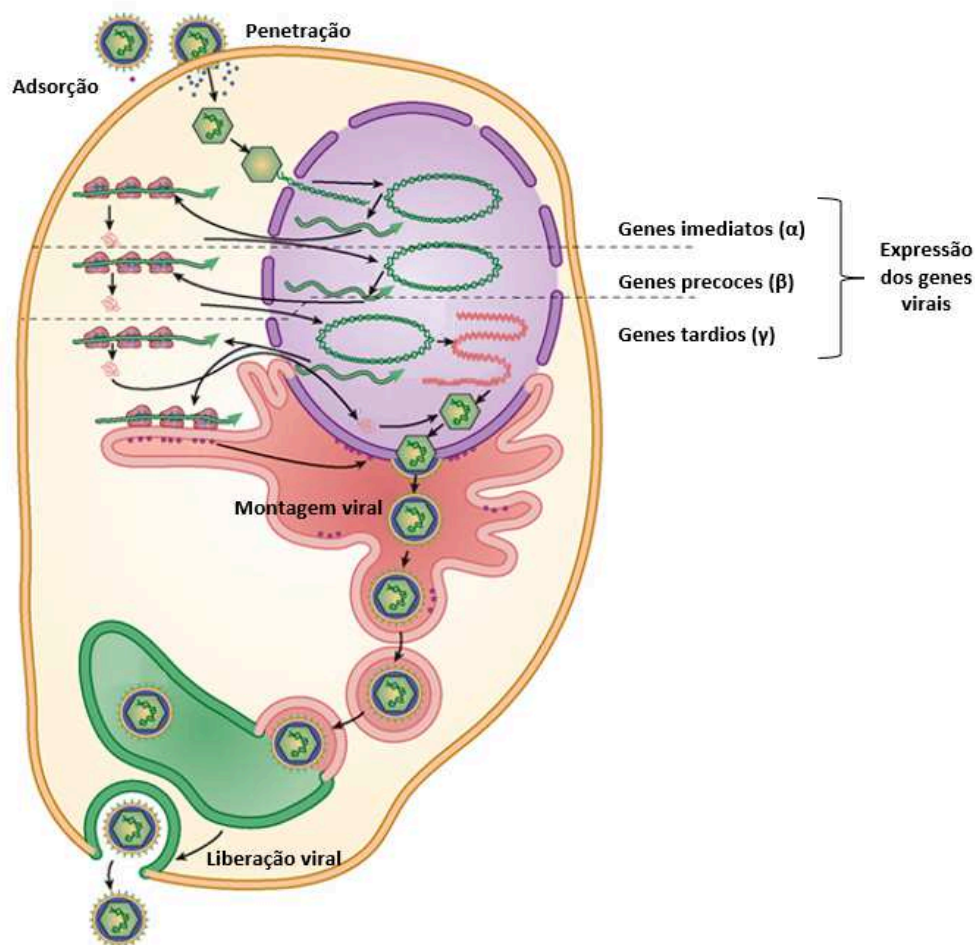
É bem conhecido que o ciclo de replicação viral é dividido em seis etapas: adsorção e ligação (1), entrada dos vírus nas células hospedeiras (2), expressão de genes virais (3),

replicação propriamente dita (4), montagem (5) e liberação da nova geração de partículas virais (6) (COLBÈRE, 1975; KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014).

Resumidamente, para iniciar a infecção, os vírus se ligam (adsorvem) aos receptores de superfície celular. Em seguida, ocorre rapidamente a fusão do envelope com a membrana plasmática e a liberação do capsídeo no citoplasma, o qual é transportado para os poros nucleares, pelos quais o DNA é introduzido no núcleo. Isso resulta na transcrição gênica e replicação do DNA viral bem como na montagem dos novos capsídeos.

Em linhagens celulares permissivas, o ciclo de replicação *in vitro* é citolítico e leva aproximadamente 18 a 20 horas. Até o momento, foram propostas duas vias de entrada para os HSV, que diferem de acordo com as células infectadas. No principal mecanismo (Figura 3.2) as glicoproteínas de superfície viral ligam-se às células hospedeiras (fase essencial deste processo), por meio de receptores específicos. Em seguida, ocorre a fusão do envelope viral com a membrana plasmática e posterior transporte do capsídeo viral para o núcleo. A endocitose da partícula viral envelopada é a via alternativa de entrada dos vírus nas células, seguida da fusão do envelope com vesículas intracelulares (CONNOLLY et al., 2011; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013; AGELIDIS; SHUKLA, 2015).

Figura 3.2 – Ciclo de replicação dos HSV.



Fonte: adaptado de BROOKS et al. (2013).

Abaixo, seguem detalhes sobre as etapas desta replicação viral.

Etapa 1 (adsorção e ligação): Os vírus empregam várias glicoproteínas multifuncionais para mediar a adsorção e ligação nas células hospedeiras. A **adsorção** da partícula viral à superfície celular é mediada pelas glicoproteínas virais gC e gB. No caso do HSV-1, ela parece ser mediada pela gC e, em menor grau, pela gB, enquanto no caso do HSV-2 a ligação ocorre pela gB, sendo que ambas interagem com os glicosaminoglicanos da superfície celular, em particular o sulfato de heparana. Em células desprovidas de sulfato de heparana, a interação ocorre com unidades equivalentes de outros glicosaminoglicanos de proteoglicanos da superfície celular, tais como sulfato de condroitina. Embora a gB seja necessária para a fusão dos HSV, sua atividade de ligação ao sulfato de heparana não é essencial para a entrada do vírus na célula hospedeira. A gC

não possui função obrigatória na entrada dos HSV, sendo dispensável para a ligação viral *in vitro*. No entanto, a eliminação da gC diminui a eficiência da adsorção (CONNOLLY et al., 2011; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013; AGELIDIS; SHUKLA, 2015).

Na etapa de **ligação**, é necessária a interação da gD com um dos três tipos de receptores celulares: as nectinas-1 e -2, o mediador específico da entrada do vírus herpético [*Herpesvirus Entry Mediator* (HVEM)], ou o 3-*O*-sulfato de heparana sulfatado (3-*O*-S-HS). Por isso, eles são considerados alvos terapêuticos atrativos para o desenvolvimento de fármacos anti-herpéticos (FORSGREN; KLAPPER, 2009; LIU; HOMA, 2009; KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014). O HVEM é expresso em vários tecidos, incluindo linfócitos T e B, células epiteliais, endoteliais e fibroblastos, sendo considerado um membro da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral. Já as nectinas-1 e -2, que são membros da superfamília de receptores de imunoglobulinas, são expressas em vários tecidos e tipos celulares, incluindo células epiteliais, fibroblastos e neurônios (SPEAR, 2004; AGELIDIS; SHUKLA, 2015).

Etapa 2 (entrada dos vírus nas células hospedeiras): A ligação da gD aos receptores celulares desencadeia a **fusão** da membrana celular com o envelope viral por interação com o complexo gB e o heterodímero gH/gL. O mecanismo exato e os participantes desse processo não foram ainda completamente elucidados, mas sabe-se que a região N-terminal da gD interage com os receptores celulares, provocando a liberação do domínio C-terminal, que ativa o complexo gB e gH/gL, desencadeando assim a fusão da membrana. Quando a gD não está ligada, o domínio C-terminal é bloqueado. Outra função interessante da gD é a supressão da apoptose nas células infectadas pelos HSV (KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014). A entrada do genoma viral é acompanhada pela entrada das proteínas do tegumento VP16 e *vhs* (*virion host shutoff*). Acredita-se que a proteína *vhs* permaneça no citoplasma, promovendo a degradação do RNA celular e viral, e a VP16, juntamente com as proteínas celulares Oct-1 e HCF-111, promovem a transcrição imediata (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013).

Etapa 3 (expressão de genes virais): Os genes dos HSV são classificados em três grupos, de acordo com a regulação da sua expressão: imediato (α), precoce (β) e tardio (γ) (WATANABE, 2010). Na chegada a um poro nuclear, o DNA viral é liberado a partir do capsídeo para o núcleo da célula (local onde ocorre a transcrição, replicação do DNA viral e produção de novos capsídeos), onde imediatamente se difunde. Para iniciar a transcrição, o DNA viral liga-se a uma proteína da célula hospedeira (Oct-1), a uma

proteína do tegumento (VP16) e a outros fatores de transcrição para promover a expressão de genes α (2 a 4 h pós-infecção), que é o primeiro conjunto de genes virais a serem transcritos. A maioria dos genes imediatos codificam proteínas reguladoras, enquanto os produtos dos genes precoces estão envolvidos na replicação do DNA viral. Muitas das proteínas estruturais são codificadas pelos genes tardios, que não são expressos até a síntese de DNA viral. O DNA viral é transcrito em todo o ciclo replicativo pela RNA polimerase II da célula hospedeira, mas com participação de fatores virais em todas as fases da infecção (LUPI; PEREIRA JR, 2000; FORSGREN; KLAPPER, 2009; LIU; HOMA, 2009; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013).

Seis genes (ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 e $U_S1.5$) são atribuídos ao grupo de genes imediatos; cinco deles (ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 e $U_S1.5$) ativam a transcrição de genes β , em vários tipos de células, codificando os fatores responsáveis pela transcrição dos genes virais restantes e pela evasão do sistema imune do hospedeiro. Dois desses, ICP4 e ICP27, são essenciais para promover a expressão gênica viral (mutantes nulos não apresentam replicação viral). A ICP27 redistribui os complexos nucleares ribonucleicos, interfere no *splicing* (remoção dos íntrons) dos transcritos α e participa na regulação da liberação viral (HARDY; SANDRI-GOLDIN, 1994; PARK et al., 2015). Desta forma, essa proteína se faz necessária para a transição da expressão dos genes α para a expressão dos genes β e γ . A síntese do DNA viral é iniciada pela expressão dos genes precoces (β), enquanto os genes tardios (γ) codificam as proteínas estruturais da partícula viral. Proteínas imediatas (α) realizam múltiplas funções e executam uma reorganização dos processos celulares de interesse do vírus (KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014).

Depois da entrada da partícula viral, o capsídeo sem envelope é transportado para os poros nucleares com posterior transferência para o núcleo. Os HSV viajam através das células por longas distâncias, especialmente em neurônios. Utilizando-se ensaios bioquímicos e microscopia por imunofluorescência indireta, foi demonstrado que o capsídeo viral é transportado para o núcleo ao longo da rede de microtúbulos, por meio da interação da proteína do tegumento U_L34 com a dineína celular. O genoma viral é então liberado, o capsídeo vazio é deixado no citoplasma e o DNA viral imediatamente altera sua forma de fita dupla linear para a forma circular (SODEIK; EBERSOLD; HELENIUS, 1997; LIU; HOMA, 2009; KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014).

Etapa 4 (replicação propriamente dita): A expressão dos genes α leva a ativação dos genes β , que codificam, principalmente, enzimas envolvidas na síntese e replicação do DNA viral: uma subunidade catalítica da DNA polimerase (U_L30) e sua proteína acessória (U_L42), proteína de ligação ao DNA simples fita (ICP8), complexo helicase-primase formado por 3 proteínas (U_L5 , U_L8 e U_L52), uma proteína de ligação (U_L9), além das enzimas envolvidas no metabolismo do ácido nucleico (por exemplo, ribonucleotídeo redutase, timidina cinases, timidilatosintetase, DNAase alcalina, dUTPase, etc.) e na síntese do DNA (por exemplo, DNA-polimerase, helicase, primase, etc.). O pico de síntese de produtos de genes β é observado entre 5 a 7 h pós-infecção, e a replicação do DNA viral se inicia quando níveis suficientes destas proteínas se acumulam nas células infectadas. A expressão dos genes α é reduzida significativamente após o início da replicação do DNA, enquanto os genes tardios começam a ser expressos em níveis elevados. Considera-se que o DNA dos HSV replique por um mecanismo cíclico, empacotando o genoma de DNA no nucleocapsídeo (LUPI; PEREIRA JR, 2000; FORSGREN; KLAPPER, 2009).

Etapa 5 (montagem das partículas virais): A síntese do nucleocapsídeo e de todas as outras proteínas estruturais ocorrem devido à indução da expressão dos genes γ (12 h pós-infecção) pelos produtos dos genes β . Os capsídeos dos HSV são montados em torno das proteínas andaimes virais no núcleo das células e, em seguida, outras proteínas virais interagem com o DNA viral replicado para permitir sua encapsulação. As proteínas do tegumento também migram para o núcleo das células e formam depósitos proteicos sob a membrana nuclear modificada. Os HSV, ao contrário de outros vírus envelopados, são conhecidos por empacotarem aproximadamente 20 a 30 proteínas entre o capsídeo e o envelope na região do tegumento. Os capsídeos preenchidos de DNA associam-se com proteínas do tegumento próximo da membrana nuclear. As glicoproteínas virais passam por extensas modificações pós-tradução, durante a passagem pelo aparelho de Golgi, sendo então inseridas nas membranas nucleares (LUPI; PEREIRA JR, 2000; FORSGREN; KLAPPER, 2009; LIU; HOMA, 2009; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013).

Etapa 6 (liberação da nova geração de partículas virais): Os nucleocapsídeos maduros tornam-se infecciosos por meio da germinação da lamela interna da membrana nuclear e recebem seu envelope e tegumento. Até recentemente, não se sabia o exato mecanismo que o vírus utilizava para escapar da célula hospedeira após se replicar. A

estratégia consiste em secretar duas proteínas, a pUL31 e a pUL34, que interagem formando uma vesícula. Esse complexo proteico recobre o vírus e o transporta para fora do núcleo, permitindo que ele infecte uma nova célula e a doença progrida. Assim, as novas partículas virais são liberadas a partir das células infectadas transitando nas cisternas do retículo endoplasmático rugoso, no aparelho de Golgi e nas vesículas de transporte citoplasmático. A infecção produtiva das células hospedeiras resulta na sua destruição, por meio de grandes mudanças estruturais e bioquímicas induzidas pela replicação viral (LUPI; PEREIRA JR, 2000; FORSGREN; KLAPPER, 2009; LIU; HOMA, 2009; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013; HAGEN et al., 2015; ZEEV-BEN-MORDEHAI et al., 2015).

3.1.4 Terapia anti-herpética

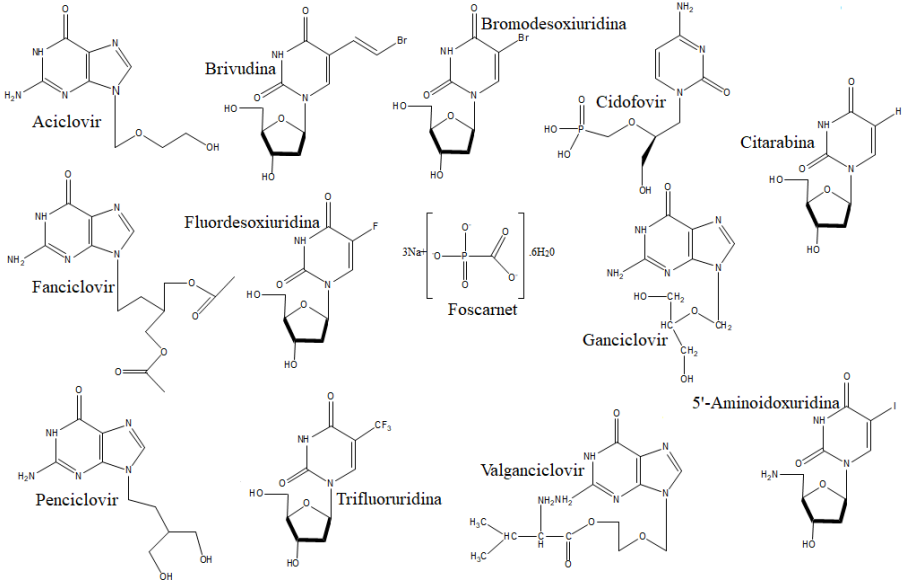
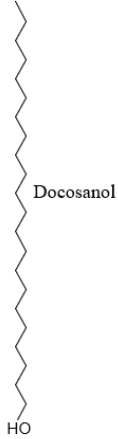
A maioria dos agentes terapêuticos utilizados para o tratamento das infecções causadas pelos HSV partilha do mesmo mecanismo de ação, embora possuam diferentes alvos moleculares e vias metabólicas de ativação (pró-fármacos) (Quadro 3.3). Esses fármacos atuam sobre a síntese do DNA viral, por meio da inibição da DNA polimerase. A exceção é o docosanol, que é um inibidor da entrada dos HSV nas células. O tratamento padrão-ouro das infecções causadas pelos HSV emprega o aciclovir (MAMIDYALA; FIRESTINE, 2006). Embora tal fármaco seja eficaz e seletivo, o surgimento de cepas resistentes tem dificultado o manejo das infecções herpéticas, visto que a maioria dos fármacos compartilha o mesmo mecanismo de ação implicando resistência cruzada (BACON et al., 2003; MORFIN; THOUVENOT, 2003).

Até o momento, existem três mecanismos de indução de resistência associados aos fármacos anti-herpéticos:

- 1) redução ou ausência da enzima timidina quinase;
- 2) modificação da atividade da timidina quinase resultando em diminuição da fosforilação do aciclovir;
- 3) alteração na enzima DNA polimerase viral e, conseqüentemente, diminuição da afinidade do trifosfato de aciclovir.

De forma geral, os HSV são resistentes ao aciclovir, valaciclovir e famciclovir, simultaneamente (CHATIS, 1992; RABELO et al., 2019).

Quadro 3.3 – Estruturas químicas dos fármacos anti-herpéticos disponíveis e seus alvos moleculares.

Inibidores da replicação viral	Inibidor da entrada dos vírus nas células
 <p>Chemical structures of antiviral drugs:</p> <ul style="list-style-type: none"> Aciclovir Brivudina Bromodesoxiuridina Cidofovir Citarabina Fanciclovir Fluoresoxiuridina Foscarnet Ganciclovir Penciclovir Trifluoruridina Valganciclovir 5'-Aminodoxiuridina 	 <p>Docosanol</p>

Atualmente, novos fármacos anti-herpéticos estão sendo avaliados em ensaios clínicos para o tratamento dessas infecções: o brincidofovir (QUENELLE et al., 2010; PRICHARD et al., 2011), que atua como um inibidor de substrato da DNA polimerase e possui atividade antiviral 1.000 vezes maior que a do cidofovir; os fármacos amenamevir (CHONO et al., 2010) e o pritelivir (WALD et al., 2014), que são inibidores da helicase-primase; e, por fim, mesilato de nelfinavir (KALU et al., 2014), que é o sal do fármaco nelfinavir (inibidor do HIV-1), com atividade anti-HSV-1 por inibir a maturação e exportação das novas partículas virais (ÁLVAREZ et al., 2020).

4 VÍRUS INFLUENZA

Influenza pode ser definida como uma doença respiratória grave e contagiosa, caracterizada inicialmente por febre, tosse, dor de garganta e mialgia. Os vírus influenza (VI) são responsáveis por epidemias anuais e pandemias intermitentes, que acometem milhares de pessoas no mundo todo (LULIANO et al., 2018), constituindo um grave problema de saúde pública. Essa doença pode evoluir a condições mais graves, tal como a pneumonia, insuficiência respiratória e dispneia, resultando em hospitalização e até mesmo morte, principalmente em pacientes de grupos de risco (CDC, 2020).

Durante o século XX, ocorreram três importantes pandemias: a gripe espanhola, de 1918 a 1920, que matou 20 a 40 milhões de pessoas no mundo, com o surgimento de um novo subtipo, o H1N1 (PATTERSON; PYLE, 1991); a gripe asiática, de 1957 a 1960, sendo caracterizada pelo surgimento do subtipo H2N2; e a gripe de Hong Kong, de 1968 a 1972 caracterizada pelo surgimento do subtipo H3N2 (SCHOLTISSEK et al., 1978). Pode-se, ainda, citar a gripe russa, de 1977 a 1978, causada pelo ressurgimento do subtipo H1N1, principalmente em crianças e jovens (XU et al., 2004); no século XXI a gripe aviária, de 2003 a 2004, com surgimento de focos de VI do tipo A de alta patogenicidade (H5N1) (ZAMBON, 2014); a gripe influenza pandêmica (H1N1), em 2009, que foi uma gripe humana causada pela agressiva cepa suína A/H1N1pdm (DAWOOD et al., 2012); e em 2013 na China, o subtipo aviário A/H7N9 emergiu causando uma taxa significativa de infecções em humanos e aves (GAO et al., 2013).

A permanência dos VI no ambiente por décadas pode ser explicada por dois mecanismos evolutivos, o *drift* antigênico e o *shift* antigênico. O primeiro resulta de mutações pontuais as quais são inseridas durante a replicação do vírus, garantindo a evolução antigênica viral. Já o segundo está relacionado com um rearranjo de segmentos gênicos resultando em mudanças mais drásticas no genoma viral e surgimento de pandemias, por rearranjo gênico do hospedeiro infectado com diferentes cepas virais (WEBSTER; BEAN, 1978; BERRI et al., 2014).

4.1 Epidemiologia

A doença causada pelos VI, também chamada de gripe sazonal, é considerada uma das mais importantes do trato respiratório em humanos, ocorrendo principalmente no inverno. Estima-se que, em todo o mundo, as epidemias anuais resultem em torno de três a cinco milhões de casos graves, e entre 290 a 650 mil mortes por problemas respiratórios (WHO, 2020c).

Todas as faixas etárias podem ser afetadas pela doença; porém, existem grupos com maior risco como as mulheres grávidas, crianças menores que cinco anos, idosos, indivíduos com doenças crônicas (cardíacas, pulmonares, renais, metabólicas, neurodesenvolvimentais, hepáticas ou hematológicas), e indivíduos imunossuprimidos (com HIV/aids, sob tratamento quimioterápico ou com fármacos esteroides) (SIMONSEN et al., 1997; SHAW; PALESE, 2013; WHO, 2020c).

A gripe sazonal possui transmissão considerada rápida, principalmente em áreas movimentadas, como escolas e asilos. Uma pessoa infectada quando tosse ou espirra, dispersa no ar gotículas infecciosas (contendo os vírus), que se espalham por até um metro de distância, infectando assim as pessoas que estão próximas. A transmissão também ocorre pelas mãos

contaminadas com os VI e, em menor frequência, pelo contato com uma superfície ou objeto que contenha os vírus. O período de incubação dos vírus varia de um a quatro dias, e para prevenir tal transmissão, as pessoas infectadas devem cobrir a boca e o nariz ao tossir e, lavar as mãos regularmente (SHAW; PALESE, 2013; CDC, 2020; WHO, 2020c).

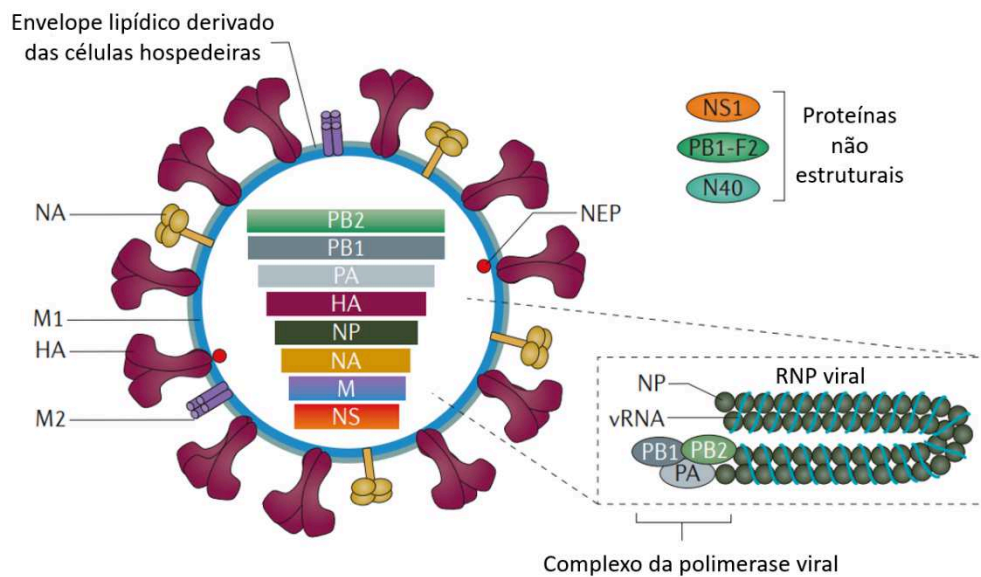
Nas regiões tropicais, os surtos são considerados irregulares, já que a doença pode ocorrer ao longo do ano. Em climas temperados, as epidemias sazonais são mais regulares, ocorrendo principalmente no inverno (CDC, 2020).

4.2 Classificação e estrutura dos vírus influenza (VI)

Existem quatro tipos reconhecidos de vírus influenza, A, B, C e D, sendo o vírus influenza D, o mais recente a ser descoberto, não tendo ainda casos reportados em humanos (HAUSE et al., 2013). Esses vírus pertencem à família *Orthomyxoviridae*, com tamanho aproximado de 80 a 120 nm (HUTCHINSON; FODOR, 2013; SHAW; PALESE, 2013; SU et al., 2017).

As partículas virais possuem envelope coberto por proteínas com funções essenciais ao vírus: a hemaglutinina (HA), responsável pela entrada dos vírus nas células, a neuraminidase (NA), que permite a liberação dos vírus que irão infectar novas células, e os canais de prótons formados pela proteína M2, que é responsável pelo desnudamento da partícula viral (Figura 4.1) (FOUCHIER et al., 2005; MEDINA; GARCIA-SASTRE, 2011). Abaixo do envelope viral encontram-se as proteínas M1, que delimitam a porção interna da partícula viral e revestem o complexo de ribonucleoproteínas (RNPs). As RNPs são compostas pelo complexo da polimerase viral [polimerase básica 1 (PB1), polimerase básica 2 (PB2) e polimerase ácida (PA)], ligado a nucleoproteína (NP) e a cada um dos oito segmentos do genoma viral (SHAW; PALESE, 2013).

Figura 4.1 – Estrutura da partícula viral dos vírus influenza.



Fonte: adaptado de MEDINA; GARCIA-SASTRE (2011).

Abaixo segue uma breve descrição das principais proteínas expressas pelos VI e suas respectivas funções durante o ciclo viral (Quadro 4.1).

Quadro 4.1 – Principais proteínas expressas pelos vírus influenza e suas funções.

Proteína	Função
PB2	Componente da RNA polimerase, reconhecimento e captura da estrutura Cap (existente no pré-RNA do hospedeiro)
PB1	Componente da RNA polimerase, atividade de endonuclease e alongação
PA	Componente da RNA polimerase, participante dos processos de transcrição e replicação
HA	Glicoproteína de superfície, receptor de ligação, fusão, maior antígeno
NA	Glicoproteína de superfície; atividade de sialidase
NP	Nucleoproteína: maior componente do núcleo-capsídeo; importante no ciclo replicativo do RNA; conduz à ordenação helicoidal do nucleocapsídeo
M1	Proteína de matriz: maior componente do vírus (proteína estrutural)
NS1	Proteína não estrutural do núcleo: importante no transporte de RNA celular, <i>splicing</i> , tradução e ação anti-interferon
NEP/NS2	Proteína não estrutural de exportação nuclear das RNPs virais

Fonte: adaptado de SHAW; PALESE (2013).

A variabilidade das proteínas virais (HA e NA) constitui a base da classificação dos vírus do tipo A em diferentes subtipos. Atualmente, são conhecidos 18 tipos de HA (H1-H18) e 11 de NA (N1-N11). A combinação de ambas é que define o subtipo de vírus da gripe (por exemplo, H5N1 ou H1N1), e está diretamente relacionada com as respostas epidemiológicas e clínicas (SHAW; PALESE, 2013; DE VLUGT et al., 2018).

Os vírus influenza do tipo A (VIA) são os mais virulentos patógenos humanos, representando uma grande preocupação de saúde pública, tanto pelo potencial pandêmico quanto pelo impacto sazonal. As aves aquáticas são o principal reservatório animal dos VIA, já que abrigam todas as combinações possíveis dos subtipos de HA e NA (YOON; WEBBY; WEBSTER, 2014; BORKENHAGEN et al., 2019). Atualmente, circulando em humanos, sazonalmente, encontram-se os subtipos H1N1 e H3N2 (WHO, 2020c).

Os vírus influenza do tipo B (VIB) são responsáveis por surtos localizados em pequenas comunidades (por exemplo, em escolas). Eles infectam o trato respiratório superior e inferior, assim como os VIA. Apesar de semelhantes, os VIA e os VIB apresentam diferenças significativas tanto na evolução quanto na epidemiologia. Esses vírus não são classificados em subtipos, mas podem ser divididos de acordo com mudanças antigênicas significativas. Para esses vírus, os humanos são o principal reservatório (OSTERHAUS et al., 2000). Atualmente, os VIB circulantes pertencem às linhagens B/Yamagata ou B/Victoria. (WHO, 2020c).

Os vírus influenza do tipo C (VIC) causam infecção do trato respiratório superior, especialmente em crianças, mas os sintomas são geralmente leves, sendo, por isso, menos estudados e sem importância para a saúde pública (GRIENKE et al., 2010; RICHTER et al., 2015). Estudos sorológicos indicaram que os VIC possuem distribuição mundial e que a maioria dos humanos desenvolve anticorpos contra eles no início da vida. Os VIC possuem maior estabilidade antigênica, quando comparados com os VIA, sendo o reservatório desses vírus o ser humano, podendo também infectar porcos (SALEZ et al., 2014).

Recentemente, isolado de porcos e bovinos clinicamente doentes, um novo vírus influenza, inicialmente classificado como do tipo C, foi depois denominado diferentemente: vírus influenza D (VID). Provisoriamente, ele foi designado como C/Oklahoma/1334/2011 (C/OK) por causa das suas similaridades genéticas com o VIC. Posteriormente, a análise filogenética das proteínas virais mostrou diferenças entre os vírus C/OK e o VIC, assim como havia sido encontrado entre os VIA e os VIB. Por meio de ensaios de inibição da hemaglutinação, não foi

observada reatividade cruzada entre C/OK e VIC. O vírus C/OK foi capaz de infectar furões e porcos e ser transmitido para outros animais. Tais evidências sugeriram que o vírus C/OK representava um novo subtipo do VIC, que circula em porcos, sendo assim, classificado como VID (HAUSE et al., 2013).

4.3 Ciclo de replicação dos vírus influenza (VI)

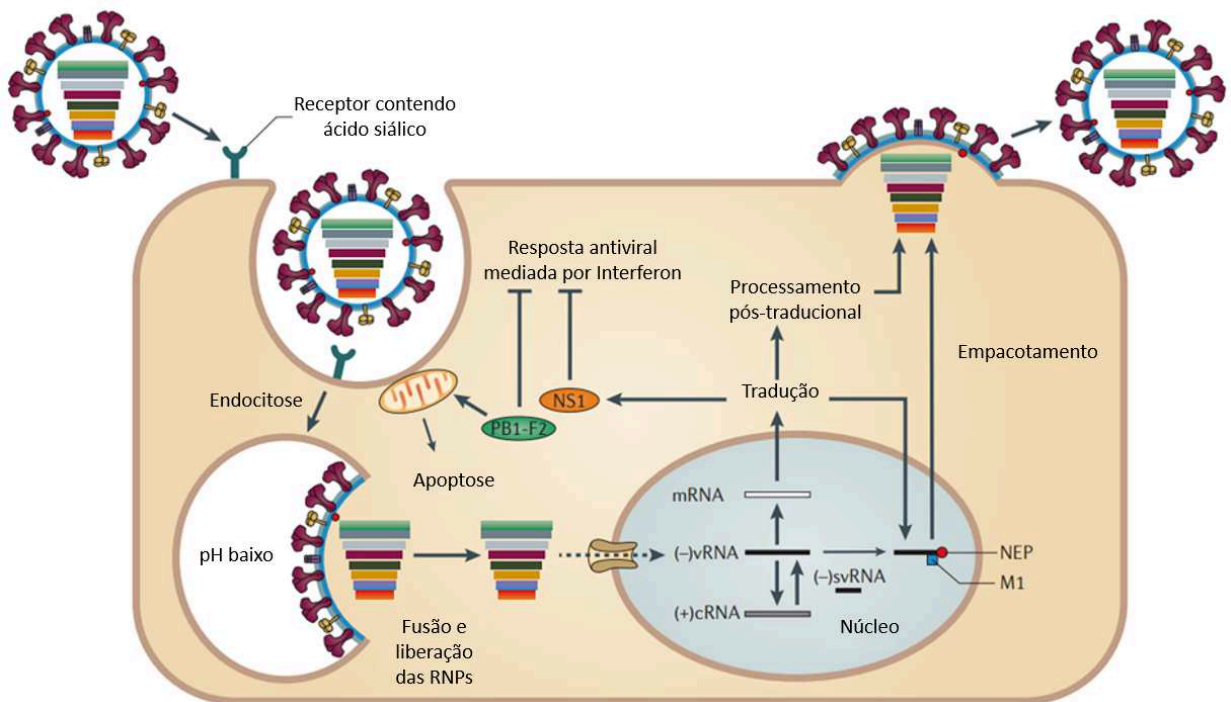
As principais células utilizadas para a replicação dos VI são as células epiteliais do trato respiratório superior e inferior no organismo humano. Isso se deve ao fato de as membranas dessas células serem ricas em ácido N-acetil neuramínico (SHAW; PALESE, 2013). As proteínas HA e a NA interagem com esse ácido, conhecido também como ácido siálico. Quando os VI infectam o hospedeiro humano, a proteína HA reconhece o ácido siálico das superfícies celulares (SHAW; PALESE, 2013; MAIR et al., 2014), e conseqüentemente, ocorre a internalização dos vírus por endocitose, que é pH-dependente. O pH dos endossomas, quando baixo, faz com que aconteça uma mudança conformacional na proteína HA e, assim, o precursor dessa glicoproteína de superfície (HA0) é clivado nas subunidades HA1 e HA2. Em seguida, ocorre a inserção do domínio fusogênico HA2 na membrana endossomal, permitindo a passagem do conteúdo viral para o citoplasma. A proteína M2, que atua como um canal de prótons, promove o desnudamento das partículas virais e também contribui para que o meio fique mais ácido. Desta forma, a fusão permite que o complexo RNP viral seja liberado no citoplasma celular, e por transporte ativo, tal complexo entra no núcleo da célula hospedeira (HAMILTON; WHITTAKER; DANIEL, 2012; SHAW; PALESE, 2013; ZHENG; TAO, 2013).

O núcleo é o local onde ocorre toda a síntese do RNA dos VI, por meio da ação do complexo das polimerases virais (PB2, PB1 e PA). Uma vez no núcleo, por meio de um mecanismo dependente de iniciador, o RNAv sentido negativo é transcrito em RNAm, e utilizado na síntese das proteínas virais. Uma cópia completa do molde de RNAv é produzida, e como resultado, um RNAc sentido positivo é gerado. O RNAc é utilizado como molde para a produção dos novos RNAv (SHAW; PALESE, 2013; TE VELTHUIS; FODOR, 2016).

Todos os RNAm são transportados para o citoplasma, e aqueles que codificam as proteínas de membrana (HA, NA e M2) são traduzidos por ribossomas no retículo endoplasmático. Em seguida, essas proteínas entram na via de secreção do hospedeiro, sofrendo glicosilação no complexo de Golgi. Todos os outros RNAm serão traduzidos por ribossomas citoplasmáticos e as proteínas PA, PB1, PB2 e NP são importadas para o núcleo, onde catalisam inicialmente a

síntese da cadeia (+) de RNA e depois da cadeia (-) de RNA, formando vários fragmentos de nucleocapsídeos. As proteínas M1 e NS1 são também transportadas para o núcleo. A ligação da proteína M1 aos novos RNA_v induz a parada da síntese de RNA_m virais e, em conjunto com a NEP/NS2, promovem a exportação dos nucleocapsídeos para o citoplasma. As proteínas HA, NA e M2 são transportadas para a superfície da célula e então incorporadas na membrana plasmática. Os nucleocapsídeos virais associam-se às proteínas M1 e NEP/NS2, são transportados para a superfície celular, e ligam-se às regiões da membrana plasmática que possuem as proteínas da membrana. Finalmente, ocorre a formação das novas partículas virais e o brotamento ocorre na membrana plasmática. A liberação das partículas virais recém-sintetizadas ocorre por meio da NA, que cliva os ácidos siálicos da superfície celular, impedindo sua aglomeração ou retenção devido à interação da HA com os resíduos desse ácido (DIAS et al., 2009; SHAW; PALESE, 2013) (Figura 4.2).

Figura 4.2 – Ciclo de replicação dos vírus influenza do tipo A.



Fonte: adaptado de MEDINA; GARCIA-SASTRE (2011).

4.4 Controle e terapia anti-influenza

O monitoramento epidemiológico das infecções causadas pelos VI é de extrema importância devido às epidemias anuais e o risco inerente de novas pandemias. Desde 1952, a vigilância global da gripe é realizada pelo Sistema Global de Vigilância e Resposta à Gripe (GISRS) da OMS. Atualmente, o GISRS é composto por instituições em 115 estados membros da OMS, centros nacionais de influenza, centros colaboradores da OMS, laboratórios regulatórios essenciais e laboratórios de referência para diagnóstico de infecção por VIA/H5 (WHO, 2020d).

A vacinação é a principal medida profilática e de controle das infecções e complicações dos VI (CARRAT; FLAHAULT, 2007; SOEMA et al., 2015). Embora seja a principal estratégia utilizada para diminuir o impacto das epidemias anuais do vírus, a eficácia limitada das vacinas licenciadas é reconhecida. Isso ocorre devido à alta taxa de mutação do genoma dos VI, que altera suas características antigênicas (PRINCIPI et al., 2019); e nesse sentido, tais vacinas precisam ser avaliadas todos os anos. Desta forma, dados são coletados em todo o mundo e um comitê se reúne duas vezes ao ano para avaliar e recomendar quais as cepas dos VI serão incluídas na composição da vacina a ser administrada no próximo ano, diferenciando qual será aplicada no hemisfério sul e qual será aplicada no hemisfério norte (WHO, 2020e).

Além da vacinação como método preventivo, atualmente estão disponíveis e em constante estudo, fármacos que objetivam impedir a replicação viral. Dentre esses, podemos citar:

- os inibidores do canal iônico M2, amantadina (aprovado em 1966) e a rimantadina (aprovado em 1993), usados apenas para tratar infecções causadas por VIA, com sérios efeitos colaterais associados ao sistema nervoso central e trato gastrointestinal (VON ITZSTEIN, 2007). Por isso, não são mais recomendados desde 2004-2005 devido às altas taxas de resistência (KLIMOV et al., 1995; SHIRAIISHI et al., 2003; JACOB et al., 2016);
- os inibidores da NA, oseltamivir e zanamivir, que possuem a capacidade de encaixar-se no sítio ativo da enzima e evitar a clivagem da ligação entre as células hospedeiras e as partículas virais recém-formadas (MATROSOVICH et al., 2004; MOSCONA, 2005). Ambos os fármacos foram aprovados para o tratamento das infecções causadas por VIA e VIB; porém, com o passar do tempo, também começaram a induzir resistência. Os vírus H1N1 resistentes ao oseltamivir surgiram

espontaneamente e se espalharam globalmente (MOSCONA, 2005; MEIJER et al., 2009; WEINSTOCK; ZUCCOTTI, 2009; HURT et al., 2011; MATOS et al., 2018).

Devido à falta de fármacos anti-influenza eficazes, novos alvos e estratégias são constantemente desenvolvidos em todo o mundo. Na Rússia, o umifenovir, que é um inibidor de fusão celular, já é utilizado clinicamente (LENEVA et al., 2016; PSHENICHNAYA et al., 2019). Outros inibidores da NA (laninamivir e peramivir) foram introduzidos recentemente nos mercados farmacêuticos do Japão, China, Coréia do Sul e EUA, tanto para prevenção como para o controle das infecções por VI, mas não demonstraram ser mais eficazes que o oseltamivir (TAKASHITA et al., 2014).

Com o intuito de diminuir a resistência criada pela alta mutação das principais proteínas antigênicas virais aos medicamentos existentes, dois novos medicamentos foram desenvolvidos com foco na inibição da polimerase viral: o baloxavir marboxil (licenciado no Japão e EUA) e o favipiravir (licenciado somente no Japão). Eles foram lançados no mercado farmacêutico em 2018, contemplando grupos especiais de pacientes (FURUTA; KOMENO; NAKAMURA, 2017; HOFFMANN-LA ROCHE, 2018; NOSHI et al., 2018). Tais medicamentos devem ser tratados com cautela (por exemplo, somente usados emergencialmente) por serem novos no mercado e não possuírem seus efeitos colaterais bem caracterizados. Inclusive, já foi detectado que o baloxavir marboxil estaria induzindo resistência e que o favipiravir mostrou ser teratogênico (PRINCIPI et al., 2019).

5 CÂNCER

5.1 Informações gerais

Câncer é um termo genérico utilizado para designar muitas doenças caracterizadas pela proliferação anormal de células, além de seus limites habituais, que podem invadir partes adjacentes do corpo e/ou se espalharem para outros órgãos. Essas células, ditas tumorais, podem ser de qualquer parte do corpo e os tumores formados possuem muitos subtipos anatômicos e moleculares, os quais exigem estratégias de manejo específicas. Outros termos usados para designar os cânceres são tumores malignos e neoplasias (WHO, 2020a).

Tal proliferação anormal origina uma nova população celular com características diferenciadas, tais como insensibilidade a sinais inibitórios de crescimento, potencial ilimitado

de replicação, mutação, instabilidade genômica, inflamação induzida pelos tumores, desregulação energética celular, evasão ao ataque imunológico, maior entrada de nutrientes, diferenciação celular e modificação do microambiente tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011; PAVLOVA; THOMPSON, 2016). Morfologicamente, as células tumorais podem apresentar núcleos aumentados com forma irregular, nucléolos proeminentes, citoplasma escasso e intensamente corado ou, pelo contrário, excessivamente pálido (BABA; CÂTOI, 2007).

Todas essas alterações celulares junto as mutações que ocorrem no DNA surgem geralmente numa frequência de uma a cada 20 milhões, por gene e por divisão celular. Isso nos leva a pensar que no mundo, os humanos deveriam apresentar frequências semelhantes de cânceres, contudo, as taxas de incidência variam significativamente. Nesse sentido, alguns fatores podem interferir nessa incidência, tais como os hereditários e/ou ambientais, pois se acredita que algumas populações sejam portadoras de genes de suscetibilidade ao câncer, e o ambiente no qual vivem também contribui para a mesma (HEJMADI, 2010).

Tanto o diagnóstico como o tratamento do câncer movimentam altos valores financeiros, tanto para os portadores e a sociedade quanto para os sistemas de saúde, sendo que os fatores desencadeadores dos cânceres não foram ainda completamente elucidados, sem aprofundar em todos os problemas de ordem pessoal, familiar e profissional advindos. Por essa razão, esse tema é de grande interesse dos pesquisadores, que buscam compreender a gênese e as características do câncer, desenvolver métodos diagnósticos cada vez mais simples, que detectem precocemente seu aparecimento, além de terapias seletivas, eficazes e com efeitos adversos reduzidos.



5.2 Epidemiologia

O câncer é considerado um grave problema de saúde mundial, sendo a segunda principal causa de mortalidade no mundo, em torno de 13%, semelhante ao número de mortes anuais provocadas pelo HIV/aids, tuberculose e malária juntas (LÓPEZ-GÓMEZ et al., 2013; WHO, 2020a).

Só em 2018, o câncer foi responsável por 9,6 milhões de mortes (WHO, 2020a). Atualmente, estima-se que ele seja responsável por uma a cada seis mortes no mundo, sendo que em 87 países é a principal causa de morte em homens, e em 26 países em mulheres (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020; WHO, 2020a). A OMS fez uma projeção de 27,5 milhões de novos casos de câncer para o ano de 2040 e 16,3 milhões de mortes pela doença. Os países

em desenvolvimento serão os mais afetados, entre eles o Brasil, com estimativa de 1 milhão de novos casos e 500 mil mortes pela doença para o ano de 2040. Os tipos mais comuns entre homens são os cânceres de pulmão, próstata, colorretal, estômago e fígado, enquanto os de mama, colorretal, pulmão, cervical e tireoide são os mais comuns entre as mulheres (WHO, 2020a). No Brasil, de acordo com a última atualização do Instituto Nacional de Câncer (BRASIL/INCA, 2020), essas taxas são concordantes (Figura 5.1).

Figura 5.1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2020 por sexo.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%		
Próstata	65.840	29,2%	Homens		Mama feminina	66.280	29,7%		
Cólon e reto	20.520	9,1%			Mulheres		Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%		
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%		
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%		
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%		
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%		
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%		
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%		
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%		

Fonte: BRASIL/INCA (2020).

5.3 Câncer de pulmão

Dentre os diferentes tipos de câncer existentes, o de pulmão se destaca devido à sua agressividade, uma vez que a taxa de mortalidade é relativamente próxima à taxa de incidência. Ele acomete um ou ambos os pulmões, formando-se geralmente nas células que revestem as vias aéreas e as glândulas próximas. O câncer de pulmão causa mais mortes do que os de próstata, mama e pâncreas juntos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020; LUNG CANCER RESEARCH FOUNDATION, 2020). Em 2016, ocorreram dois milhões de casos incidentes de câncer de traqueia, brônquios e pulmão, causando 1,7 milhões de mortes por esses em todo o mundo (FITZMAURICE et al., 2018).

Os dois principais tipos são o câncer de pulmão de células pequenas (em inglês, *Small Cells Lung Cancer* - SCLC) e o câncer de pulmão de células não pequenas (em inglês, *Non Small Cells Lung Cancer* - NSCLC) (EUA/NCI, 2020). O SCLC ocorre nas grandes vias aéreas (brônquios primários e secundários) e está fortemente relacionado com o tabagismo. Este é mais

raro, responsável por 10-15% dos diagnósticos; porém, apresenta pior prognóstico, pois geralmente ocorrem metástases (GRIDELLI et al., 2015). O NSCLC é o mais comum, atingindo de 85-90% dos pacientes e pode ser subdividido de acordo com características patológicas em adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma de grandes células. O adenocarcinoma afeta em torno de 90% dos pacientes, e geralmente se desenvolve nas bordas dos pulmões, ou nas células das vias respiratórias. O segundo fenótipo histológico do NSCLC compreende cerca de 10% dos casos e inclui as células escamosas, sendo geralmente detectado nos brônquios. Outros tipos menos comuns desse câncer incluem o pleomórfico, tumor carcinoide, carcinoma de glândula salivar e carcinoma não classificado (GRIDELLI et al., 2015; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020).

Apesar de o tabaco ser considerado um dos principais fatores de risco para o câncer de pulmão, outros riscos podem estar envolvidos, tais como história familiar, altos níveis de poluição do ar, presença de arsênio na água potável, gás radônio, exposição ao mineral asbesto (amianto) e a certos metais (cromo e cádmio), exposição a agentes químicos cancerígenos, tais como urânio, produtos do carvão, gasolina e exaustão de partículas do diesel (BIEN, 2016; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020).

No Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 aponta a ocorrência de 17.760 novos casos de câncer de pulmão em homens e 12.440 em mulheres. Esses valores representam um risco estimado de 16,99 casos novos a cada 100 mil homens, sendo o terceiro tumor mais frequente; e um risco estimado de 11,56 novos casos para cada 100 mil mulheres, o quarto tipo de tumor mais frequente. Geralmente, a ausência de sintomatologia nos estágios iniciais dificulta seu diagnóstico, impossibilitando a cirurgia para a maior parte dos pacientes, sendo que somente 10 a 15% atinge uma taxa de sobrevida de cinco anos. A sua elevada taxa de mortalidade pode ser atribuída ao seu alto potencial metastático e por ser detectado geralmente em estágios avançados, pois a detecção de sintomas nas fases iniciais não é comum (BRASIL/INCA, 2020). Nesse sentido, o arsenal terapêutico utilizado para combater tal doença deve incluir a redução da sobrevivência celular tumoral, em longos períodos (HERBST; MORGENZTERN; BOSHOFF, 2018).

A escolha do tratamento do câncer de pulmão dependerá das características fisiológicas e capacidade funcional individuais, perfil de toxicidade clínica, do tipo de células afetadas (SCLC ou NSCLC), tipo e estágio de desenvolvimento do câncer, além das características moleculares específicas das células tumorais, preferências do paciente e protocolos terapêuticos

institucionais. Em estágios precoces de carcinomas do tipo NSCLC, a cirurgia é usualmente indicada, além da quimioterapia e/ou radioterapia. Quando já existe uma maior progressão do carcinoma, a quimioterapia com fármacos de ação direcionada e/ou a imunoterapia se fazem necessários. Nos casos de câncer do tipo SCLC, geralmente é indicada quimioterapia e/ou radioterapia (SIEGEL et al., 2014; MS, 2020).

Atualmente, existem terapias direcionadas para subtipos moleculares específicos de adenocarcinomas de pulmão, e terapias-alvo em desenvolvimento para os carcinomas escamosos de pulmão (HERBST; MORGENZTERN; BOSHOFF, 2018).

O tratamento padrão de NSCLCs inclui a combinação de cisplatina ou carboplatina com pelo menos um desses fármacos: vinorelbina, gemcitabina, paclitaxel, docetaxel, etoposídeo e pemetrexed. Já para o tratamento de SCLCs geralmente são usadas as seguintes combinações: cisplatina e etoposídeo, carboplatina e etoposídeo, e gemcitabina e carboplatina. O câncer de pulmão do tipo SCLC normalmente responde bem a esses tratamentos, porém os pesquisadores continuam a testar novas combinações em busca de melhores resultados e menores efeitos colaterais (RU/CANCER RESEARCH, 2020). No Brasil, os esquemas terapêuticos para o câncer de pulmão estão descritos segundo a última portaria (nº 957, de 26 de setembro de 2014) do Ministério da Saúde (MS, 2020).

O prognóstico dependerá do estágio de desenvolvimento tumoral, grau de metástase, tipo de câncer de pulmão, nível de mutação genética, presença de sinais e sintomas, tais como tosse e dificuldade para respirar, além da saúde geral do paciente (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020).

REFERÊNCIAS

- AGELIDIS, A. M.; SHUKLA, D. Cell entry mechanisms of HSV: what we have learned in recent years. **Future Virol**, v.10, n.10, p.1145-1154, 2015.
- ÁLVAREZ, D. M.; CASTILLO, E.; DUARTE, L. F., et al. Current antivirals and novel botanical molecules interfering with herpes simplex virus infection. **Front Microbiol**, v.11, p.139, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00139>.
- AMARELLE, L., KATZEN, J., SHIGEMURA, M., et al. Cardiac glycosides decrease influenza virus replication by inhibiting cell protein translational machinery. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v.316, n.6, p.L1094-L1106, 2019.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Lung Cancer**. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer.html>. Acesso em janeiro de 2020.
- ASHBROOK, A. W.; LENTSCHER, A. J.; ZAMORA, P. F., et al. Antagonism of the sodium-potassium ATPase impairs chikungunya virus infection. **MBio**, v.7, n.3, p.e00693-16, 2016.
- AZAB, A.; NASSAR, A.; AZAB, A. N. Anti-inflammatory activity of natural products. **Molecules**, v.21, n.10, pii: E1321, 2016.
- BABA, A. I.; CĂTOI, C. **Comparative Oncology**. Bucharest: The publishing house of the romanian academy, 2007. p. 150.
- BACON, T. H.; LEVIN, M. J.; LEARY, J. J., et al. Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. **Clin Microbiol Rev**, v.16, n.1, p.114-128, 2003.
- BELLO-MORALES, R.; CRESPILO, A. J.; FRAILE-RAMOS, A., et al. Role of the small GTPase Rab27a during herpes simplex virus infection of oligodendrocytic cells. **BMC Microbiol**, v.12, p.265, 2012.
- BERGSTRÖM, T.; TRYBALA, E. Antigenic differences between HSV-1 and HSV-2 glycoproteins and their importance for type-specific serology. **Intervirology**, v.39, n.3, p.176-184, 1996.
- BERRI, F., LÊ, V. B., JANDROT-PERRUS, M., et al. Switch from protective to adverse inflammation during influenza: viral determinants and hemostasis are caught as culprits. **Cell Mol Life Sci**, v.71, n.5, p.885-898, 2014.
- BERTELLI, M.; KIANI, A. K.; PAOLACCI, S., et al. Hydroxytyrosol: A natural compound with promising pharmacological activities. **J Biotechnol**, v.309, p.29-33, 2019.
- BERTOL, J. W.; RIGOTTO, C.; PÁDUA, R. M., et al. Antiherpes activity of glucoevatromonoside, a cardenolide isolated from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata*. **Antiviral Res**, v.92, n.1, p.73-80, 2011.
- BESSEN, H. A. Therapeutic and toxic effects of digitalis: William Withering, 1785. **J Emerg Med**, v.4, n.3, p.243-248, 1986.
- BIEN, M. **Lung Cancer Risk Factors**. 2016. Disponível em: <https://www.healthline.com/health/lung-cancer-risk-factors>. Acesso em: janeiro de 2020.
- BOFF, L.; MUNKERT, J.; OTTONI, F. M., et al. Potential anti-herpes and cytotoxic action of novel semisynthetic digitoxigenin-derivatives. **Eur J Med Chem**, v.167, p.546-561, 2019.
- BOFF, L.; PERSICH, L.; BRAMBILA, P., et al. Investigation of the cytotoxic activity of two novel digitoxigenin analogues on H460 lung cancer cells. **Anti-cancer Drugs**, v.31, n.5, p.452-462, 2020.
- BORKENHAGEN, L. K., SALMAN, M. D., MA, M. J., et al. Animal influenza virus infections in humans: A commentary. **Int J Infect Dis**, v.88, p.113-119, 2019.
- BRADY, R. C.; BERNSTEIN, D. I. Treatment of herpes simplex virus infections. **Antiviral Res**, v.61, n.2, p.73-81, 2004.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer (INCA). **Estimativa 2020**: Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em fevereiro de 2020.

BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S., et al. Herpesviruses. In: BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; MIETZNER, T. A. (Ed.). **Medicinal Microbiology**. 26 ed. New York: The McGraw-Hill Companies, 2013. p.467-489.

BUTLER, M. S.; NEWMAN, D. J. Mother Nature's gifts to diseases of man: the impact of natural products on anti-infective, anticholesteremics and anticancer drug discovery. **Prog Drug Res**, v.65, n.1, p.3-44, 2008.

BUTLER, M. S.; ROBERTSON, A. A.; COOPER, M. A. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. **Nat Prod Rep**, v.31, n.11, p.1612-1661, 2014.

CAI, H.; WANG, H. Y.; VENKATADRI, R., et al. Digitoxin analogues with improved anticytomegalovirus activity. **ACS Med Chem Lett**, v.5, n.4, p.395-399, 2014.

CARRAT, F.; FLAHAULT, A. Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. **Vaccine**, v.25, n.39-40, p.6852-6862, 2007.

CDC. **Centers for Disease Control and Prevention**. 2020. About Flu. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/about/index.html>. Acesso em: janeiro de 2020.

CELUM, C.; WALD, A.; LINGAPPA, J. R., et al. Acyclovir and transmission of HIV-1 from persons infected with HIV-1 and HSV-2. **N Engl J Med**, v.362, n.5, p.427-439, 2010.

CERELLA, C.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Assembling the puzzle of anti-cancer mechanisms triggered by cardiac glycosides. **Mitochondrion**, v.13, n.3, p.225-234, 2013.

CERELLA, C.; MULLER, F.; GAIGNEAUX, A., et al. Early downregulation of Mcl-1 regulates apoptosis triggered by cardiac glycoside UNBS1450. **Cell Death Dis**, v.11, n.6, p.e1782, 2015.

CHATIS, P. A.; CRUMPACKER, C.S. Resistance of herpes viruses to antiviral drugs. **Antimicrob Agents Chemother**, v.36, n.8, p.1589-1595, 1992.

CHEUNG, Y. Y.; CHEN, K. C.; CHEN, H., et al. Antiviral activity of lanatoside C against dengue virus infection. **Antiviral Res**, v.111, p.93-99, 2014.

CHONO, K.; KATSUMATA, K.; KONTANI, T., et al. ASP2151, a novel helicase-primase inhibitor, possesses antiviral activity against varicella-zoster virus and herpes simplex virus types 1 and 2. **J Antimicrob Chemother**, v.65, n.8, p.1733-1741, 2010.

CLAUSEN, T. Clinical and therapeutic significance of the Na⁺,K⁺ pump*. **Clin Sci (Lond)**, v.95, n.1, p.3-17, 1998.

COHEN, T.; WILLIAMS, J. D.; OPPERMAN, T. J., et al. Convallatoxin-induced reduction of methionine import effectively inhibits human cytomegalovirus infection and replication. **J Virol**, v.90, n.23, p.10715-10727, 2016.

COLBÈRE, F. L'Herpèsvirus simplex: structure, réplication et biologie. **Bulletin de L'Institut Pasteur**, v.73, p.203-254, 1975.

CONNOLLY, S. A.; JACKSON, J. O.; JARDETZKY, T. S., et al. Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. **Nat Rev Microbiol**, v.9, n.5, p.369-381, 2011.

DAWOOD, F. S.; IULIANO, A. D.; REED, C., et al. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. **Lancet Infect Dis**, v.12, n.9, p.687-695, 2012.

- DE, S.; BANERJEE, S.; NIRANJAN, B. M., et al. Review on cardiac glycosides in cancer research and cancer therapy. **Indo Am J Pharm Res**, v.6, n.5, p.5391-5400, 2016.
- DE VLUGT, C., SIKORA, K., PELCHAT, M. Insight into influenza: a virus cap-snatching. **Viruses**, v.10, n.11, p.pii:E641, 2018.
- DENG, L.; DAI, P.; CIRO, A., et al. Identification of novel antipoxviral agents: mitoxantrone inhibits vaccinia virus replication by blocking virion assembly. **J Virol**, v.81, n.24, p.13392-13402, 2007.
- DIAS, A.; BOUVIER, D.; CREPIN, T., et al. The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. **Nature**, v.458, n.7240, p.914-918, 2009.
- DIEDERICH, M.; MULLER, F.; CERELLA, C. Cardiac glycosides: from molecular targets to immunogenic cell death. **Biochem Pharmacol**, v.125, p.1-11, 2017.
- DIEDERICH, M. Natural compound inducers of immunogenic cell death. **Arch Pharm Res**, v.42, n.7, p.629-645, 2019.
- DODSON, A. W.; TAYLOR, T. J.; KNIPE, D. M., et al. Inhibitors of the sodium potassium ATPase that impair herpes simplex virus replication identified via a chemical screening approach. **Virology**, v.366, n.2, p.340-348, 2007.
- EL-SEEDI, H. R.; KHALIFA, S. A. M.; TAHER, E. A., et al. Cardenolides: Insights from chemical structure and pharmacological utility. **Pharmacol Res**, v.141, p.123-175, 2019.
- EUA. Estados Unidos da América. **National Cancer Institute (NCI): Lung Cancer**. Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/lung>. Acesso em janeiro de 2020.
- FARAH, M. A.; ALI, M. A.; CHEN, S. M., et al. Silver nanoparticles synthesized from *Adenium obesum* leaf extract induced DNA damage, apoptosis and autophagy via generation of reactive oxygen species. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v.141, p.158-169, 2016.
- FITZMAURICE, C.; AKINYEMIJU, T. F.; AL LAMI, F. H., et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 29 cancer groups, 1990 to 2016: A systematic analysis for the global burden of disease study. **JAMA Oncol**, v.4, n.11, p.1553-1568, 2018.
- FORSQREN, M.; KLAPPER, P. E. Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2. In: ZUCKERMAN, A. J.; BANATVALA, J. E.; SCHOUB, B. D.; GRIFFITHS, P. D.; MORTIMER, P. (Ed.). **Principles and Practice of Clinical Virology**. 6 ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2009. p.95-131.
- FOUCHIER, R. A.; MUNSTER, V.; WALLENSTEN, A., et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. **J Virol**, v.79, n.5, p.2814-2822, 2005.
- FURUTA, Y.; KOMENO, T.; NAKAMURA, T. Favipiravir (T-705), a broad-spectrum inhibitor of viral RNA polymerase. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci**, v.93, n.7, p.449-463, 2017.
- GAO, R; CAO, B; HU, Y, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. **N Engl J Med**, v.368, n.20, p.1888-1897, 2013.
- GARDNER, T. J.; COHEN, T.; REDMANN, V., et al. Development of a high-content screen for the identification of inhibitors directed against the early steps of the cytomegalovirus infectious cycle. **Antiviral Res**, v.113, p.49-61, 2015.
- GARLAND, S. M.; STEBEN, M. Genital herpes. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v.28, n.7, p.1098-1110, 2014.
- GOTO, A.; ISHIGURO, T.; YAMADA, K., et al. Isolation of a urinary digitalis-like factor indistinguishable from digoxin. **Biochem Biophys Res Commun**, v.173, n.3, p.1093-1101, 1990.

- GRIDELLI, C.; ROSSI, A.; CARBONE, D. P., et al. Non-small-cell lung cancer. **Nat Rev Dis Primers**, v.1, p.15009, 2015.
- GRIENKE, U.; SCHMIDTKE, M.; KIRCHMAIR, J., et al. Antiviral potential and molecular insight into neuraminidase inhibiting diarylheptanoids from *Alpinia katsumadai*. **J Med Chem**, v.53, p.778-786, 2010.
- GROSSO, F.; STOILOV, P.; LINGWOOD, C., et al. Suppression of adenovirus replication by cardiotonic steroids. **J Virol**, v.91, n.3, pii:e01623-16, 2017.
- GRUNEWALD, K.; DESAI, P.; WINKLER, D. C., et al. Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. **Science**, v.302, n.5649, p.1396-1398, 2003.
- GUPTA, R.; WARREN, T.; WALD, A. Genital herpes. **Lancet**, v.370, n.9605, p.2127-2137, 2007.
- HAGEN, C.; DENT, K. C.; ZEEV-BEN-MORDEHAI, T., et al. Structural basis of vesicle formation at the inner nuclear membrane. **Cell**, v.163, n.7, p.1692-1701, 2015.
- HAMILTON, B. S.; WHITTAKER, G. R.; DANIEL, S. Influenza virus-mediated membrane fusion: determinants of hemagglutinin fusogenic activity and experimental approaches for assessing virus fusion. **Viruses**, v.4, n.7, p.1144-1168, 2012.
- HAMLIN, J. M.; BLAUSTEIN, M. P.; BOVA, S., et al. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.88, n.14, p.6259-6263, 1991.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.144, n.5, p.646-674, 2011.
- HARDY, W. R.; SANDRI-GOLDIN, R. M. Herpes simplex virus inhibits host cell splicing, and regulatory protein ICP27 is required for this effect. **J Virol**, v.68, n.12, p.7790-7799, 1994.
- HARTLEY, C.; HARTLEY, M.; PARDOE, I., et al. Ionic Contra-Viral Therapy (ICVT); a new approach to the treatment of DNA virus infections. **Arch Virol**, v.151, n.12, p.2495-2501, 2006.
- HAUSE, B. M.; DUCATEZ, M.; COLLIN, E. A., et al. Isolation of a novel swine influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza C viruses. **PLoS Pathog**, v.9, n.2, p.e1003176, 2013.
- HAUX, J.; KLEPP, O.; SPIGSET, O., et al. Digitoxin medication and cancer; case control and internal dose-response studies. **BMC Cancer**, v.1, p.11, 2001.
- HEJMADI, M. **Introduction to Cancer Biology**. New York: Momna Hejmadi & Ventus Publishing: ApS, 2010. p.46.
- HEMING, J. D.; CONWAY, J. F.; HOMA, F. L. Herpesvirus capsid assembly and DNA packaging. **Adv Anat Embryol Cell Biol**, v.223, p.119-142, 2017.
- HENARY, H. A.; KURZROCK, R.; FALCHOOK, G. S., et al. Final results of a first-in-human phase I trial of PBI-05204, an inhibitor of AKT, FGF-2, NF-Kb, and p70S6K in advanced cancer patients. **J Clin Oncol**, v.29, p.3023, 2011.
- HERBST, R. S.; MORGENZTERN, D.; BOSHOFF, C. The biology and management of non-small cell lung cancer. **Nature**, v.553, n.7689, p.446-454, 2018.
- HOFFMANN, H. H.; PALESE, P.; SHAW, M. L. Modulation of influenza virus replication by alteration of sodium ion transport and protein kinase C activity. **Antiviral Res**, v.80, n.2, p.124-134, 2008.

- HOFFMANN-LA ROCHE (ROCHE). **Roche announces FDA approval of Xofluza (baloxavir marboxil) for influenza**. 2018. Disponível em: <https://www.roche.com/investors/updates/inv-update-2018-10-24.htm>. Acesso em dezembro de 2019.
- HONG, D. S.; HENARY, H.; FALCHOOK, G. S., et al. First-in-human study of PBI-05204, an oleander-derived inhibitor of akt, fgf-2, nf-kappaBeta and p70s6k, in patients with advanced solid tumors. **Invest New Drugs**, v.32, n.6, p.1204-1212, 2014.
- HOOPEES, G. M.; HAMILTON, J. P.; KIM, J., et al. Genome assembly and annotation of the medicinal plant *Calotropis gigantea*, a producer of anticancer and antimalarial cardenolides. **G3 (Bethesda)**, v.8, n.2, p.385-391, 2018.
- HSU, I. L.; CHOU, C. Y.; WU, Y. Y., et al. Targeting FXYD2 by cardiac glycosides potently blocks tumor growth in ovarian clear cell carcinoma. **Oncotarget**, v.7, n.39, p.62925-62938, 2016.
- HURT, A. C.; HARDIE, K.; WILSON, N. J., et al. Community transmission of oseltamivir-resistant A(H1N1)pdm09 influenza. **N Engl J Med**, v.365, n.26, p.2541-2542, 2011.
- HUTCHINSON, E.; FODOR, E. Transport of the influenza virus genome from nucleus to nucleus. **Viruses**, v.5, n.10, p.2424-2446, 2013.
- ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses. **Virus Taxonomy: 2018b Release**. 2018. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>. Acesso em: janeiro de 2020.
- JACOB, A.; SOOD, R.; CHANU, Kh.V., et al. Amantadine resistance among highly pathogenic avian influenza viruses (H5N1) isolated from India. **Microb Pathog**, v.91, p.35-40, 2016.
- JUNCKER, T.; SCHUMACHER, M.; DICATO, M., et al. UNBS1450 from *Calotropis procera* as a regulator of signaling pathways involved in proliferation and cell death. **Biochem Pharmacol**, v.78, n.1, p.1-10, 2009.
- KALU, N. N.; DESAI, P. J.; SHIRLEY, C. M., et al. Nelfinavir inhibits maturation and export of herpes simplex virus 1. **J Virol**, v.88, n.10, p.5455-5461, 2014.
- KANG, M. A.; KIM, M. S.; KIM, W., et al. Lanatoside C suppressed colorectal cancer cell growth by inducing mitochondrial dysfunction and increased radiation sensitivity by impairing DNA damage repair. **Oncotarget**, v.7, n.5, p.6074-6087, 2016.
- KELLY, R. B.; DANIELS, E. G.; SPAULDING, L. B. Cytotoxicity of cardiac principles. **J Med Chem**, v.8, n.4, p.547-548, 1965.
- KLIMOV, A. I.; ROCHA, E.; HAYDEN, F. G., et al. Prolonged shedding of amantadine-resistant influenza A viruses by immunodeficient patients: Detection by polymerase chain reaction-restriction analysis. **J Infect Dis**, v.172, p.1352-1355, 1995.
- KREIS, W. The Foxgloves (*Digitalis*) revisited. **Planta Med**, v.83, n.12-13, p.962-976, 2017.
- KUKHANOVA, M. K.; KOROVINA, A. N.; KOCHETKOV, S. N. Human herpes simplex virus: life cycle and development of inhibitors. **Biochemistry (Mosc)**, v.79, n.13, p.1635-1652, 2014.
- KIYOHARA, H.; ICHINO, C.; KAWAMURA, Y., et al. *In vitro* anti-influenza virus activity of a cardiotonic glycoside from *Adenium obesum* (Forssk.). **Phytomedicine**, v.19, n.2, p.111-114, 2012.
- LEE, K. H. Discovery and development of natural product-derived chemotherapeutic agents based on a medicinal chemistry approach. **J Nat Prod**, v.73, n.3, p.500-516, 2010.
- LEFRANC, F.; MIJATOVIC, T.; KONDO, Y., et al. Targeting the alpha 1 subunit of the sodium pump to combat glioblastoma cells. **Neurosurgery**, v.62, n.1, p.211-221, 2008.
- LEGOFF, J.; PÉRE, H.; BÉLEC, L. Diagnosis of genital herpes simplex virus infection in the clinical laboratory. **Virol J**, v.11, p.83, 2014.

- LENEVA, I. A.; BURTSEVA, E. I.; YATSYSHINA, S. B., et al. Virus susceptibility and clinical effectiveness of anti-influenza drugs during the 2010-2011 influenza season in Russia. **Int J Infect Dis**, v.43, p.77-84, 2016.
- LIU, S.; HOMA, F. L. Atomic structure of the herpes simplex virus 1 DNA polymerase. In: CAMERON, C. E.; GÖTTE, M.; RANEY, K. D. (Ed.). **Viral genome replication**. New York: Springer, 2009. p.363-382.
- LIU, T.; WANG, X.; HE, Y. L., et al. *In vivo* and *in vitro* anti-arthritic effects of cardenolide-rich and caffeoylquinic acid-rich fractions of *Periploca forrestii*. **Molecules**, v.23, n.8, pii:E1988, 2018.
- LOOKER, K. J.; MAGARET, A. S.; MAY, M. T., et al. Global and regional estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 1 infections in 2012. **PLoS One**, v.10, n.10, p.e0140765, 2015a.
- LOOKER, K. J.; MAGARET, A. S.; TURNER, K. M., et al. Global estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 2 infections in 2012. **PLoS One**, v.10, n.1, p.e114989, 2015b.
- LÓPEZ-GÓMEZ, M.; MALMIERCA, E.; DE GORGOLAS, M., et al. Cancer in developing countries: the next most preventable pandemic. The global problem of cancer. **Crit Rev Oncol Hematol**, v.88, n.1, p.117-122, 2013.
- LULIANO, O. D.; ROGUSKI, K. M.; CHANG, H. H., et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. **Lancet**, v.391, n.10127, p.1285-1300, 2018.
- Lung Cancer Research Foundation**. Disponível em: <https://www.lungcancerresearchfoundation.org/>. Acesso em: janeiro de 2020.
- LUPI, O.; PEREIRA JR, A. C. Herpes Simples. In: LUPI, O.; DA SILVA, A. G.; PEREIRA JR, A. C. (Ed.). **HERPES - Clínica, Diagnóstico e Tratamento**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2000. p.43-70.
- MAIR, C. M.; LUDWIG, K.; HERRMANN, A., et al. Receptor binding and pH stability - how influenza A virus hemagglutinin affects host-specific virus infection. **Biochim Biophys Acta**, v.1838, n.4, p.1153-1168, 2014.
- MAMIDYALA, S. K.; FIRESTINE, S. M. Advances in herpes simplex virus antiviral therapies. **Expert Opin Ther Pat**, v.16, n.11, p.1463-1480, 2006.
- MATOS, A. R.; RESENDE, P. C.; MIRANDA, M. D., et al. Susceptibility of Brazilian influenza A(H1N1)pdm09 viruses to neuraminidase inhibitors in the 2014-2016 seasons: Identification of strains bearing mutations associated with reduced inhibition profile. **Antiviral Res**, v.154, p.35-43, 2018.
- MATHIEU, V.; PIRKER, C.; MARTIN DE LASSALLE, E., et al. The sodium pump alpha1 sub-unit: A disease progression-related target for metastatic melanoma treatment. **J Cell Mol Med**, v.13, n.9B, p.3960-3972, 2009.
- MATROSOVICH, M. N.; MATROSOVICH, T. Y.; GRAY, T., et al. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. **J Virol**, v.78, n.22, p.12665-12667, 2004.
- MCALLISTER, S. C.; SCHLEISS, M. R. Prospects and perspectives for development of a vaccine against herpes simplex virus infections. **Expert Rev Vaccines**, v.13, n.11, p.1349-1360, 2014.
- MEDINA, R. A., GARCIA-SASTRE, A. Influenza A viruses: new research developments. **Nat Rev Microbiol**, v.9, n.8, p.590-603, 2011.
- MEIJER, A.; LACKENBY, A.; HUNGNES, O., et al. Oseltamivir-resistant influenza virus A (H1N1), Europe, 2007-08 season. **Emerg Infect Dis**, v.15, n.4, p.552-560, 2009.
- MEKHAIL, T.; KAUR, H.; GANAPATHI, R., et al. Phase 1 trial of Anvirzel in patients with refractory solid tumors. **Invest New Drugs**, v.24, n.5, p.423-427, 2006.

- MENGER, L.; VACCHELLI, E.; ADJEMIAN, S., et al. Cardiac glycosides exert anticancer effects by inducing immunogenic cell death. **Sci Transl Med**, v.4, n.143, p.143ra99, 2012.
- MENGER, L.; VACCHELLI, E.; KEPP, O., et al. Trial watch: Cardiac glycosides and cancer therapy. **Oncoimmunology**, v.2, n.2, p.e23082, 2013.
- MICHALAK, M.; MICHALAK, K.; WICHA, J. The synthesis of cardenolide and bufadienolide aglycones, and related steroids bearing a heterocyclic subunit. **Nat Prod Rep**, v.34, n.4, p.361-410, 2017.
- MIJATOVIC, T.; KISS, R. Cardiotonic steroids-mediated Na⁺/K⁺-ATPase targeting could circumvent various chemoresistance pathways. **Planta Med**, v.79, n.3-4, p.189-198, 2013.
- MIJATOVIC, T.; ROLAND, I.; VAN QUAQUEBEKE, E., et al. The alpha1 subunit of the sodium pump could represent a novel target to combat non-small cell lung cancers. **J Pathol**, v.212, n.2, p.170-179, 2007.
- MS. **Ministério da Saúde**. 2020. Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas – PCDT para o tratamento do câncer de pulmão. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/29/Portaria-SAS-DDT-Pulmao-23-09-2014.pdf>. Acesso em: janeiro de 2020.
- MORFIN, F.; THOUVENOT, D. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. **J Clin Virol**, v.26, n.1, p.29-37, 2003.
- MOSCONA, A. Neuraminidase inhibitors for influenza. **N Engl J Med**, v.353, n.13, p.1363-1373, 2005.
- MUNKERT, J.; SANTIAGO FRANCO, M.; NOLTE, E., et al. Production of the cytotoxic cardenolide glucoevatromonoside by semisynthesis and biotransformation of evatromonoside by a *Digitalis lanata* cell culture. **Planta Med**, v.83, n.12-13, p.1035-1043, 2017.
- NAVID, M. H.; LASZCZYK-LAUER, M. N.; REICHLING, J., et al. Pentacyclic triterpenes in birch bark extract inhibit early step of herpes simplex virus type 1 replication. **Phytomedicine**, v.21, n.11, p.1273-1280, 2014.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J Nat Prod**, v.70, n.3, p.461-477, 2007.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J Nat Prod**, v.75, n.3, p.311-335, 2012.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **J Nat Prod**, v.79, n.3, p.629-661, 2016.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **J Nat Prod**, v.83, n.3, p.770-803, 2020.
- NOLTE, E.; WACH, S.; SILVA, I. T., et al. A new semisynthetic cardenolide analog 3β-[2-(1-amantadine)-1-on-ethylamine]-digitoxigenin (AMANTADIG) affects G2/M cell cycle arrest and miRNA expression profiles and enhances proapoptotic survivin-2B expression in renal cell carcinoma cell lines. **Oncotarget**, v.8, n.7, p.11676-11691, 2017.
- NORRIS, M. J.; MALHI, M.; DUAN, W., et al. Targeting intracellular ion homeostasis for the control of respiratory syncytial virus. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.59, n.3, p.733-744, 2018.
- NOSHI, T.; KITANO, M.; TANIGUCHI, K., et al. *In vitro* characterization of baloxavir acid, a first-in-class cap-dependent endonuclease inhibitor of the influenza virus polymerase PA subunit. **Antiviral Res**, v.160, p.109-117, 2018.
- OSTERHAUS, A. D.; RIMMELZWAAN, G. F.; MARTINA, B. E., et al. Influenza B virus in seals. **Science**, v.288, n.5468, p.1051-1053, 2000.

- PARK, D.; LALLI, J.; SEDLACKOVA-SLAVIKOVA, L., et al. Functional comparison of herpes simplex virus 1 (HSV-1) and HSV-2 ICP27 homologs reveals a role for ICP27 in virion release. **J Virol**, v.89, n.5, p.2892-2905, 2015.
- PATTERSON, D. K.; PYLE, G. F. The geography and mortality of the 1918 influenza pandemic. **Bull Hist Med**, v.65, n.1, p.4-21, 1991.
- PATHAK, S.; MULTANI, A. S.; NARAYAN, S., et al. Anvirzel, an extract of *Nerium oleander*, induces cell death in human but not murine cancer cells. **Anticancer Drugs**, v.11, n.6, p.455-463, 2000.
- PAVLOVA, N. N.; THOMPSON, C. B. The emerging hallmarks of cancer metabolism. **Cell Metab**, v.23, n.1, p.27-47, 2016.
- PONGRAKHANANON, V. Anticancer properties of cardiac glycosides. In: RANGEL, L. (Ed.). **Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches**. Rijeka: InTech, 2013. p.618-630.
- PONGRAKHANANON, V.; STUECKLE, T. A.; WANG, H. L., et al. Monosaccharide digitoxin derivative sensitize human non-small cell lung cancer cells to anoikis through Mcl-1 proteasomal degradation. **Biochem Pharmacol**, v.88, p.23-35, 2014.
- PRASSAS, I.; DIAMANDIS, E. P. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. **Nat Rev Drug Discov**, v.7, n.11, p.926-935, 2008.
- PRICHARD, M. N.; KERN, E. R.; HARTLINE, C. B., et al. CMX001 potentiates the efficacy of acyclovir in herpes simplex virus infections. **Antimicrob Agents Chemother**, v.55, n.10, p.4728-4734, 2011.
- PRINCIPI, N.; CAMILLONI, B.; ALUNNO, A., et al. Drugs for influenza treatment: Is there significant news? **Front Med (Lausanne)**, v.6, p.109, 2019.
- PSHENICHNAYA, N. Y.; BULGAKOVA, V. A.; LVOV, N. I., et al. Clinical efficacy of umifenovir in influenza and ARVI (study ARBITR). **Ter Arkh**, v.91, n.3, p.56-63, 2019.
- QUENELLE, D. C.; LAMPERT, B.; COLLINS, D. J., et al. Efficacy of CMX001 against herpes simplex virus infections in mice and correlations with drug distribution studies. **J Infect Dis**, v.202, n.10, p.1492-1499, 2010.
- RABELO, V. W.; ROMEIRO, N. C.; PAIXÃO, I. C. N. P., et al. Mechanism of resistance to acyclovir in thymidine kinase mutants from Herpes simplex virus type 1: a computational approach. **J Biomol Struct Dyn**, v.13, p.1-12, 2019.
- RADOGNA, F.; CERELLA, C.; GAIGNEAUX, A., et al. Cell type-dependent ROS and mitophagy response leads to apoptosis or necroptosis in neuroblastoma. **Oncogene**, v.35, n.29, p.3839-3853, 2016.
- RAHIMTOOLA, S. H.; TAK, T. The use of digitalis in heart failure. **Curr Probl Cardiol**, v.21, n.12, p.781-853, 1996.
- RATES, S. M. K.; BRIDI, R.; BRAGA, F. C., et al. Heterosídeos cardioativos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Ed.). **Farmacognosia - Do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, v.I, 2017. p.271-284.
- RU. Reino Unido (RU). 2020. **Cancer Research UK: Lung cancer – Chemotherapy treatment**. Disponível em: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/lung-cancer/treatment/chemotherapy/about-chemotherapy-for-lung-cancer#5dQmQFdA51T0SOkD.99>. Acesso em: janeiro de 2020.
- RHODE, L. E.; FUCHS, F. D. Fármacos usados em insuficiência cardíaca. In: FUCHS, F. D.; WANMACHER, L. (Ed.). **Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p.862-875.

- RICHTER, M.; SCHUMANN, L.; WALTHER, E., et al. Complementary assays helping to overcome challenges for identifying neuraminidase inhibitors. **Future Virol**, v.10, n.2, p.77-88, 2015.
- RIGANTI, C.; CAMPIA, I.; KOPECKA, J., et al. Pleiotropic effects of cardioactive glycosides. **Curr Med Chem**, v.18, n.6, p.872-885, 2011.
- ROIZMAN, B.; KNIPE, D. M.; WHITLEY, R. J. Herpes simplex viruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; COHEN, J. I.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; RACANIELLO, V. R.; ROIZMAN, B. (Ed.). **Fields Virology**. 6 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v.I, 2013. p.1823-1897.
- SALEZ, N.; MÉLADE, J.; PASCALIS, H., et al. Influenza C virus high seroprevalence rates observed in 3 different population groups. **J Infect**, v.69, n.2, p.182-189, 2014.
- SCHNEIDER, N. F. Z.; CERELLA, C.; LEE, J. Y., et al. Cardiac glycoside glucoevatromonoside induces cancer type-specific cell death. **Front Pharmacol**, v.9, n.70, p.1-17, 2018a.
- SCHNEIDER, N. F. Z.; PERSICH, L.; ROCHA, S. C., et al. Cytotoxic and cytostatic effects of digitoxigenin monodigitoxoside (DGX) in human lung cancer cells and its link to Na,K-ATPase. **Biomed Pharmacother**, v.97, p.684-696, 2018b.
- SCHNEIDER, N. F. Z.; SILVA, I. T.; PERSICH, L., et al. Cytotoxic effects of the cardenolide convallatoxin and its Na,K-ATPase regulation. **Mol Cell Biochem**, v.428, n.1-2, p.23-39, 2017a.
- SCHNEIDER, N. F. Z.; CERELLA, C.; SIMÕES, C. M. O., et al. Anticancer and immunogenic properties of cardiac glycosides. **Molecules**, v.22, n.11, p.E1932, 2017b.
- SCHNEIDER, N. F. Z.; GELLER, F. C.; PERSICH, L., et al. Inhibition of cell proliferation, invasion and migration by the cardenolides digitoxigenin monodigitoxoside and convallatoxin in human lung cancer cell line. **Nat Prod Res**, v.30, n.11, p.1327-1331, 2016.
- SCHOLTISSEK, C.; ROHDE, W.; VON HOYNINGEN, V., et al. On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. **Virology**, v.87, n.1, p.13-20, 1978.
- SCHUPPE, H. C.; MEINHARDT, A.; ALLAM, J. P., et al. Chronic orchitis: a neglected cause of male infertility? **Andrologia**, v.40, n.2, p.84-91, 2008.
- SHAW, L. M.; PALESE, P. *Orthomyxoviridae*. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; COHEN, J. I.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; RACANIELLO, V. R.; ROIZMAN, B. (Ed.). **Fields Virology**. 6 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v.I, 2013. p.1151-1185.
- SHIRAISHI, K.; MITAMURA, K.; SAKAI-TAGAWA, Y., et al. High frequency of resistant viruses harboring different mutations in amantadine-treated children with influenza. **J Infect Dis**, v.188, p.57-61, 2003.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2020. **CA Cancer J Clin**, v.70, n.1, p.7-30, 2020.
- SIEGEL, R.; MA, J.; ZOU, Z., et al. Cancer statistics, 2014. **CA Cancer J Clin**, v.64, n.1, p.9-29, 2014.
- SILVA, I. T.; MUNKERT, J.; NOLTE, E., et al. Cytotoxicity of AMANTADIG - a semisynthetic digitoxigenin derivative - alone and in combination with docetaxel in human hormone-refractory prostate cancer cells and its effect on Na⁺/K⁺-ATPase inhibition. **Biomed Pharmacother**, v.107, p.464-474, 2018.
- SIMONSEN, L.; CLARKE, M. J.; WILLIAMSON, G. D., et al. The impact of influenza epidemics on mortality: introducing a severity index. **Am J Public Health**, v.87, n.12, p.1944-1950, 1997.
- SINGH, S.; SHENOY, S.; NEHETE, P. N., et al. *Nerium oleander* derived cardiac glycoside oleandrin is a novel inhibitor of HIV infectivity. **Fitoterapia**, v.84, p.32-39, 2013.
- SLINGERLAND, M.; CERELLA, C.; GUCHELAAR, H. J., et al. Cardiac glycosides in cancer therapy: from preclinical investigations towards clinical trials. **Invest New Drugs**, v.31, n.4, p.1087-1094, 2013.

- SMITH, J. A.; MADDEN, T.; VIJESWARAPU, M., et al. Inhibition of export of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) from the prostate cancer cell lines PC3 and DU145 by Anvirzel and its cardiac glycoside component, oleandrin. **Biochem Pharmacol**, v.62, n.4, p.469-472, 2001.
- SODEIK, B.; EBERSOLD, M. W.; HELENIUS, A. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. **J Cell Biol**, v.136, n.5, p.1007-1021, 1997.
- SOEMA, P. C.; KOMPIER, R.; AMORIJ, J. P., et al. Current and next generation influenza vaccines: formulation and production strategies. **Eur J Pharm Biopharm**, v.94, p.251-263, 2015.
- SPEAR, P. G. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. **Cell Microbiol**, v.6, n.5, p.401-410, 2004.
- STEINER, I.; KENNEDY, P. G.; PACHNER, A. R. The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster. **Lancet Neurol**, v.6, n.11, p.1015-1028, 2007.
- STENKVIST, B. Cardenolides and cancer. **Anti-cancer Drugs**, v.12, n.7, p.635-638, 2001.
- STENKVIST, B.; BENGTSSON, E.; ERIKSSON, O., et al. Cardiac glycosides and breast cancer. **Lancet**, v.1, n.8115, p.563, 1979.
- SU, C. T.; HSU, J. T.; HSIEH, H. P., et al. Anti-HSV activity of digitoxin and its possible mechanisms. **Antiviral Res**, v.79, n.1, p.62-70, 2008.
- SU, S.; FU, X.; LI, G., et al. Novel Influenza D virus: epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. **Virulence**, v.8, n.8, p.1580-1591, 2017.
- TAKASHITA, E.; EJIMA, M.; ITOH, R., et al. A community cluster of influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013. **Euro Surveill**, v.19, n.1, pii:20666, 2014.
- TE VELTHUIS, A. J.; FODOR, E. Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis. **Nat Rev Microbiol**, v.14, n.8, p.479-493, 2016.
- TYMIAK, A. A.; NORMAN, J. A.; BOLGAR, M., et al. Physicochemical characterization of a ouabain isomer isolated from bovine hypothalamus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.90, n.17, p.8189-8193, 1993.
- VAN DER KOLK, T.; DILLINGH, M. R.; RIJNEVELD, R., et al. Topical ionic contra-viral therapy comprised of digoxin and furosemide as a potential novel treatment approach for common warts. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v.31, n.12, p.2088-2090, 2017.
- VAN QUAQUEBEKE, E.; SIMON, G.; ANDRÉ, A., et al. Identification of a novel cardenolide (2"-oxovoruscharin) from *Calotropis procera* and the hemisynthesis of novel derivatives displaying potent *in vitro* antitumor activities and high *in vivo* tolerance: structure-activity relationship analyses. **J Med Chem**, v.48, n.3, p.849-856, 2005.
- VON ITZSTEIN, M. The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. **Nat Rev Drug Discov**, v.6, n.12, p.967-974, 2007.
- WALD, A.; COREY, L.; TIMMLER, B., et al. Helicase-primase inhibitor pritelivir for HSV-2 infection. **N Engl J Med**, v.370, n.3, p.201-210, 2014.
- WATANABE, D. Medical application of herpes simplex virus. **J Dermatol Sci**, v.57, n.2, p.75-82, 2010.
- WEBSTER, R. G.; BEAN, W. J. Jr. Genetics of Influenza virus. **Annu Rev Genet**, v.12, p.415-431, 1978.
- WEINSTOCK, D. M.; ZUCCOTTI, G. The evolution of influenza resistance and treatment. **JAMA**, v.301, p.1066-1069, 2009.

- WINNICKA, K.; BIELAWSKI, K.; BIELAWSKA, A. Cardiac glycosides in cancer research and cancer therapy. **Acta Pol Pharm**, v.63, n.2, p.109-115, 2006.
- WONG, R. W.; BALACHANDRAN, A.; OSTROWSKI, M. A., et al. Digoxin suppresses HIV-1 replication by altering viral RNA processing. **PLoS Pathog**, v.9, n.3, p.e1003241, 2013.
- WONG, R. W.; LINGWOOD, C. A.; OSTROWSKI, M. A., et al. Cardiac glycoside/aglycones inhibit HIV-1 gene expression by a mechanism requiring MEK1/2-ERK1/2 signaling. **Sci Rep**, v.8, n.1, p.850, 2018.
- WHO. **World Health Organization**. 2020a. Cancer. Disponível em: <http://www.who.int/topics/cancer/en/>. Acesso em: janeiro de 2020.
- WHO. **World Health Organization**. 2020b. Herpes simplex virus. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>. Acesso em: janeiro de 2020.
- WHO. **World Health Organization**. 2020c. Influenza (Seasonal). Disponível em: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)). Acesso em: janeiro de 2020.
- WHO. **World Health Organization**. 2020d. Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS). Disponível em: https://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/en/. Acesso em: janeiro de 2020.
- WHO. **World Health Organization**. 2020e. WHO recommendations on the composition of influenza virus vaccines. Disponível em: <https://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/en/>. Acesso em: janeiro de 2020.
- XU, J.; GUO, Y.; SUI, T., et al. Molecular mechanisms of anti-oxidant and anti-aging effects induced by convallatoxin in *Caenorhabditis elegans*. **Free Radic Res**, v.51, n.5, p.529-544, 2017.
- XU, X.; LINDSTROM, S. E.; SHAW, M. W., et al. Reassortment and evolution of current human influenza A and B viruses. **Virus Res**, v.103, n.1-2, p.55-60, 2004.
- XU, X.; WU, Y.; HU, M., et al. Novel natural product-like caged xanthenes bearing a carbamate moiety exhibit antitumor potency and anti-angiogenesis activity *in vivo*. **Sci Rep**, v.6, p.35771, 2016.
- YANG, C. W.; CHANG, H. Y.; HSU, H. Y., et al. Identification of anti-viral activity of the cardenolides, Na⁺/K⁺-ATPase inhibitors, against porcine transmissible gastroenteritis virus. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.332, p.129-137, 2017.
- YANG, C. W.; CHANG, H. Y.; LEE, Y. Z., et al. The cardenolide ouabain suppresses coronaviral replication via augmenting a Na⁺/K⁺-ATPase-dependent PI3K_PDK1 axis signaling. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.356, p.90-97, 2018.
- YOON, S. W.; WEBBY, R. J.; WEBSTER, R. G. Evolution and ecology of influenza A viruses. **Curr Top Microbiol Immunol**, v.385, p.359-375, 2014.
- ZAMBON, M. Influenza and other emerging respiratory viruses. **Medicine**, v.42, n.1, p.45-51, 2014.
- ZEEV-BEN-MORDEHAI, T.; WEBERRUSS, M.; LORENZ, M., et al. Crystal structure of the herpesvirus nuclear egress complex provides insights into inner nuclear membrane remodeling. **Cell Rep**, v.13, n.12, p.2645-2652, 2015.
- ZEITLIN, P. L.; DIENER-WEST, M.; CALLAHAN, K. A., et al. Digitoxin for airway inflammation in cystic fibrosis: preliminary assessment of safety, pharmacokinetics, and dose finding. **Ann Am Thorac Soc**, v.14, n.2, p.220-229, 2017.
- ZHENG, W.; TAO, Y. J. Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex. **FEBS Lett**, v.587, n.8, p.1206-1214, 2013.

POTENCIAL AÇÃO ANTI-HERPES E ANTITUMORAL DE NOVOS DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DA DIGITOXIGENINA

APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO 1

Neste capítulo serão apresentados os resultados relativos às triagens anti-herpética e citotóxica de 16 novos derivados semissintéticos de cardenolídeos, na forma de um artigo. Esse manuscrito foi aceito pela revista *European Journal of Medicinal Chemistry*, fator de impacto JCR 4,816, Qualis Capes A2.

BOFF, L.; MUNKERT, J.; OTTONI, F. M.; SCHNEIDER, N. F. Z.; RAMOS, G. S.; KREIS, W.; ANDRADE, S. F.; SOUZA FILHO, J. D.; BRAGA, F. C.; ALVES, R. J.; PÁDUA, R. M.; SIMÕES, C. M. O. Potential anti-herpes and cytotoxic action of novel semisynthetic digitoxigenin-derivatives. **Eur J Med Chem**, v.167, p.546-561, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.076>.

Segue abaixo o link para consulta:

<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0223523419300960?token=2B14A4047F45178EFE84100F646BCF9C4BA486FCD5688A6BFB38679D2BC1EE840F8472BD394C394BC8ED116445F40734>

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE DOIS NOVOS ANÁLOGOS DA DIGITOXIGENINA (C10 E C11) EM CÉLULAS DE CÂNCER DE PULMÃO H460

APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO 2

Neste capítulo serão apresentados, na forma de um artigo, os resultados relativos à elucidação do mecanismo de ação antitumoral do derivado semissintético da digitoxigenina, que se destacou na etapa de triagem (composto **C10**). Esse manuscrito foi aceito pela revista *Anti-Cancer Drugs*, fator de impacto JCR 1,784, Qualis Capes B1.

BOFF, L.; PERSICH, L.; BRAMBILA, P.; OTTONI, F. M.; MUNKERT, J.; RAMOS, G.S.; VIANA, A .R. S.; KREIS, W.; BRAGA, F. C.; ALVES, R. J.; PÁDUA, R. M.; SCHNEIDER, N. F. Z.; SIMÕES, C. M. O. Investigation of the cytotoxic activity of two novel digitoxigenin analogues on H460 lung cancer cells. *Anti-Cancer Drugs*, v.31, n.5, p.452-462, 2020.

Segue abaixo o link para consulta:

https://journals.lww.com/anti-cancerdrugs/Abstract/2020/06000/Investigation_of_the_cytotoxic_activity_of_two.3.aspx

ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTI-HERPES DE DOIS NOVOS DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS (C10 E C11) DE CARDENOLÍDEOS

APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO 3

Neste capítulo serão apresentados, na forma de um artigo, os resultados relativos à elucidação do mecanismo de ação anti-herpética dos dois derivados semissintéticos de cardenolídeos, que se mostraram mais ativos na etapa de triagem (compostos **C10** e **C11**). Esse manuscrito foi aceito pela revista *Archives of Virology*, fator de impacto JCR 2,261, Qualis Capes B1.

BOFF, L.; SCHNEIDER, N. F. Z.; MUNKERT, J.; OTTONI, F. M.; RAMOS, G. S.; KREIS, W.; BRAGA, F. C.; ALVES, R. J.; PÁDUA, R. M.; SIMÕES, C. M. O. Elucidation of the mechanism of anti-herpes action of two novel semisynthetic cardenolide derivatives. **Arch Virol**, [early view], 2020.

Segue abaixo o link para consulta:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00705-020-04562-1>

DOIS NOVOS CARDENOLÍDEOS SEMISSINTÉTICOS (C10 E C11) QUE ATUAM COMO INIBIDORES DA FORMAÇÃO DO COMPLEXO POLIMERASE DO VÍRUS INFLUENZA

APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO 4

Neste capítulo serão apresentados, na forma de um artigo, a triagem anti-influenza dos 16 novos derivados semissintéticos de cardenolídeos e os resultados relativos à elucidação do mecanismo de ação anti-influenza dos compostos **C10** e **C11**, que foram os mais ativos na etapa de triagem. Esse manuscrito foi submetido à avaliação da revista *Antiviral Research*, fator de impacto 4,909, Qualis Capes A1.

BOFF, L.; SCHREIBER, A.; MATOS, A. R.; DEL SARTO, J.; BRUNOTTE, L.; MUNKERT, J.; OTTONI, F. M.; RAMOS, G. S.; KREIS, W.; BRAGA, F. C.; ALVES, R. J.; PÁDUA, R. M.; SIMÕES, C. M. O.; LUDWIG, S. Two novel semisynthetic cardenolides acting as antiviral inhibitors of influenza A virus polymerase complex formation. **Antiviral Res**, [submitted], 2020.

Two novel semisynthetic cardenolides acting as antiviral inhibitors of influenza A virus polymerase complex formation

Laurita Boff ^{a,b}; André Schreiber ^a; Aline da Rocha Matos ^{a,c}; Juliana Del Sarto ^{a,d}; Linda Brunotte ^a; Jennifer Munkert ^c; Flaviano Melo Ottoni ^d; Gabriela Silva Ramos ^d; Wolfgang Kreis ^e; Fernão Castro Braga ^d; Ricardo José Alves ^d; Rodrigo Maia de Pádua ^d; Cláudia Maria Oliveira Simões ^{b,*}, Stephan Ludwig ^a

^a Institute of Virology (IVM), Centre for Molecular Biology of Inflammation (ZMBE), Westfaelische Wilhelms University (WWU), Münster, Germany

^b Laboratório de Virologia Aplicada, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil.

^c Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo, National Influenza Center (NIC)/ World Health Organization (WHO), Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

^d Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil.

^e Pharmaceutical Biology, Department of Biology, Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nuremberg, Germany.

* Corresponding author:

E-mail address: *claudia.simoes@ufsc.br* (C. M. O. Simões)

Abstract

Influenza virus infections represent a major public health issue by causing annual epidemics and occasional pandemics that affect thousands of people worldwide. Vaccination is the main prophylaxis to prevent these epidemics/pandemics, although the effectiveness of licensed vaccines is rather limited due to the constant mutations of influenza virus antigenic characteristics. The available anti-influenza drugs are still restricted and there is an increasing viral resistance to these compounds, thus highlighting the need for research and development of new antiviral drugs. In this work, two new semisynthetic derivatives of digitoxigenin, namely **C10** { 3β -[(*N*-(2-hydroxyethyl)aminoacetyl)amino-3-deoxydigitoxigenin]} and **C11** { 3β -(hydroxyacetyl)amino-3-deoxydigitoxigenin}, showed anti-influenza A virus activity by affecting the expression of viral proteins at the earlier stages of replication cycle, and altering the transcription and synthesis of new viral proteins, thereby inhibiting the formation of new virions. Such antiviral action occurred due to the interference in the assembly of viral polymerase, resulting in a deficient polymerase activity and, therefore, reducing viral replication. Attesting the *in vitro* results, a clinically relevant *ex vivo* model of influenza infection of human tumor-free lung tissues corroborated the potential

of these compounds, especially **C10**, to completely abrogate influenza A virus replication at the highest concentration tested (2.0 μM). Taken together, these promising results demonstrated that **C10** and **C11** can be considered as potential new anti-influenza drug candidates.

Keywords

Semisynthetic cardenolides; anti-influenza; mechanism of action; polymerase activity inhibition.

List of Abbreviations

A549: human alveolar epithelial cells

CC₅₀: 50% cytotoxic concentration

DMEM: dulbecco's modified eagle's medium

DMSO: dimethyl sulfoxide

FBS: fetal bovine serum

HA: hemagglutinin

IC₅₀: concentration required for 50% inhibition of viral replication

IAV: Influenza A virus

IBV: Influenza B virus

MDCK-II: Madin-Darby canine kidney type II cells

MEM: eagle's minimum essential medium

MOI: multiplicity of infection

NA: neuraminidase

PBS: phosphate-buffered saline

PFU: plaque-forming units

p.i.: post-infection

p.t.: post-transfection

RIPA: radioimmunoprecipitation

RLU: relative light units

RPMI-1640: Roswell Park Memorial Institute-1640

SI: selectivity index

WB: western blotting

1. Introduction

Influenza viruses cause annual epidemics and occasional pandemics that affect thousands of people worldwide, thus representing a major public health issue (WHO, 2020a). Influenza viruses belong to the Orthomyxoviridae family, and based on their antigenic characteristics, they were subdivided into four genera: A, B, C and D (Bush, 2007; Su et al., 2017), but only A and B are clinically relevant to humans (Behrens and Stoll, 2006). In addition, Influenza A viruses (IAVs) were further classified according to their surface glycoproteins: hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) (Shaw and Palese, 2013).

Influenza viruses contain an eight segmented negative-sense, single-stranded viral RNA genome that encodes for eleven essential viral proteins. Each segment is encapsulated into a ribonucleoprotein (RNP) molecule, consisting of the nucleoprotein (NP) and a trimeric RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) complex composed by PA, PB1 and PB2 (Lo et al., 2018). Inside the nucleus, the RdRp carries out transcription and replication using the vRNA as a template for both, transcription to mRNA or synthesis of complementary RNA (cRNA) that serves as the template for novel vRNAs. During the infection, the synthesis of mRNAs occurs prior to cRNA and vRNA transcription, which are then exported out of the nucleus for the synthesis of the viral proteins (Dou et al., 2018).

Although vaccination is the main prophylactic strategy used to decrease the impact of annual influenza epidemics (Carrat and Flahault, 2007; Soema et al., 2015), the effectiveness of licensed vaccines is rather limited due to the high mutation rate of the influenza virus genome that alters antigenic characteristics (Principi et al., 2019). Thus, these vaccines need to be revised every year. Based on data gathered from north and south hemispheres, a scientific committee meets twice a year to define the influenza strains that will be excluded and/or included in the vaccine composition to be administered in the next flu season (WHO, 2020b). However, in case of a pandemic, vaccines have to be produced *ad hoc* and are generally available only some months after the emergence and spread of the new pandemic virus (Chua and Chen, 2010).

Additionally, anti-IAV drugs, such as M2 ion channel inhibitors (adamantane derivatives: rimantadine and amantadine, no longer recommended since 2004-2005 due to high resistance rates), and neuraminidase inhibitors (NAIs: oseltamivir and zanamivir) have been used worldwide. However, the emergence of influenza virus strains resistant to these drugs has been reported increasingly (Hurt et al., 2011; Takashita et al., 2014; Jacob et al., 2016; Takashita et al., 2016; Matos et al., 2018; Horwood et al., 2019). Because of the lack of effective antivirals, new drugs are constantly developed all over the world. In Russia and China, a cell fusion inhibitor, named umifenovir, is clinically used (Leneva et al., 2016; Pshenichnaya et al., 2019). Other NAIs (laninamivir and peramivir) were recently introduced in the pharmaceutical markets of Japan, China, South Korea, and USA for influenza prevention and control, but they do not seem to be more effective than oseltamivir. Thus, influenza treatment with these drugs cannot be considered

satisfactory (Principi et al., 2019), and the development of new anti-influenza drugs with different mechanisms of action is a real need. Intending to reach this goal, in 2018, two drugs that inhibit functions of the viral polymerase, baloxavir marboxil and favipiravir, have been licenced in specific markets (the first one in Japan and USA, and the second solely in Japan), but only for special groups of patients (Furuta et al., 2017; Noshi et al., 2018; Roche, 2018). Based on the data available so far, these new drugs should be only considered for emergency use, once baloxavir caused a high rate of resistance in clinical trials, whereas favipiravir was shown to be teratogenic (Principi et al., 2019). Based on these facts, the research and development (R&D) of new anti-influenza drugs remain valid and imperative.

Cardenolides are cardiac glycosides (CGs) mainly found in plant species of Apocynaceae (e.g. *Nerium oleander* L.) and Plantaginaceae (e.g. *Digitalis lanata* Ehrh. and *D. purpurea* L.) families (Kreis, 2017), which are broadly used for over 200 years to treat several cardiac conditions, including congestive heart failure, arrhythmias and cardiogenic shock (Bessen, 1986; Rahimtoola and Tak, 1996; Patel, 2016). Therapeutically, the most relevant cardenolides are digoxin and digitoxin. Their mechanism of action and selectivity are mainly related to the direct inhibition of Na^+/K^+ -ATPase α -subunit, which promotes cardiac muscle contraction (Horisberger, 2004).

In recent years, these compounds have been investigated for the treatment of other pathological conditions, such as viral infections. Their potential antiviral activity against a wide variety of viruses has been reported, such as adenovirus (Grosso et al., 2017), chikungunya virus (Ashbrook et al., 2016), coronavirus (Yang et al., 2017; Yang et al., 2018), cytomegalovirus (Cai et al., 2014; Cohen et al., 2016; Gardner et al., 2015), dengue virus (Cheung et al., 2014), herpes virus (Bertol et al., 2011; Dodson et al., 2007; Su et al., 2008; Boff et al., 2020b), HIV (Singh et al., 2013; Wong et al., 2013; Wong et al., 2018), human papillomavirus (HPV) (Van Der Kolk et al., 2017), influenza virus (Hoffmann et al., 2008; Kiyohara et al., 2012; Amarelle et al., 2019), and respiratory syncytial virus (Norris et al., 2018).

Even though many studies have showed the potent antiviral activity of CGs, only a few of them focused on influenza viruses. Hoffmann et al. (2018) reported that CGs interfered with influenza virus replication of IAV strain A/WNS/33 (H1N1) and IBV strain B/Yamagata/88 by regulating Na^+ currents. Another work, performed by Kiyohara et al. (2012), showed that a CG isolated from the “desert rose” (*Adenium obesum*) reduced > 50% viral titers of the IAV strain A/PR8/34 (H1N1). Likewise, Amarelle et al. (2019) demonstrated that the well-known cardenolide ouabain inhibited the protein translational machinery via decrease of intracellular K^+ .

In this context, 16 new semisynthetic cardenolide derivatives of digitoxigenin were produced and screened for anti-herpes activity, as well as for cytotoxic effects against several human cancer cell lines (Boff et al., 2019). The cytotoxic effects of the most active cardenolides on H460 lung cancer cells were deeply investigated using different methodological approaches (Boff et al., 2020a), and

we also reported a proposal for the mechanism of anti-herpes action of these new promising cardenolides (Boff et al., 2020b).

In the present study, the anti-influenza virus effects of these 16 new cardenolide derivatives were evaluated. Two of them showed significant inhibitory potential on viral replication, namely **C10** {3 β -[(N-(2-hydroxyethyl)aminoacetyl)amino-3-deoxydigitoxigenin]} and **C11** {3 β -(hydroxyacetyl)amino-3-deoxydigitoxigenin}. Complementarily, the anti-influenza mechanisms of action of both compounds were explored with encouraging results. As far as we know, this is the first report showing the CGs effects on influenza polymerase complex and, for this reason, **C10** and **C11** are promising new candidates to be further evaluated for the treatment of influenza virus infection.

2. Materials and methods

2.1. Compounds, cell lines and viruses

The semisynthesis and structure determination of new 16 cardenolide derivatives tested herein (**C6a**, **C6b**, **C6c**, **C6d**, **C7a**, **C7b**, **C7c**, **C7d**, **C9**, **C10**, **C11**, **C12**, **C13**, **C14**, **C15** and **C16**) were carried out as previously described by Boff et al. (2019).

Human alveolar basal epithelial cells (A549) and Madin-Darby canine kidney type II cells (MDCK-II) were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) and Eagle's minimum essential medium (MEM) (Sigma, Germany), respectively, both supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Merck, Germany) and 1% penicillin/streptomycin (P/S) (Merck, Germany) at 37°C and 5% CO₂ in humidified conditions.

Regarding the viruses tested, A/Hamburg/04/2009 (H1N1pdm09) was kindly provided by German National Reference Centre for Influenza (Brunhilde Schweiger, Robert-Koch Institute, Berlin, Germany). Recombinant A/Seal/Mass/1-SC35M/80 (H7N7) (SC35M), A/WSN/33 (H1N1) (WSN) and B/Lee/40 were generated by using the bidirectional pHW2000 reverse genetics system (Hoffmann et al., 2000). Recombinant IAV strain A/Panama/2007/1999 (H3N2) was generously provided by Thorsten Wolff (Robert-Koch Institute, Germany), and recombinant Strep-PB2-A/WSN/33 was kindly supplied by Martin Schwemmler (University of Freiburg, Germany). Viruses were propagated on A549 and MDCK cells for 72 h and viral titers were determined by standard plaque assay on MDCK cells (Burlison et al., 1992; Dudek et al., 2010).

2.2 Anti-influenza screening

The anti-influenza screening was performed as previous described by Schreiber et al. (2019). Briefly, 2.5×10^5 A549 or MDCK cells per well (12-well plates) were seeded and infected (MOI 0.01) for 30 min at 37°C. Viruses were diluted in infection PBS [PBS supplemented with 1% P/S, 0.2% (v/v) Bovine Serum Albumin (BSA) 35%, 0.01% MgCl₂, 0.01% CaCl₂]. Following, cells

were washed with PBS and treated with the compounds (digitoxigenin, **C6a**, **C6b**, **C6c**, **C6d**, **C7a**, **C7b**, **C7c**, **C7d**, **C9**, **C10**, **C11**, **C12**, **C13**, **C14**, **C15** and **C16**) at 1 μM diluted in infection DMEM or MEM [DMEM for A549 cells and MEM for MDCK cells, both supplemented with 1% P/S, 0.2% (v/v) BSA 35%, 0.01% MgCl_2 , 0.01% CaCl_2]. Extemporaneously, 0.15 μg TPCK-treated trypsin were added, and supernatants were harvested after 24 h incubation. Confluent MDCK cell monolayers (6-well plates) were infected with 10-fold dilution series of virus supernatants for 30 min at 37°C. Then, virus inoculum was replaced by plaque medium [14.2% (v/v) 10 \times MEM, 0.3% (v/v) NaHCO_3 (7.5%), 0.014% (v/v) DEAE-dextran (1%), 1.4% (v/v) 100 \times P/S, 0.3% (v/v) BSA (35%), 0.01% (v/v) CaCl_2 (1%), 0.01% (v/v) MgCl_2 (1%), 0.9% (v/v) Agar (3%), and extemporaneously 0.15 μg TPCK-treated trypsin]. Cells were then incubated for 72 h at 37°C (IAV) or 33°C (IBV), and viral plaques were counted. IC_{50} was defined as the concentration of each compound that reduced viral replication by 50%.

2.3 Cytotoxicity evaluation

A549 and MDCK cells were seeded in 96-well plates and grown overnight. Cells were treated with different concentrations of **C10** and **C11** (5.0, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313, 0.156 and 0.078 μM) or DMSO (0.1%), diluted in 100 μL of DMEM or MEM, respectively, for 24 h at 37°C and 5% CO_2 . Next, 15 μL of sterile water or Triton X-100 10% (CytoSelect™ LDH Cytotoxicity Assay Kit) were added to each well in DMEM or MEM, for 10 min, at room temperature. Supernatants were collected and stored at -80°C until used. Supernatants (90 μL) were transferred to clean 96-well plates and 10 μL of LDH Reagent (CytoSelect™ LDH Cytotoxicity Assay Kit) were added to each sample and incubated for 20 min. Quantification was performed using a spectrophotometer at 405 nm. The concentration of each sample that reduced cell viability by 50% was defined as CC_{50} .

2.4 Anti-influenza viral mechanism of action

2.4.1 Western blot analyses

To evaluate whether **C10** and **C11** interfere with viral or cellular protein expression, Western blotting experiments were performed. In brief, cells were infected with IAV (A/WSN/33/H1N1) or were transfected with a recombinant IAV (Strep-PB2-WSN/H1N1) (Rameix-Welti et al., 2009). After that, cells were treated with each compound, washed with PBS, and lysed in radioimmunoprecipitation (RIPA) buffer [25 mM Tris-HCl (pH 8), 137 mM NaCl, 10% glycerol, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40, and 2 mM EDTA (pH 8)]. RIPA protein lysates were cleared by centrifugation (220 $\times g$, 4°C, 10 min), mixed with 5 \times Laemmli buffer, separated by SDS-PAGE 10%, blotted onto nitrocellulose membranes, and blocked with TBS-T buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, and 0.2% Triton X-100 supplemented with 3% BSA (w/v)]. After blocking, membranes were incubated overnight with polyclonal anti-influenza

A (IAV) PB1 (GeneTex, EUA), polyclonal anti-IAV PA (GeneTex, EUA), polyclonal anti-IAV NP (GeneTex, EUA), polyclonal anti-IAV M1 (GeneTex, EUA), polyclonal anti-IAV NS1 (GeneTex, EUA), monoclonal anti-Tubulin (T6199, Sigma-Aldrich, EUA), and monoclonal anti-Strep Tag (GT661, Sigma-Aldrich, EUA), all diluted in blocking buffer. Respective secondary antibodies were diluted in TBS-Tween 0.5%, added to the membranes, and incubated for 45 min. The measuring of protein signals was performed with chemiluminescence by using the Li-Cor Odyssey® Fc Imaging System. Analyses were performed with Image Studio™ software.

2.4.2 Quantitative Real-Time RT-PCR

Total cellular RNA was isolated by using RNeasy kit (Qiagen, Germany). cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA by using RevertAid H Minus M-MLV Reverse Transcriptase (Fermentas, Germany). The following primers were used: human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) forward (5'-GCAAATCCATGGCACCGT-3') and reverse (5'-GCCCCACTTGATTTGGAGG-3'); IAV nucleoprotein (NP) vRNA forward (5'-GGCCGTCATGGTGGCGAATGAATGGACGGAGAACAAGGATTGC-3') and reverse (5'-CTCAATATGAGTGCAGACCGTGCT-3'); cRNA forward (5'-CGATCGTGCCCTCCTTTG-3') and reverse (5'-GCTAGCTTCAGCTAGGCATCAGTAGAAACAAGGGTATTTTTCTTT-3'); mRNA forward (5'-CGATCGTGCCCTCCTTTG-3') and reverse (5'-CCAGATCGTTCGAGTCGTTTTTTTTTTTTTTTCTTTAATTGTC-3'); IAV matrix protein 1 (M1) vRNA forward (5'-GGCCGTCATGGTGGCGAATTGCAGGGAAGAACACCGATC-3') and reverse (5'-CGTGAACACAAATCCTAAAAT-3'); cRNA forward (5'-AGGGAAGAATATCGAAAGGAAC-3') and reverse (5'-GCTAGCTTCAGCTAGGCATCAGTAGAAACAAGGTAGTTTTTTAC-3'); mRNA forward (5'-TCCTAGCTCCAGTGCTGGTC-3') and reverse (5'-CCAGATCGTTCGAGTCGTTTTTTTTTTTTTTCATTG-3') (Kawakami et al., 2011). qRT-PCR was performed by using QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen, Germany) (Börgeling et al., 2014), and data were acquired with LightCycler 480 Instrument II (Roche, Switzerland). Gene expression was normalized to the endogenous housekeeping control gene GAPDH and analyzed by using 2^{-ΔΔCT} method (Liu and Saint 2002).

2.4.3 Reporter gene assay

This assay followed the procedures described by Schröder et al. (2018). Briefly, MDCK cells grown overnight in 12-well plates were transfected with a transfection mixture containing plasmids encoding PB1, PB2, PA and NP, a polymerase I (Pol I)-driven plasmid transcribing an influenza A virus-like RNA coding for the reporter protein firefly luciferase to monitor viral polymerase activity. The transfection mixture also contained a plasmid pHW72-Luci carrying a luciferase gene in negative orientation flanked by the viral promoter sequences, which served to

normalize variation in transfection efficiency. Medium was changed 4 h post-transfection (p.t.), **C10** and **C11** were added at 0.5 and 1.0 μM and incubated. Cells were lysed 24 h p.t. and luciferase activity was measured using Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega, USA). PB2 was omitted from the transfection mixture as a negative control. Relative light units (RLU) were normalized to protein concentrations determined with a standard Bradford assay (Bradford, 1976), and the relative polymerase activity was depicted as fold induction with respect to MOCK positive control.

2.4.4 Virus infection of human lung tissue explants

This assay was conducted as described by Matos et al. (2019). Firstly, tumor-free human lung tissue explants were recovered in Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) medium (Sigma, Germany) on the day of surgery and stored at 4°C. Immediately after, tissues were cut in pieces of approximately 100 mg, transferred to 12-well plates containing medium and incubated overnight at 37°C with 5% CO₂. Then, tissue fragments were infected with recombinant IAV [A/Panama/2007/1999 (H3N2)] in the presence of RPMI-1640 medium [supplemented with 2 mM L-Glutamine (Sigma, Germany), 1% P/S and 0.1% BSA]. After 60 min, tissues were transferred to new 12-well-plates with medium containing **C10** and **C11**, at 0.5, 1.0 and 2.0 μM , and were incubated for 48 h. Supernatants were collected at 1, 24 and 48 h post infection (p.i.), and stored at -80°C for viral titer determination using plaque standard assay on MDCK cells (Burleson et al., 1992; Dudek et al., 2010).

2.5 Statistical analyses

The mean values \pm standard deviations (SD) are representative of three or more independent experiments. Statistical analyses were performed by ANOVA followed by post-hoc tests as indicated.

3. Results

3.1 Anti-influenza virus activity of cardenolide derivatives

Firstly, 17 compounds [16 new semisynthetic cardenolide derivatives (**C6a** to **C16**) and digitoxigenin that was used as scaffold for the semisynthesis] were screened, at 1 μ M, for their antiviral activity against IAV [strain A/WSN/33 (H1N1), MOI 0.01, 24 h] on A549 cells (Fig. 1A). These compounds reduced viral titers at distinct levels, and those that reduced > 50% of viral replication (digitoxigenin, **C7c**, **C10**, **C11** and **C12**) were selected for further assays. A similar antiviral profile was observed when MDCK cells were used (Fig. 1B). It is important to note that compounds **C10** and **C11** showed the highest reduction of influenza virus titers, when compared to the other compounds on both cell lines.

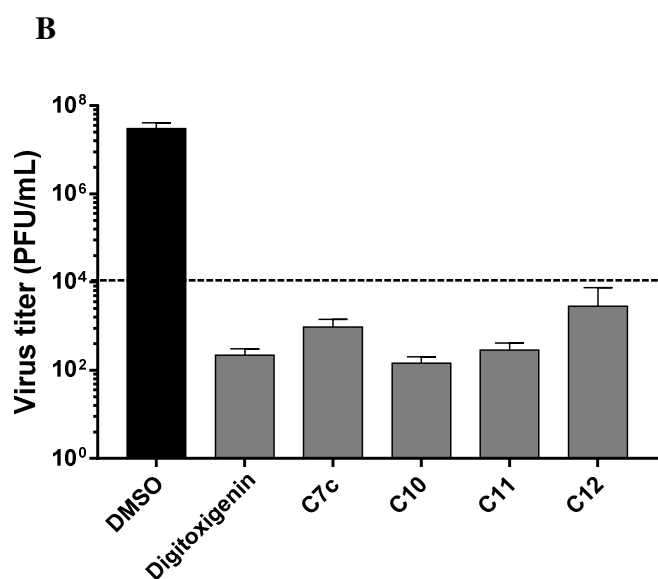
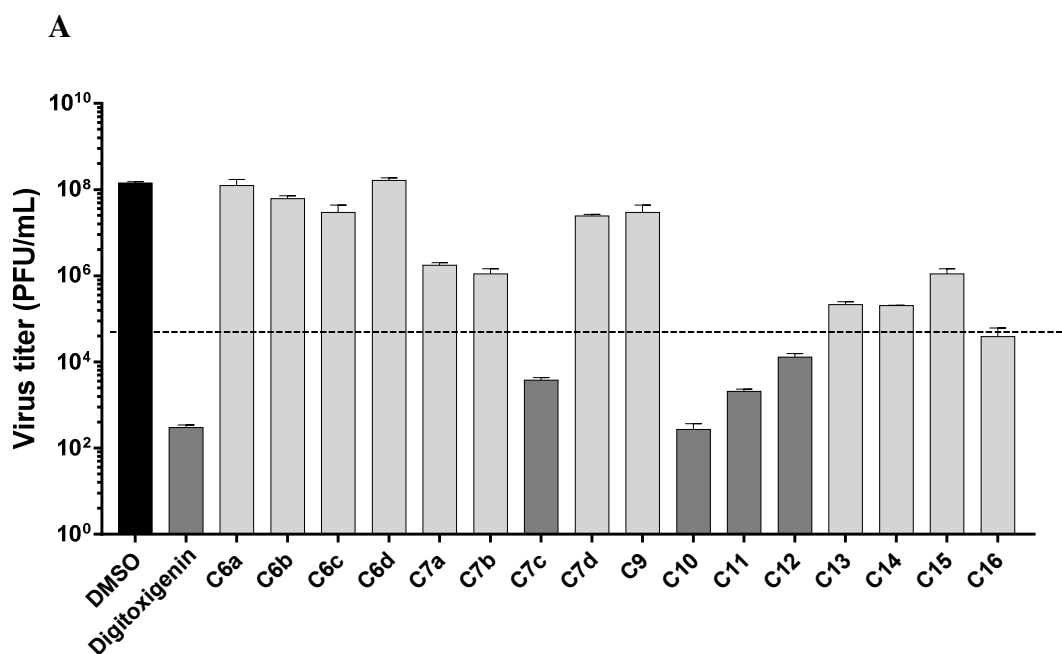


Fig. 1. (A) Antiviral activity of new cardenolide derivatives (**C6a**, **C6b**, **C6c**, **C6d**, **C7a**, **C7b**, **C7c**, **C7d**, **C9**, **C10**, **C11**, **C12**, **C13**, **C14**, **C15** and **C16**) and the scaffold digitoxigenin against influenza A virus [strain A/WSN/33 (H1N1)]. A549 cells were infected at MOI 0.01 for 1 h and further treated with 1 μ M of the compounds. Supernatants were collected at 24 h p.i. and titrated on MDCK cells. The black line indicates the compounds that reduced > 50% of viral titer. DMSO served as solvent control and the titers of DMSO-treated cells were arbitrarily set to 100%. **(B)** Antiviral activity of the most active compounds in the preliminary screening (digitoxigenin, **C7c**, **C10**, **C11** and **C12**) using the same experimental conditions cited above for **(A)** on MDCK cells.

Furthermore, all compounds were screened against a broader panel of IAV and IBV strains [seasonal IAV H3N2 (Panama/2007/1999), H7N7 (Seal/Mass/1-SC35M/80), H1N1pdm (Hamburg/04/2009), and IBV (Lee/40) strain]. They were also very active against all viral strains tested (Fig. S1 - Supplementary Material).

3.2 Cardenolide derivatives effects on cell viability and influenza replication

Since digitoxigenin and compounds **C7c**, **C10**, **C11** and **C12** were shown to be the most active in the preliminar screenings, their cytotoxicity was evaluated on A549 and MDCK cells. None of them reduced cell viability at concentrations at least five times higher than the concentrations used in the initial screenings (Table 1). This evaluation ensured that the compounds would not act indirectly by simply reducing cell viability but rather act directly on virus propagation by interfering with certain stages of their replication cycle. For all compounds IC_{50} and CC_{50} values as well as selectivity indices (SI) against IAV [strain A/WSN/33 (H1N1)] were calculated (Table 1). Compounds **C10** and **C11** were the most potent against IAV replication presenting IC_{50} values of, approximately, 0.06 μ M on both cell lines. They showed SI values of 226 and 161 on A549 cells; and 306 and 241 on MDCK cells, respectively. Based on these favorable results, compounds **C10** and **C11**, whose chemical structures are depicted in Fig. 2, were selected to further explore their antiviral mechanisms of action.

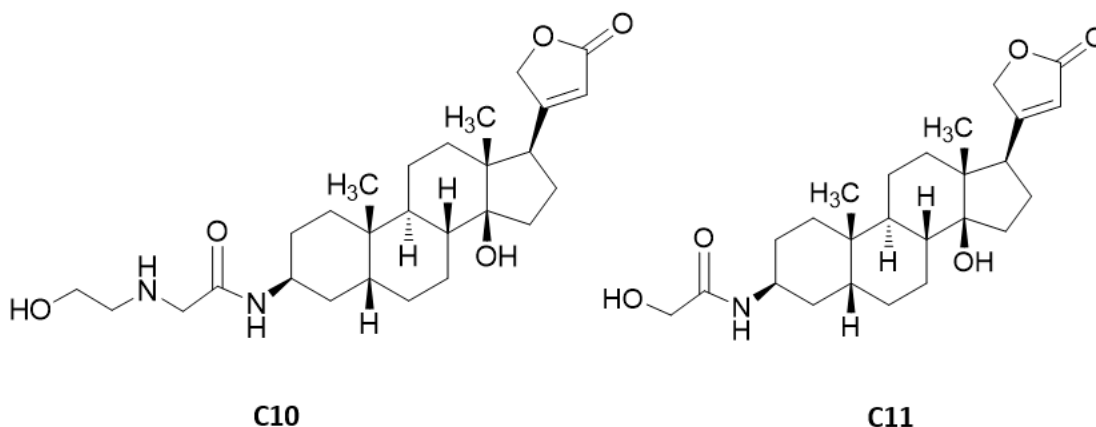


Fig. 2. Chemical structures of derivatives **C10** and **C11**.

Table 1. Cytotoxicity and antiviral activity of compounds **C7c**, **C10**, **C11**, **C12** and digitoxigenin against influenza A virus [strain WSN/33 (H1N1)] replication on A549 and MDCK cells.

Compounds	A549 cells	IVA [strain WSN/33 (H1N1)]		MDCK cells	IVA [strain WSN/33 (H1N1)]	
	CC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	SI	CC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	SI
C7c	9.398 ± 0.741	0.125 ± 0.010	75.282	22.170 ± 2.393	0.103 ± 0.009	216.166
C10	12.790 ± 0.754	0.057 ± 0.002	226.052	18.343 ± 0.915	0.060 ± 0.004	306.164
C11	10.025 ± 0.962	0.062 ± 0.000	161.645	15.983 ± 0.235	0.066 ± 0.006	241.379
C12	13.280 ± 1.753	0.123 ± 0.013	107.647	23.340 ± 1.184	0.091 ± 0.008	257.483
Digitoxigenin	6.465 ± 1.004	0.070 ± 0.010	92.366	6.360 ± 0.427	0.072 ± 0.005	88.052

IVA: Influenza A Virus; CC₅₀: 50% cytotoxic concentration (μM); IC₅₀: 50% concentration that inhibited viral replication (μM). These values represent the mean ± SD of three independent experiments. SI: Selectivity index (SI = CC₅₀/IC₅₀).

3.3 Anti-influenza virus mechanism of action of compounds **C10** and **C11**

3.3.1 **C10** and **C11** affect the expression of viral proteins at the earlier stages of influenza A virus replication cycle

The elucidation of the antiviral mechanism of action of **C10** and **C11** against IAV [A/WSN/33 (H1N1)] started by investigating the viral protein accumulation at different stages within the first replication cycle (Fig. 3). Both compounds decreased early (NS1, NP) and late viral protein expression (PB1, M1) when compared to the positive control (MDCK cells infected but not treated), at all time periods tested. Compound **C10** was most effective to reduce protein expression. In addition, impaired viral protein expression was already clearly observed at the earliest time point analyzed (2 h p.i.), demonstrating action of the compounds in very early stages of the replication cycle.

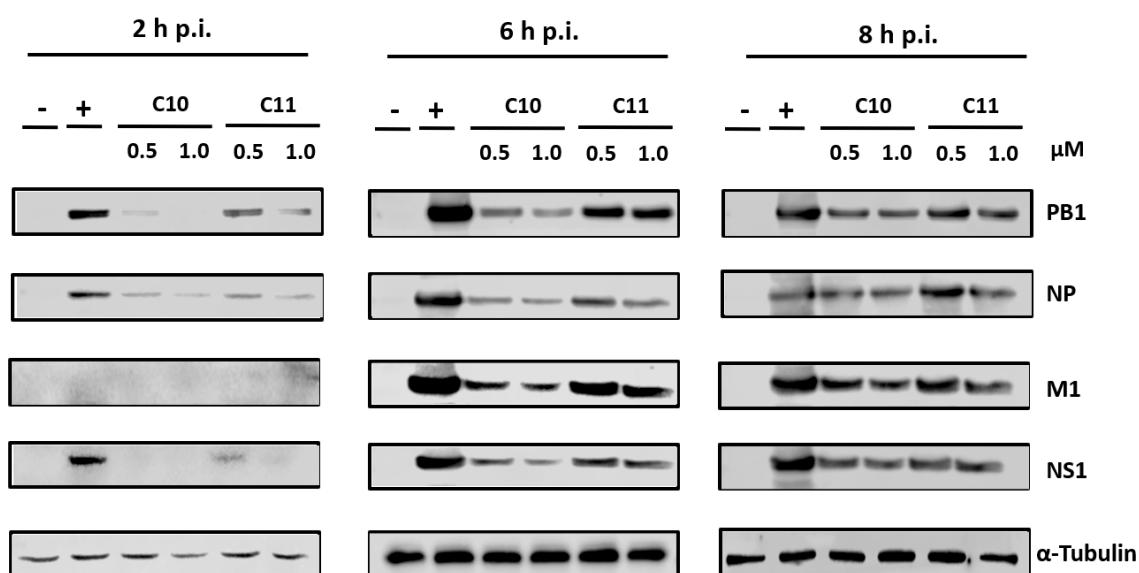


Fig. 3. Effects of **C10** and **C11** on influenza A virus [strain A/WSN/33 (H1N1)] protein expression over time. Western blot analysis of MDCK cells infected at MOI 5 and then treated with both compounds (0.5 and 1.0 μM). Cell lysates were collected 2, 6 and 8 h p.i., run on SDS-PAGE 10% and analyzed using specific antibodies for viral (PB1, NP, M1 and NS1) proteins. Equal protein loading was confirmed by probing for α-Tubulin. MDCK cells not infected or treated were used as negative control (-). MDCK cells infected but not treated were used as positive control (+).

To analyse whether the interference of **C10** and **C11** with virus replication already occurs on the transcriptional level, the influenza NP (segment 5) and M1 (segment 7) mRNA levels were quantified at 6 h p.i. Additionally, the amounts of newly produced cRNA and vRNA of the segments 5 and 7 were quantified (Fig. 4). In agreement with the previous results, **C10** and **C11** decreased viral mRNA levels. Once again, **C10** presented the higher potency to reduce mRNA levels of both segments, when compared to the control group, especially for M1. As expected, a

similar outcome was observed for cRNA and vRNA levels, with more pronounced differences after **C10** treatment.

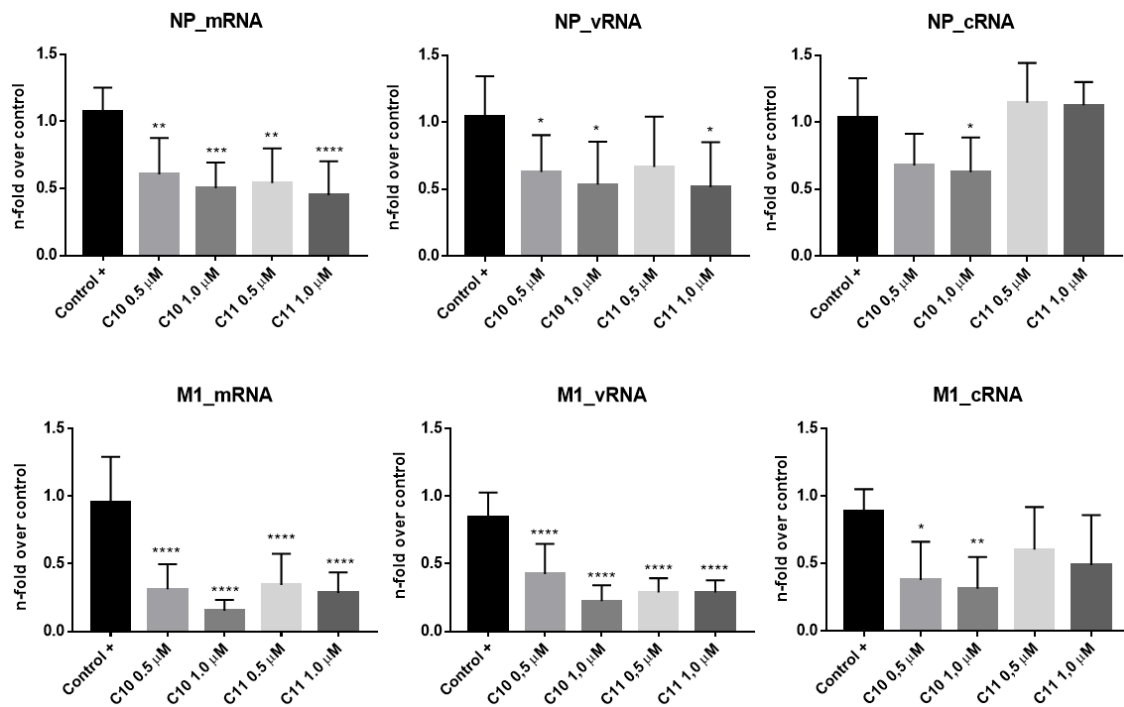


Fig. 4. Effects of **C10** and **C11** on influenza A virus RNA transcription [strain A/WSN/33 (H1N1)]. MDCK cells were infected at MOI 5 and then treated with both compounds (0.5 and 1.0 μ M) for 6 h. Total RNA was extracted and viral mRNA, vRNA and cRNA of NP (segment 5) and M1 (segment 7) were analyzed by qRT-PCR using GAPDH as the housekeeping gene. MDCK cells infected but not treated were used as positive control (+). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs the respective viral controls, one-way ANOVA, post-hoc test Dunnett.

Altogether, these results demonstrate that both compounds act at the earlier stages of IAV replication cycle by reducing the transcription and synthesis of new viral proteins and, consequently, the production of new virions.

3.3.2 **C10** and **C11** affect the polymerase complex

To understand if the decrease of RNA levels was due to direct effects on viral polymerase, the activity of IAV polymerase after treatment with **C10** and **C11** was investigated using a plasmid based mini genome polymerase assay. MDCK cells were transfected with plasmids expressing the constituents of the viral polymerase, PB1, PB2, PA and NP, along with a plasmid that generates a viral RNA template expressing luciferase under control of the viral RNA promoters (Fig. 5A). The treatment diminished the polymerase activity as well. Noteworthy, the highest concentration of **C10** (1.0 μ M) decreased the polymerase activity by > 50%. While **C11** again was less potent and showed no significant reduction at the lowest concentration tested (0.5 μ M),

Fig. 5. Effects of **C10** and **C11** on influenza A virus polymerase activity. **(A)** MDCK cells were transfected with plasmids expressing PB1, PB2, PA and NP (PPPN) along with a plasmid encoding luciferase under control (+) of viral promoter sequences. As negative control (-), the transfection mix lacking the PB2 encoding plasmid (PPN) was used. Medium was changed 4 h post-transfection (p.t.), **C10** and **C11** were added at 0.5 and 1.0 μM and incubated. After 24 h p.t., cells were lysed and the results were calculated as n-fold of luciferase activity in PPN-transfected **C10** and **C11**-treated cells, which was arbitrarily set to 1, and represent the mean \pm SD of three independent experiments. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs positive control, one-way ANOVA, post-hoc test Dunnet. **(B)** Effects of **C10** and **C11** cardenolide derivatives on recombinant influenza A virus (Strep-PB2-WSN) protein expression, when bound or not to beads. Subcellular fractions were added to the beads and incubated overnight at 4°C . After, beads were pelleted and Western blot analyses were performed using specific antibodies polymerase complex (PA, PB1, NP, Anti-Strep TagM1 and NS1) proteins. Equal protein loading was confirmed by probing for α -Tubulin. WSN normal = cells infected with influenza A virus [strain A/WSN/33 (H1N1)] and not treated; DMSO = solvent control.

3.3.3 **C10** and **C11** reduce viral replication in an *ex vivo* model of human lung tissue

Finally, to evaluate antiviral activity of **C10** and **C11** in a more clinically relevant model of influenza virus infection, the compounds were tested in an *ex vivo* tumor-free human lung tissue explant model (Matos et al., 2019). At 48 h p.i., **C10** reduced the viral titers by 4 logs at the lowest concentration tested (0.5 μM) and completely abrogated viral replication at the higher concentrations tested (1.0 and 2.0 μM) (Fig. 6). At the same time, **C11** abolished viral replication only at the highest concentration tested (2.0 μM). Additionally, viability assay was performed with the treated lung tissues and confirmed that **C10** did not reduce tissue integrity up to 48 h p.i. In contrast, **C11** showed tissue toxicity at 48 h p.i. (> 2-fold over control) (Fig. S2 - Supplementary Material).

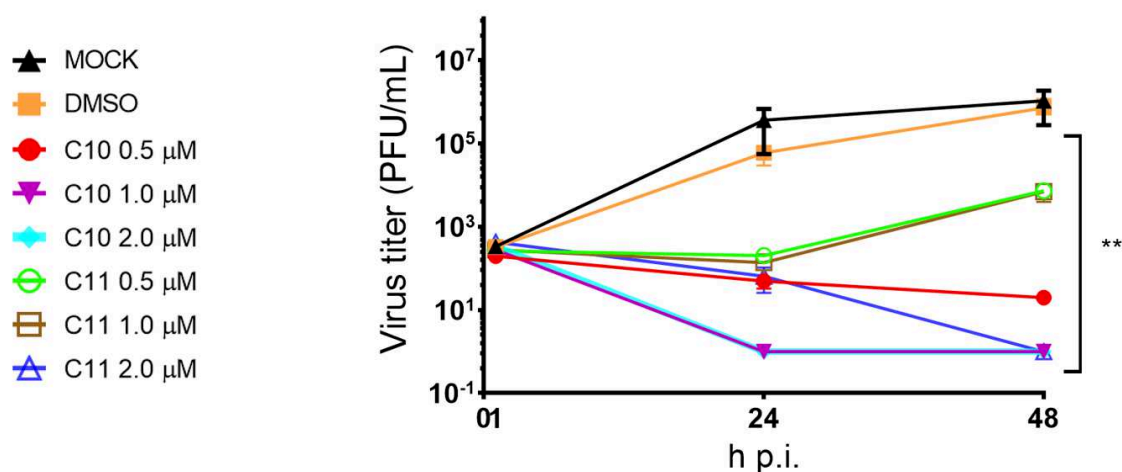


Fig. 6. Effects of **C10** and **C11** on Influenza A virus [A/Panama/2007/1999 (H3N2)] replication using an *ex vivo* human tumor-free lung model. Tissues were infected with 1×10^5 PFU/mL of this recombinant virus for 1 h and further treated with both compounds (0.5, 1.0 and 2.0 μ M) for 48 h. Tissue supernatants were collected at 1, 24 and 48 h post-infection (p.i.) and titrated on MDCK cells. Each time point represents mean (\pm SD) of four independent experiments. ** $p < 0.01$ vs MOCK, two-way ANOVA, post-hoc test Dunnet.

4. Discussion

Cardenolides are molecules clinically used to treat heart diseases, such as heart failure, arrhythmias and cardiogenic shock (Bessen, 1986; Rahimtoola and Tak, 1996; Patel, 2016). However, several studies have suggested promising effects for the treatment of other diseases (Prassas and Diamandis, 2008), including those caused by viral infections (Dodson et al., 2007; Hoffmann et al., 2008; Su et al., 2008; Bertol et al., 2011; Kiyohara et al., 2012; Singh et al., 2013; Wong et al., 2013; Cai et al., 2014; Cheung et al., 2014; Gardner et al., 2015; Ashbrook et al., 2016; Cohen et al., 2016; Grosso et al., 2017; Van Der Kolk et al., 2017; Yang et al., 2017; Norris et al., 2018; Wong et al., 2018; Yang et al., 2018; Amarelle et al., 2019; Boff et al., 2020b). Even though CGs have been investigated against many viruses, little is known about their potential anti-influenza activity. The available data support an anti-influenza activity *in vitro* (Hoffmann et al., 2008; Kiyohara et al., 2012) and *in vivo* using rodents that express a Na^+/K^+ -ATPase $\alpha 1$ resistant to GC (Amarelle et al., 2019). Therefore, the evaluation of new semisynthetic cardenolides is a valid strategy to identify new antiviral drugs against influenza virus infection. Our initial anti-influenza screening of 16 new semisynthetic derivatives of digitoxigenin (Boff et al., 2019) disclosed compounds **C10** and **C11** as the most potent ones with low IC_{50} values (ranging from 0.057 to 0.062 μ M on A549 cells and 0.060 to 0.066 μ M on MDCK cells, respectively), along with the highest SI values (ranging from 161 to 306, Table 1). A previous report showed that the cardenolide oleandrigenin- β -D-glucosyl (1 \rightarrow 4)- β -D-digitalose, isolated from *Adenium obesum* (desert rose), presented anti-influenza activity since it reduced IAV titer (strain A/PR/8/34) on MDCK cells with an IC_{50} value of 0.86 μ g/mL (=1.14 μ M) (Kiyohara et al., 2012). It should be noted that this value is 19/17-fold higher than those here reported for **C10** and **C11**, respectively.

Our research group has recently described that both compounds inhibited Na^+/K^+ -ATPase (Boff et al., 2019) and, therefore, this modulation function might explain one of the mechanisms by which **C10** and **C11** interfere with influenza virus replication. The inhibition of Na^+/K^+ -ATPase in host cells infected with influenza viruses caused by the cardenolides ouabain and lanatoside C has been already demonstrated by other research groups (Hui and Nayak, 2001; Hoffmann et al., 2008; Mi et al., 2010). Recently, it was reported that the cardenolides ouabain and digoxin

decreased intracellular K^+ , which inhibited the protein translation and increased the survival of influenza A/WSN/1933-infected mice (Amarelle et al., 2019).

Both **C10** and **C11** demonstrated strong anti-influenza properties manifested in the earlier stages of viral replication cycle. A significant reduction of viral proteins expression, such as PB1, NP and NS1, was observed within only 2 h p.i. In accordance with this finding, **C10** and **C11** treatment also induced a decrease of viral mRNA levels, as exemplarily demonstrated for segments 5 (NP) and 7 (M1). Furthermore, significant decreases in cRNA and vRNA levels were also detected. Altogether, these results suggest these compounds cause a general malfunction of the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) affecting its activity, which is involved in the synthesis of all three RNA species (Ishihama, 1996; Honda and Ishihama, 1997). Indeed, the mini genome reporter gene assay employed herein indicated a decrease of the polymerase activity after treatment with both **C10** and **C11**, when compared to the positive control (Fig. 5A).

The IAV polymerase complex is composed of PB1, PB2 and PA, that together with NP and vRNA, form the vRNP complex. For the proper function of the polymerase, a correct assembly of the polymerase subunits is required. In this study, it was demonstrated that both **C10** and **C11** interfered with the polymerase complex assembly since levels of the polymerase constituents (PA, PB1 and NP) decreased after the Strep-tag pulldown of PB2.

To continue studying **C10** and **C11**, the next step should be the investigation using an *in vivo* model to assess the promising antiviral effects already revealed *in vitro*. It is important to note that often *in vivo* studies are firstly done in non-human animals, such as mice or rats (Kilkenny et al., 2010). Nevertheless, the use of rodent models, even those xenotransplanted, is not advisable for this class of compounds, the cardenolides, since rodent cells are approximately 1,000 times more resistant than human cells to the action of these compounds. Such difference can be explained because the main cellular target of cardenolides, the Na^+/K^+ -ATPase enzyme, is expressed at different levels in humans and rodents (Perne et al., 2009; Calderón-Montaña et al., 2014). Recently, Amarelle et al. (2019) published a study using mice genetically modified to express Na^+/K^+ -ATPase alpha 1 subunit, as occurs in humans, which can be an interesting approach to study cardenolides *in vivo*.

However, the use of an *ex vivo* model can be more robust and a viable economically alternative simulating a bridge between *in vitro* and *in vivo* experiments, and highlighting the non-use of laboratory animals. In this sense, an explant tumor-free human lung model provides an unique opportunity to analyze influenza viral replication in the complexity of human lung tissues that is closer to a real human infection scenario. Since the lungs are the natural targets of these viruses, this model is extremely relevant for the investigation of potential new anti-influenza drugs.

Previously, it has been shown that an *ex vivo* infection is suitable for the evaluation of potential anti-influenza drugs and immunomodulatory agents. This model induced a complex innate immune response following the infection with the recombinant IAV [A/Panama/2007/1999

(H3N2)], which was manifested by a relevant expression of antiviral restriction factors, pro-inflammatory cytokines, interferons (IFNs) types I, II and III, and a unique pattern of IFN- α subtypes. In this study, the macrolide antibiotic bafilomycin A (BafA) was applied to inhibit viral replication in lung tissues, and the pre-treatment with this drug for 1 h abolished IAV replication (Matos et al., 2019). Complementarily, Weinheimer et al. (2012) had already been shown that lung explants support the replication of diverse IAV strains.

Herein, the promising *ex vivo* results confirmed the *in vitro* findings demonstrating that when the human lung tissues were infected with the same recombinant IAV cited above, and treated with **C10** (1 μ M) and **C10** and **C11** (2 μ M), they reduced significantly the viral titers below the detection limit. Noteworthy, **C10** did not induce any relevant tissue toxicity, thus emphasizing its potential for further studies.

C10 and **C11** also interfered with the assembly of viral polymerase resulting in a deficient polymerase activity. Such mechanism can be the main antiviral action found herein for both compounds, and as far as we know, it has not been reported for any other CG. There are some recent studies reporting the inhibitory activity of influenza polymerase of different compounds, such as 5-(5-fluoro-1H-pyrrolo[2,3-*b*]pyridin-3-yl)pyrazin-2(1H)-one derivatives (Yang et al., 2019); R151785 (Zhang et al., 2019); and JL-5001 (Zhao et al., 2019) and for this reason they are being called of next-generation therapeutic agents.

5. Conclusions

The semisynthetic derivatives of digitoxigenin **C10** and **C11** showed anti-IAV action by affecting transcription of viral mRNA and thereby altering expression of viral proteins at early stages of the replication cycle, leading to impaired formation of new virions. Such antiviral action occurred due to the interference with the assembly of the viral polymerase complex, resulting in a deficient polymerase activity and, therefore, reducing viral replication. Attesting all these results obtained *in vitro*, a clinically relevant model of influenza infection by using *ex vivo* human tumor-free explant lung tissue confirmed the potential of these compounds to completely abrogate influenza A virus replication at the highest concentration tested (2 μ M) at 48 h, mainly for **C10**. In conclusion, our findings suggest that by their promising and pioneer results, **C10** and **C11** can be considered as potential anti-influenza drug candidates.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank the Brazilian funding agencies CAPES (MEC) and CNPq (MCTI) for their research fellowships, especially that of L.B. (CNPq grant number 200574/2018-3 of her one year scholarship at the University of Münster, Germany), and CNPq for the financial support (grant

number 305878/2016-6). The German authors from University of Münster thank the German Research Foundation (DFG) for financial support (grants SFB1009B02, LU477/23-1, BR 5189/1-1, KFO324) as well as the Innovative Medizinische Forschung (IMF) and the Interdisciplinary Center for Clinical Research, Münster, which were granted to L.B. Those from Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nuremberg thank BAYLAT (JM and RMP for mobility support) and Marie Curie Foundation/European Community (FP7 IRSES, grant 295251, WK).

References

- Amarelle, L., Katzen, J., Shigemura, M., Welch, L.C., Cajigas, H., Peteranderl, C., Celli, D., Herold, S., Lecuona, E., Sznajder, J.I., 2019. Cardiac glycosides decrease influenza virus replication by inhibiting cell protein translational machinery. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 6, L1094-L1106. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00173.2018>.
- Ashbrook, A.W., Lentscher, A.J., Zamora, P.F., Silva, L.A., May, N.A., Bauer, J.A., Morrison, T.E., Dermody T.S., 2016. Antagonism of the sodium-potassium ATPase impairs chikungunya virus infection. *MBio.* 7, pii: e00693-00616. <https://doi.org/10.1128/mBio.00693-16>.
- Behrens, G., Stoll, M., 2006. Pathogenesis and immunology, in: Kamps, B.S., Hoffmann, C., Preiser, W., (Eds.), *Influenza reports 2006*. Flying Publisher, Paris, pp. 92-109.
- Bertol, J.W., Rigotto, C., Pádua, R.M., Kreis, W., Barardi, C.R., Braga, F.C., Simões, C.M.O., 2011. Antiherpes activity of glucoevatromonoside, a cardenolide isolated from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata*. *Antiviral Res.* 92, 73-80. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.06.015>.
- Bessen, H.A., 1986. Therapeutic and toxic effects of digitalis: William Withering, 1785. *J Emerg Med.* 4, 243-248. [https://doi.org/10.1016/0736-4679\(86\)90048-X](https://doi.org/10.1016/0736-4679(86)90048-X).
- Boff, L., Munkert, J., Ottoni, F.M., Schneider, N.F.Z., Ramos, G.S., Kreis, W., Andrade, S.F., Souza Filho, J.D., Braga, F.C., Alves, R.J., Pádua, R.M., Simões, C.M.O., 2019. Potential anti-herpes and cytotoxic action of novel semisynthetic digitoxigenin-derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 167, 546-561. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.076>.
- Boff, L., Persich, L., Brambila, P., Ottoni, F.M., Munkert, J., Ramos, G.S., Viana, A.R.S., Kreis, W., Braga, F.C., Alves, R.J., Pádua, R.M., Schneider, N.F.Z., Simões, C.M.O., 2020a. Investigation of the cytotoxic activity of two novel digitoxigenin analogues on H460 lung cancer cells. *Anti-Cancer Drugs.* 31, 452-462, <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000872>.
- Boff, L., Schneider, N.F.Z., Munkert, J., Ottoni, F.M., Ramos, G.S., Kreis, W., Braga, F.C., Alves, R.J., Pádua, R.M., Simões, C.M.O., 2020b. Elucidation of the mechanism of anti-herpes action of two novel semisynthetic cardenolide derivatives. *Arch Virol.* [early view]. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04562-1>.
- Börgeling, Y., Schmolke, M., Viemann, D., Nordhoff, C., Roth, J., Ludwig, S., 2014. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase impairs influenza virus-induced primary and secondary host gene responses and protects mice from lethal H5N1 infection. *J Biol Chem.* 289, 13-27. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.469239>.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

- Burleson, F.G., Chamberts, T.M., Wiedbrauk, D.L., 1992. *Virology: a laboratory manual.*, San Diego: Academic, p. 250.
- Bush, R.M., 2007. Influenza Evolution. in: Tibayrenc, M. (Ed). *Encyclopedia of infectious diseases.*, John Wiley & Sons, USA, p.199–214.
- Cai, H., Wang, H.Y., Venkatadri, R., Fu, D.X., Forman, M., Bajaj, S.O., Li, H., O'Doherty, G.A., Arav-Boger, R., 2014. Digitoxin analogues with improved anticytomegalovirus activity. *ACS Med Chem Lett.* 5, 395-399. <https://doi.org/10.1021/ml400529q>.
- Calderón-Montaño, J.M., Burgos-Morón, E., Orta, M.L., Maldonado-Navas, D., García-Domínguez, I., López-Lázaro, M., 2014. Evaluating the cancer therapeutic potential of cardiac glycosides. *Biomed Res Int.* 2014, 794930. <https://doi.org/10.1155/2014/794930>.
- Carrat, F., Flahault, A., 2007. Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. *Vaccine.* 25, 6852-6862. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.07.027>.
- Cheung, Y.Y., Chen, K.C., Chen, H., Seng, E.K., Chu, J.J., 2014. Antiviral activity of lanatoside C against dengue virus infection. *Antiviral Res.* 111, 93-99. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.09.007>.
- Chua, J.V., Chen, W.H., 2010. Bench-to-bedside review: vaccine protection strategies during pandemic flu outbreaks. *Crit Care.* 14, 218. <https://doi.org/10.1186/cc8891>.
- Cohen, T., Williams, J.D., Opperman, T.J., Sanchez, R., Lurain, N.S., Tortorella, D., 2016. Convallatoxin-induced reduction of methionine import effectively inhibits human cytomegalovirus infection and replication. *J Virol.* 90, 10715-10727. <https://doi.org/10.1128/JVI.01050-16>.
- Dodson, A.W., Taylor, T.J., Knipe, D.M., Coen, D.M., 2007. Inhibitors of the sodium potassium ATPase that impair herpes simplex virus replication identified via a chemical screening approach. *Virology.* 366, 340-348. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.05.001>.
- Dou, D., Revol, R., Östbye, H., Wang, H., Daniels, R., 2018. Influenza A virus cell entry, replication, virion assembly and movement. *Front Immunol.* 9, 1581. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01581>.
- Dudek, S.E., Luig, C., Pauli, E.K., Schubert, U., Ludwig, S., 2010. The clinically approved proteasome inhibitor PS-341 efficiently blocks influenza A virus and vesicular stomatitis virus propagation by establishing an antiviral state. *J Virol.* 84, 9439-9451. <https://doi.org/10.1128/JVI.00533-10>.
- Furuta, Y., Komeno, T., Nakamura, T., 2017. Favipiravir (T-705), a broad-spectrum inhibitor of viral RNA polymerase. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 93, 449-463. <https://doi.org/10.2183/pjab.93.027>.
- Gardner, T.J., Cohen, T., Redmann, V., Lau, Z., Felsenfeld, D., Tortorella, D., 2015. Development of a high-content screen for the identification of inhibitors directed against the early steps of

- the cytomegalovirus infectious cycle. *Antiviral Res.* 113, 49-61. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.10.011>.
- Grosso, F., Stoilov, P., Lingwood, C., Brown, M., Cochrane, A., 2017. Suppression of adenovirus replication by cardiotonic steroids. *J Virol.* 91, pii: e01623-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.01623-16>.
- Hoffmann, E., Neumann, G., Kawaoka, Y., Hobom, G., Webster, R.G., 2000. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 6108-6113. <https://doi.org/10.1073/pnas.100133697>.
- Hoffmann, H.H., Palese, P., Shaw, M.L., 2008. Modulation of influenza virus replication by alteration of sodium ion transport and protein kinase C activity. *Antiviral Res.* 80, 124-134. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.05.008>.
- Hoffmann-La Roche (Roche), 2018. Roche announces FDA approval of Xofluza (baloxavir marboxil) for influenza. <https://www.roche.com/investors/updates/inv-update-2018-10-24.htm> (accessed in december 2019).
- Honda, A., Ishihama, A., 1997. The molecular anatomy of influenza virus RNA polymerase. *Biol Chem.* 378, 483-488.
- Horisberger, J.D., 2004. Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. *Physiology (Bethesda).* 19, 377-387. <https://doi.org/10.1152/physiol.00013.2004>.
- Horwood, P.F., Karlsson, E.A., Horm, S.V., Ly, S., Heng, S., Chin, S., Darapheak, C., Saunders, D., Chanthap, L., Rith, S., Y, P., Chea, K.L., Sar, B., Parry, A., Ieng, V., Tsuyouka, R., Deng, Y.M., Hurt, A.C., Barr, I.G., Komadina, N., Buchy, P., Dussart, P., 2019. Circulation and characterization of seasonal influenza viruses in Cambodia, 2012-2015. *Influenza Other Respir Viruses.* 13, 465-476. <https://doi.org/10.1111/irv.12647>.
- Hui, E.K., Nayak D.P. 2001. Role of ATP in influenza virus budding. *Virology.* 290, 329-341. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1181>.
- Hurt, A.C., Hardie, K., Wilson, N.J., Deng, Y.M., Osbourn, M., Gehrig, N., Kelso, A., 2011. Community transmission of oseltamivir-resistant A(H1N1)pdm09 influenza. *N Engl J Med.* 365, 2541-2542. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1111078>.
- Hutchinson, E., Fodor, E., 2013. Transport of the Influenza Virus Genome from Nucleus to Nucleus. *Viruses.* 10, 2424–2446. <https://doi.org/10.3390/v5102424>.
- Ishihama, A., 1996. A multi-functional enzyme with RNA polymerase and RNase activities: molecular anatomy of influenza virus RNA polymerase. *Biochimie.* 78, 1097-1102, [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(97\)86735-1](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(97)86735-1).
- Jacob, A., Sood, R., Chanu, Kh.V., Bhatia, S., Khandia, R., Pateriya, A.K., Nagarajan, S., Dimri, U., Kulkarni, D.D., 2016. Amantadine resistance among highly pathogenic avian influenza viruses (H5N1) isolated from India. *Microb Pathog.* 91, 35-40. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.11.008>.

- Kawakami, E., Watanabe, T., Fujii, K., Goto, H., Watanabe, S., Noda, T., Kawaoka, Y., 2011. Strand-specific real-time RT-PCR for distinguishing influenza vRNA, cRNA, and mRNA. *J Virol Methods*. 173, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.12.014>.
- Kilkenny, C., Browne, W., Cuthill, I.C., Emerson M, Altman, D.G., 2010. Animal research: reporting *in vivo* experiments: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol*. 160, 1577-1579. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00872.x>.
- Kiyohara, H., Ichino, C., Kawamura, Y., Nagai, T., Sato, N., Yamada, H., Salama, M.M., Abdel-Sattar, E., 2012. *In vitro* anti-influenza virus activity of a cardiotonic glycoside from *Adenium obesum* (Forssk.). *Phytomedicine*. 19, 111-114, <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.07.004>.
- Kreis, W., 2017. The Foxgloves (Digitalis) Revisited. *Planta Med*. 83, 962-976. <https://doi.org/10.1055/s-0043-111240>.
- Leneva, I.A., Burtseva, E.I., Yatsyshina, S.B., Fedyakina, I.T., Kirillova, E.S., Selkova, E.P., Osipova, E., Maleev, V.V., 2016. Virus susceptibility and clinical effectiveness of anti-influenza drugs during the 2010–2011 influenza season in Russia. *Int J Infect Dis*. 43, 77-84. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.01.001>.
- Lo, C.Y., Tang, Y.S., Shaw, P.C., 2018. Structure and function of influenza virus ribonucleoprotein. *Subcell Biochem*. 88, 95-128. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8456-0_5.
- Liu, W., Saint, D.A., 2002. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal Biochem*. 302, 52–59. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5530>.
- Matos, A.R., Resende, P.C., Miranda, M.D., Garcia, C.C., Caetano, B.C., Lopes, J.C.O., Debur, M.C., Cury, A.L.F., Vianna, L.A., Lima, M.C., Schirmer, M., Gubareva, L., Hurt, A.C., Marrom, D.W., Siqueira, M.M. 2018. Susceptibility of Brazilian influenza A(H1N1)pdm09 viruses to neuraminidase inhibitors in the 2014-2016 seasons: Identification of strains bearing mutations associated with reduced inhibition profile. *Antiviral Res*. 154, 35-43. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.03.010>.
- Matos, A.R., Wunderlich, K., Schloer, S., Schughart, K., Geffers, R., Seders, M., de Witt, M., Christersson, A., Wiewrodt, R., Wiebe, K., Barth, P., Hocke, A., Hippenstiel, S., Hönzke, K., Dittmer, U., Sutter, K., Rescher, U., Rodionychewa, S., Matera, N., Ludwig, S., Brunotte, L., 2019. Antiviral potential of human IFN- α subtypes against influenza A H3N2 infection in human lung explants reveals subtype-specific activities. *Emerg Microbes Infect*. 8, 1763-1776. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1698271>.
- Mi, S., Li, Y., Yan, J., Gao, G.F., 2010. Na⁺/K⁺-ATPase β 1 subunit interacts with M2 proteins of influenza A and B viruses and affects the virus replication. *Sci China Life Sci*. 53, 1098-1105. <https://doi.org/10.1007/s11427-010-4048-7>.

- Norris, M.J., Malhi, M., Duan, W., Ouyang, H., Granados, A., Cen, Y., Tseng, Y.C., Gubbay, J., Maynes, J., Moraes, T.J., 2018. Targeting intracellular ion homeostasis for the control of respiratory syncytial virus. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 59, 733-744. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0345OC.v>.
- Noshi, T., Kitano, M., Taniguchi, K., Yamamoto, A., Omoto, S., Baba, K., Hashimoto, T., Ishida, K., Kushima, Y., Hattori, K., Kawai, M., Yoshida, R., Kobayashi, M., Yoshinaga, T., Sato, A., Okamatsu, M., Sakoda, Y., Kida, H., Shishido, T., Naito, A., 2018. *In vitro* characterization of baloxavir acid, a first-in-class cap-dependent endonuclease inhibitor of the influenza virus polymerase PA subunit. *Antiviral Res.* 160, 109-117. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.10.008>.
- Patel, S., 2016. Plant-derived cardiac glycosides: Role in heart ailments and cancer management. *Biomed Pharmacother.* 84, 1036-1041. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.030>.
- Perne, A., Muellner, M.K., Steinrueck, M., Craig-Mueller, N., Mayerhofer, J., Schwarzingler, I., Sloane, M., Uras, I.Z., Hoermann, G., Nijman, S.M., Mayerhofer, M., 2009. Cardiac glycosides induce cell death in human cells by inhibiting general protein synthesis. *PLoS One.* 4, e8292. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008292>.
- Prassas, I., Diamandis, E.P., 2008. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nat Rev Drug Discov.* 7, 926-935. <https://doi.org/10.1038/nrd2682>.
- Principi, N., Camilloni, B., Alunno, A., Polinori, I., Argentiero, A., Esposito, S., 2019. Drugs for influenza treatment: is there significant news? *Front Med.* 6, 109. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00109>.
- Pshenichnaya, N.Y., Bulgakova, V.A., Lvov, N.I., Poromov, A.A., Selkova, E.P., Grekova, A.I., Shestakova, I.V., Maleev, V.V., Leneva, I.A., 2019. Clinical efficacy of umifenovir in influenza and ARVI (study ARBITR). *Ter Arkh.* 91, 56-63. <https://doi.org/10.26442/00403660.2019.03.000127>.
- Rahimtoola, S.H., Tak, T., 1996. The use of digitalis in heart failure. *Curr Probl Cardiol.* 21, 781-853. [https://doi.org/10.1016/S0146-2806\(96\)80001-6](https://doi.org/10.1016/S0146-2806(96)80001-6).
- Rameix-Welti, M.A., Tomoiu, A., Afonso, E.S., Van Der Werf, S., Naffakh, N., 2009. Avian Influenza A virus polymerase association with nucleoprotein, but not polymerase assembly, is impaired in human cells during the course of infection. *J Virol.* 83, 1320-1331. <https://doi.org/10.1128/JVI.00977-08>.
- Schröder, T., Dudek, S.E., Schreiber, A., Ehrhardt, C., Planz, O., Ludwig, S., 2018. The clinically approved MEK inhibitor Trametinib efficiently blocks influenza A virus propagation and cytokine expression. *Antiviral Res.* 157, 80-92. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.07.006>.

- Schreiber, A., Liedmann, S., Brunotte, L., Anhlan, D., Ehrhardt, C., Ludwig, S., 2019. Type I interferon antagonistic properties of Influenza B virus polymerase proteins. *Cell Microbiol.* 11, e13143. <https://doi.org/10.1111/cmi.13143>.
- Shaw, M.L., Palese, P., 2013. Orthomyxoviridae. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Cohen, J.I., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Racaniello, V.R., Roizman, B. (Eds.), *Fields Virology*, 6 ed, Philadelphia, pp.1151-1185.
- Singh, S., Shenoy, S., Nehete, P.N., Yang, P., Nehete, B., Fontenot, D., Yang, G., Newman, R.A., Sastry, K.J., 2013. *Nerium oleander* derived cardiac glycoside oleandrin is a novel inhibitor of HIV infectivity. *Fitoterapia.* 84, 32-39. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2012.10.017>.
- Soema, P.C., Kompier, R., Amorij, J.P., Kersten, G.F., 2015. Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 94, 251-263. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.05.023>.
- Su, C.T., Hsu, J.T., Hsieh, H.P., Lin, P.H., Chen, T.C., Kao, C.L., Lee, C.N., Chang, S.Y., 2008. Anti-HSV activity of digitoxin and its possible mechanisms. *Antiviral Res.* 79, 62-70. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.01.156>.
- Su, S., Fu, X., Li, G., Kerlin, F., Veit, M., 2017. Novel Influenza D virus: epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. *Virulence.* 8, 1580-1591. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1365216>.
- Takashita, E., Ejima, M., Itoh, R., Miura, M., Ohnishi, A., Nishimura, H., Odagiri, T., Tashiro, M., 2014. A community cluster of influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013. *Euro Surveill.* 19, pii: 20666. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.1.20666>.
- Takashita, E., Ejima, M., Ogawa, R., Fujisaki, S., Neumann, G., Furuta, Y., Kawaoka, Y., Tashiro, M., Odagiri, T., 2016. Antiviral susceptibility of influenza viruses isolated from patients pre- and post-administration of favipiravir. *Antiviral Res.* 132, 170-177. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.06.007>.
- Van Der Kolk, T., Dillingh, M.R., Rijneveld, R., Klaassen, E.S., Koning, M.N.C., Kouwenhoven, S.T.P., Genders, R.E., Bouwes Bavinck, J.N., Feiss, G., Rissmann, R., Burggraaf, J., 2017. Topical ionic contra-viral therapy comprised of digoxin and furosemide as a potential novel treatment approach for common warts. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 31, 2088-2090. <https://doi.org/10.1111/jdv.14527>.
- Wathen, M.W., Barro, M., Bright, R.A., 2012. Antivirals in seasonal and pandemic influenza--future perspectives. *Influenza Other Respir Viruses.* 7, 76-80. <https://doi.org/10.1111/irv.12049>.
- Weinheimer, V.K., Becher, A., Tönnies, M., Holland, G., Knepper, J., Bauer, T.T., Schneider, P., Neudecker, J., Rückert, J.C., Szymanski, K., Temmesfeld-Wollbrueck, B., Gruber, A.D., Bannert, N., Suttorp, N., Hippenstiel, S., Wolff, T., Hocke, A.C. 2012. Influenza A viruses

- target type II pneumocytes in the human lung. *J Infect Dis.* 206, 1685-1694. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis455>.
- World Health Organization (WHO), 2020a. Influenza (seasonal). [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)) (accessed in february 2020).
- World Health Organization (WHO), 2020b. Influenza vaccine viruses and reagents. <https://www.who.int/influenza/vaccines/virus/en/> (accessed in february 2020).
- Wong, R.W., Balachandran, A., Ostrowski, M.A., Cochrane, A., 2013. Digoxin suppresses HIV-1 replication by altering viral RNA processing. *PLoS Pathog.* 9, e1003241. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003241>.
- Wong, R.W., Lingwood, C.A., Ostrowski, M.A., Cabral, T., Cochrane, A., 2018. Cardiac glycoside/aglycones inhibit HIV-1 gene expression by a mechanism requiring MEK1/2-ERK1/2 signaling. *Sci Rep.* 8, 850. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19298-x>.
- Yang, C.W., Chang, H.Y., Hsu, H.Y., Lee, Y.Z., Chang, H.S., Chen, I.S., Lee, S.J., 2017. Identification of anti-viral activity of the cardenolides, Na⁺/K⁺-ATPase inhibitors, against porcine transmissible gastroenteritis virus. *Toxicol Appl Pharmacol.* 332, 129-137. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.04.017>.
- Yang, J., Du, J., Huang, C., Wang, T., Huang, L., Yang, S., Li, L., 2019. Discovery of 5-(5-fluoro-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-3-yl)pyrazin-2(1H)-one derivatives as new potent PB2 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 29, 1609-1613. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.04.042>.
- Yang, C.W., Chang, H.Y., Lee, Y.Z., Hsu, H.Y., Lee, S.J., 2018. The cardenolide ouabain suppresses coronaviral replication via augmenting a Na⁺/K⁺-ATPase-dependent PI3K_PDK1 axis signaling. *Toxicol Appl Pharmacol.* 356, 90-97. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.07.028>.
- Zhang, J., Hu, Y., Wu, N., Wang, J., 2019. Discovery of influenza polymerase PA-PB1 interaction inhibitors using an *in vitro* split-luciferase complementation-based assay. *ACS Chem Biol.* [early view]. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00552>.
- Zhao, X., Wang, Y., Cui, Q., Li, P., Wang, L., Chen, Z., Rong, L., Du, R., 2019. A parallel phenotypic versus target-based screening strategy for RNA-dependent RNA polymerase inhibitors of the influenza A virus. *Viuses.* 9, pii: E826. <https://doi.org/10.3390/v11090826>.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Two novel semisynthetic cardenolides acting as antiviral inhibitors of influenza A virus polymerase complex formation

Laurita Boff ^{a,b}; André Schreiber ^a; Aline da Rocha Matos ^{a,c}; Juliana Del Sarto ^{a,d}; Linda Brunotte ^a; Jennifer Munkert ^e; Flaviano Melo Ottoni ^d; Gabriela Silva Ramos ^d; Wolfgang Kreis ^e; Fernão Castro Braga ^d; Ricardo José Alves ^d; Rodrigo Maia de Pádua ^d; Cláudia Maria Oliveira Simões ^{b,*}, Stephan Ludwig ^a

^a Institute of Virology (IVM), Centre for Molecular Biology of Inflammation (ZMBE), Westfaelische Wilhelms University (WWU), Münster, Germany

^b Laboratório de Virologia Aplicada, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil.

^c Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo, National Influenza Center (NIC)/ World Health Organization (WHO), Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

^d Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil.

^e Pharmaceutical Biology, Department of Biology, Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nuremberg, Germany.

* Corresponding author:

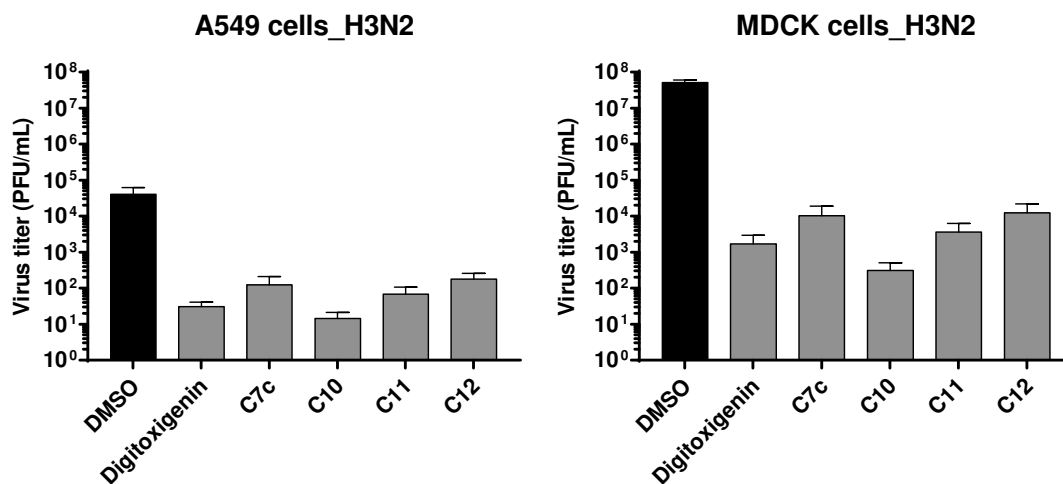
E-mail address: *claudia.simoes@ufsc.br* (C. M. O. Simões)

Supplementary data index

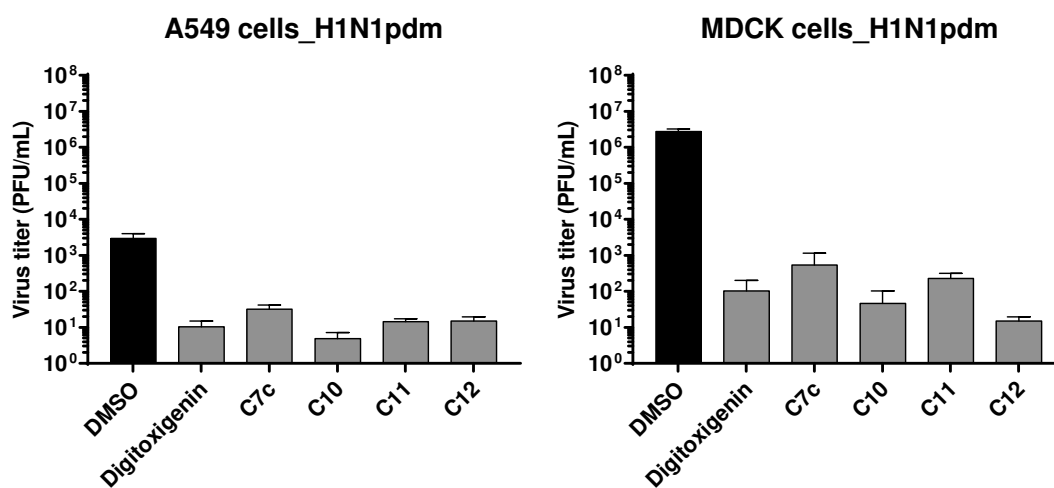
1. Fig. S1.....	02
2. Fig. S2.....	03

Fig. S1. Antiviral activity of new cardenolide derivatives **C7c**, **C10**, **C11** and **C12** and digitoxigenin against distinct Influenza A and B Virus strains, at 1 μ M.

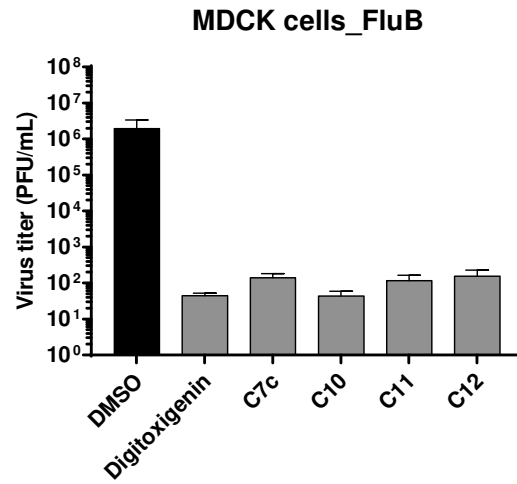
A) Influenza A Virus [Panama/2007/1999 (H3N2)] on A549 and MDCK cells.



B) Influenza A Virus [Hamburg/04/2009(H1N1pdm)] on A549 and MDCK cells.



C) Influenza B Virus (Lee/40) on MDCK cells.



D) Influenza A Virus [Seal/Mass/1-SC35M/80 (H7N7) (SC35M)] on A549 and MDCK cells.

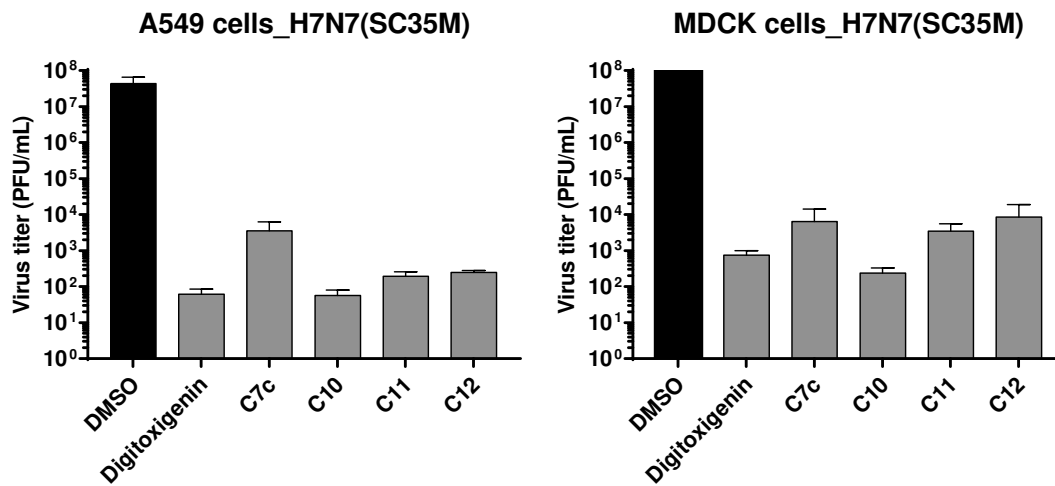
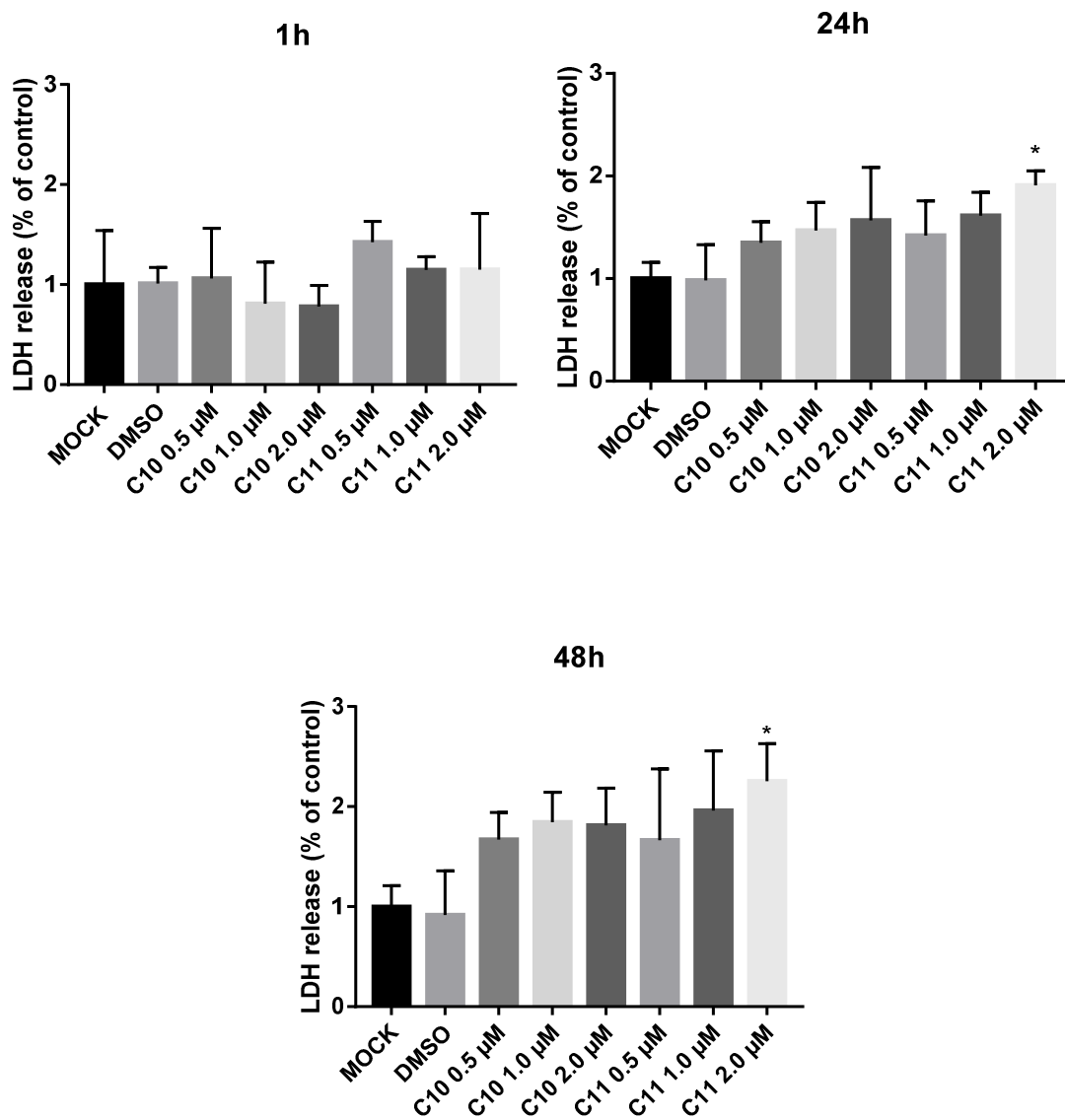


Fig. S2. Viability of human tumor-free lung explants after treatment with C10 and C11. Lung tissue explants were treated and their viability over time was assessed by measuring LDH release in culture supernatants, which were collected at the indicated time points. Results are presented as Optical Densities at 450 nm and have been corrected according to the individual weights of the tissue fragments (mg). The experiment was repeated with lung tissues derived from four independent donors. Each time point represents mean (\pm SEM). DMSO served as solvent control. * $p < 0.05$ vs MOCK, one-way ANOVA, post-hoc test Dunnett.



ATIVIDADES ANTIVIRAL, ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DOS COMPOSTOS C10 E C11

6 APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO

Neste capítulo serão apresentados, de forma resumida, os resultados de outros experimentos realizados durante o doutoramento, com ênfase em outras atividades farmacológicas, tais como antiviral (anti-norovírus e anti-Zika), antioxidante e anti-inflamatória.

6.1 Avaliação da potencial atividade antiviral

6.1.1 Norovírus

6.1.1.1 Metodologia

A avaliação da atividade antiviral foi realizada pelo ensaio de redução do número placas de lise, descrito por Bae e Schwab (2008), com pequenas modificações, e padronizado no Laboratório de Virologia Aplicada por Cruz (2015). Resumidamente, células RAW 264.7 foram cultivadas em placas de seis cavidades e infectadas com 100 unidades formadoras de placas de lise (UFP) por cavidade do norovírus murino tipo 1 (cepa NVM-1). Após 1 h de infecção viral, o inóculo viral foi aspirado e foi colocado cuidadosamente 2 mL/cavidade de MEM 1× + 1,5% SeaPlake® Agarose contendo as amostras em diferentes concentrações não citotóxicas. As células foram então incubadas por 48 h a 37°C e 5% de CO₂. Após a incubação as células foram coradas com 1,0 mL de uma solução de 0,1% do corante Vermelho Neutro, contadas assim que foi possível visualizá-las e, a atividade inibitória foi calculada (%) em relação ao controle viral não tratado. Os valores de CI₅₀ (concentração de cada amostra que reduz em 50% o número de placas de lise) foram determinados por meio de análise de regressão não linear. Com a razão dos valores de CC₅₀ e CI₅₀ foi possível calcular o índice de seletividade (IS), que reflete a potência e seletividade de cada amostra.

6.1.1.2 Resultados

Inicialmente, os 16 novos derivados semissintéticos foram submetidos à triagem anti-norovírus a 1 μM . Todos os compostos apresentaram uma inibição da replicação viral inferior a 30%. Por este motivo, tais compostos foram submetidos a uma nova triagem, porém a 10 μM . Somente o composto **C9** inibiu a replicação viral acima de 30%. Este composto foi avaliado quanto ao seu potencial antiviral *in vitro* apresentando efeitos tóxicos moderados (valor de CC_{50} de 24,77 μM em células RAW 264.7) e um valor de CI_{50} de 5,53 μM após 48 h. Nesse contexto, decidiu-se por não continuar os ensaios com o norovírus, pois o composto em questão é instável em solução e seu IS é baixo (IS = 4,5).

6.1.2 Vírus Zika

6.1.2.1 Metodologia

A avaliação da atividade anti-Zika foi realizada pelo ensaio de redução do número placas de lise, de acordo com a metodologia padronizada (CARDOZO, 2016) no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (LIM 52). Resumidamente, monocamadas de células Vero, cultivadas em placas de 24 cavidades foram infectadas com 40 UFP por cavidade do vírus Zika (isolado clínico). Após 1 h de infecção viral, as células foram tratadas com diferentes concentrações não citotóxicas das amostras a serem testadas, preparadas em solução de carboximetilcelulose (CMC). As células foram então incubadas por cinco dias em atmosfera umedecida a 37°C e 5% de CO_2 . Após a incubação, as células foram coradas com uma solução de preto de naftaleno e as placas de lise formadas foram contadas com auxílio de microscópio estereoscópico. A porcentagem de inibição foi determinada em relação ao controle viral não tratado. Por meio da análise de regressão não linear, foi possível calcular a concentração inibitória a 50% (CI_{50}), ou seja, a concentração de cada amostra que reduz em 50% o número de placas de lise. O valor de IS foi obtido conforme explicitado no item 6.1.1.1.

6.1.2.2 Resultados

Apenas os compostos **C7b**, **C7c**, **C10**, **C11**, **C12** e **C13** foram avaliados quanto ao seu potencial *in vitro* anti-Zika, pelo ensaio de redução do número das placas de lise. De acordo com os valores de CC_{50} obtidos (Tabela 6.1) em células Vero pelo ensaio MTT, os compostos **C7c**, **C7b** e **C12** apresentaram alta citotoxicidade, o **C13** apresentou moderado efeito citotóxico, enquanto o **C10** e o **C11** apresentaram baixa citotoxicidade. Apenas o composto **C10** apresentou resultados promissores contra o vírus Zika com um valor de CI_{50} de $0,17 \mu\text{M}$ após 48 h. Tal CI_{50} é muito interessante porque a ribavirina, utilizada como controle positivo, apresentou um valor de CI_{50} de $65 \mu\text{M}$. Este experimento estava sendo realizado em cooperação com a Dr^a. Francielle Tramontini Gomes de Sousa, na FMUSP, São Paulo, SP; no entanto, ele foi descontinuado porque a referida profissional passou a atuar em uma Universidade norte-americana.

Tabela 6.1 – Resultados da avaliação da citotoxicidade de cardenólídeos semissintéticos em células Vero e da atividade anti-Zika.

Amostras	Células Vero	Vírus Zika	
	CC_{50} (μM)	CI_{50} (μM)	IS
C7b	$9,72 \pm 0,77$	Sem atividade	-
C7c	$3,43 \pm 2,18$	Sem atividade	-
C10	$40,67 \pm 34,21$	$0,17 \pm 0,00$	232,53
C11	$86,90 \pm 70,51$	Sem atividade	-
C12	$10,06 \pm 10,96$	Sem atividade	-
C13	$18,63 \pm 13,97$	Sem atividade	-
Ribavirina	$59751,00 \pm 41229,98$	$65,00 \pm 22,31$	919,32

CC_{50} = concentração que reduziu em 50% a viabilidade das células Vero;
 CI_{50} = concentração que inibiu 50% da replicação viral;
 IS = índice de seletividade (CC_{50}/CI_{50}).

6.2 Avaliação do potencial antioxidante

6.2.1 Ensaio com o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

A determinação do potencial de captação de radicais livres foi realizada por meio do ensaio com o radical DPPH (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET, 1995). Para isso, foram adicionados $100 \mu\text{L}$ de seis diferentes concentrações dos compostos **C10** e **C11** a $3,9 \text{ mL}$ de

uma solução metanólica de DPPH (60 μ M). Após 60 min, as absorvâncias dos compostos foram aferidas, a 515 nm, em espectrofotômetro Lambda 25 UV/Vis, PerkinElmer®. Os resultados foram plotados como absorvâncias *versus* concentrações dos compostos, e por meio da análise de regressão linear, foram obtidos os valores de EC₅₀, ou seja, a concentração necessária capaz de reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH, sendo os resultados expressos em mg.mL⁻¹. Como controle positivo foi utilizado o ácido gálico (Sigma-Aldrich), por seu reconhecido potencial antioxidante. As análises foram efetuadas em triplicata, em dias diferentes.

6.2.2 Ensaio com o radical ABTS [ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)]

A determinação do potencial de captação de radicais livres também foi realizada por meio do ensaio com o radical ABTS (MILLER; RICE-EVANS, 1997; RE et al., 1999). Para o preparo da solução do radical ABTS, o reagente ABTS (7 mM) foi misturado com persulfato de potássio (2,45 mM), em iguais proporções. Após 16 h, a solução contendo o radical formado foi diluída até a obtenção de uma solução com absorvância de 0,7 em espectrofotômetro Lambda 25 UV/Vis, PerkinElmer®, a 734 nm. Finalizado o preparo dos reagentes, 10 μ L de seis diferentes concentrações dos compostos **C10** e **C11** foram adicionados a 1 mL da solução contendo o radical ABTS. Após 5 min, as absorvâncias foram mensuradas a 734 nm. Os resultados foram plotados como absorvâncias *versus* concentrações dos compostos, e por meio de análise de regressão linear, foram obtidos os valores de EC₅₀, ou seja, a concentração necessária capaz de reduzir em 50% a concentração inicial do radical ABTS, sendo os resultados expressos em mg.mL⁻¹. Como controle positivo foi utilizado o ácido gálico. As análises foram realizadas em triplicata, em dias diferentes.

6.2.2.1 Resultados

Os compostos **C10** e **C11** não apresentaram atividade antioxidante.

6.3 Avaliação da potencial atividade anti-inflamatória

Tendo em vista que, geralmente, durante o processo infeccioso viral ocorre também um processo inflamatório, avaliou-se a potencial atividade anti-inflamatória dos compostos **C10** e **C11** contra os vírus herpéticos por meio da quantificação das interleucinas IL6, IL10 e IL1B, e TNF- α produzidas pelas células Vero, THP-1 (linhagem humana de leucemina monocítica) e U937 (linhagem celular humana de linfoma histiocítico), estimuladas com LPS e Zymozan,

empregando um imunoenensaio, conforme descrito por Vuolo et al. (2015), Boff et al. (2016) e Rosa et al. (2016), com pequenas modificações.

As etapas experimentais iniciais foram realizadas no Laboratório de Virologia Aplicada, que consistiram no tratamento das células com os compostos, estimulação das mesmas e coleta dos sobrenadantes.

As etapas finais foram realizadas em parceria com o Professor Dr. Felipe Dal Pizzol, UNESC, Criciúma, SC. No entanto, os resultados obtidos não indicaram ação anti-inflamatória, nas condições experimentais testadas.

REFERÊNCIAS

- BAE, J.; SCHWAB, K. J. Evaluation of murine norovirus, feline calicivirus, poliovirus and MS2 as surrogates for human norovirus in a model of viral persistence in surface water and groundwater. **Appl Environ Microbiol**, v.74, p.477-484, 2008.
- BOFF, L.; SILVA, I. T.; ARGENTA, D. F., et al. *Strychnos pseudoquina* A. St. Hil.: a Brazilian medicinal plant with promising *in vitro* antiherpes activity. **J Appl Microbiol**, v.121, p.1519-1529, 2016.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Sci Technol**, v.28, n.1, p.25-30, 1995.
- CARDOZO, F. T. G. S. **POP 21: Ensaio de atividade anti-Zika pelo método de placas de lise**. In: Procedimentos Operacionais Padrão (Pops) das atividades realizadas no Laboratório de Virologia (LIM 52) da Universidade de São Paulo. Pasta Protocolos, 2016.
- CRUZ, A. C. C. **POP 3.21: Protocolo para titulação do Norovírus murino por placa de lise**. In: Procedimentos Operacionais Padrão (Pops) das atividades realizadas no Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) da Universidade Federal de Santa Catarina. Pasta Protocolos, 2015.
- MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. A. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS^{•+} radical cation assay. **Free Radic Res**, v.26, n.3, p.195-199, 1997.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A., et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Rad Biol Med**, v.26, n.9-10, p.1231-1237, 1999.
- ROSA, L.; FURLANETTO, C. B., et al. Administration of branched-chain amino acids alters the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. **Int J Dev Neurosci**, v.48, p.24-30, 2016.
- VUOLO, F.; PETRONILHO, F.; SONAI, B., et al. Evaluation of serum cytokines levels and the role of cannabidiol treatment in animal model of asthma. **Mediators Inflamm**, v.2015, p.538670, 2015.

DISCUSSÃO GERAL

Os compostos de origem natural possuem uma diversidade estrutural e complexidade únicas, e por isso, originaram e continuam a dar origem a inúmeros compostos/fármacos com potencial atividade biológica e/ou farmacológica (NEWMAN; CRAGG, 2007; BUTLER; ROBERTSON; COOPER, 2014; NEWMAN; CRAGG, 2016; BERTELLI et al., 2019).

Nesse contexto, os cardenolídeos que fazem parte do grupo dos heterosídeos cardioativos, têm sido utilizados no tratamento de doenças cardíacas há mais de 200 anos, e são caracterizados por sua alta especificidade e poderosa ação cardiotônica (BESSEN, 1986).

Apesar da ampla utilização dos cardenolídeos como agentes inotrópicos positivos, a investigação dos efeitos desses compostos em outras situações patológicas se intensificou nos últimos anos, apresentando novas possibilidades terapêuticas; entre elas podemos citar os efeitos antivirais, citotóxicos e antitumorais (PRASSAS; DIAMANDIS, 2008). Nesse sentido, os estudos com cardenolídeos naturais e semissintéticos vêm crescendo, já tendo sido relatada sua potencial atividade por diversos grupos de pesquisa contra diferentes tipos de vírus e cânceres.

Há vários anos, a equipe do Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) da UFSC (<http://lvapli.paginas.ufsc.br>), avalia a atividade antiviral (frente a diferentes vírus DNA e RNA) e citotóxica (frente a células humanas tumorais e saudáveis) de produtos naturais e compostos semissintéticos, por meio de diferentes estratégias experimentais, contribuindo para a descoberta de moléculas bioativas como potenciais candidatos a fármacos; nos últimos anos, com maior enfoque para o estudo dos cardenolídeos.

Desde então, 64 cardenolídeos já foram avaliados contra o HSV-1 e HSV-2, sendo que um desses, glucoevatromonosídeo (GEV), foi selecionado para avaliação do seu mecanismo anti-herpético (BERTOL et al., 2011).

Em relação aos efeitos citotóxicos, foram avaliados 46 cardenolídeos na linhagem celular A549, e o mesmo composto (GEV) se destacou (CARVALHO, 2012), sendo selecionado para avaliação em outras linhagens celulares tumorais e não tumorais; e investigação do mecanismo de morte celular (SCHNEIDER, 2015; SCHNEIDER et al., 2018a).

Considerando os avanços e o potencial dessa classe de compostos, por meio de parceria já estabelecida, novos derivados semissintéticos de cardenolídeos foram fornecidos pelos Profs.

Drs. Fernão Castro Braga, Rodrigo Maia de Pádua e Ricardo Alves, da Faculdade de Farmácia da UFMG, e que foram o principal objeto de estudo deste trabalho.

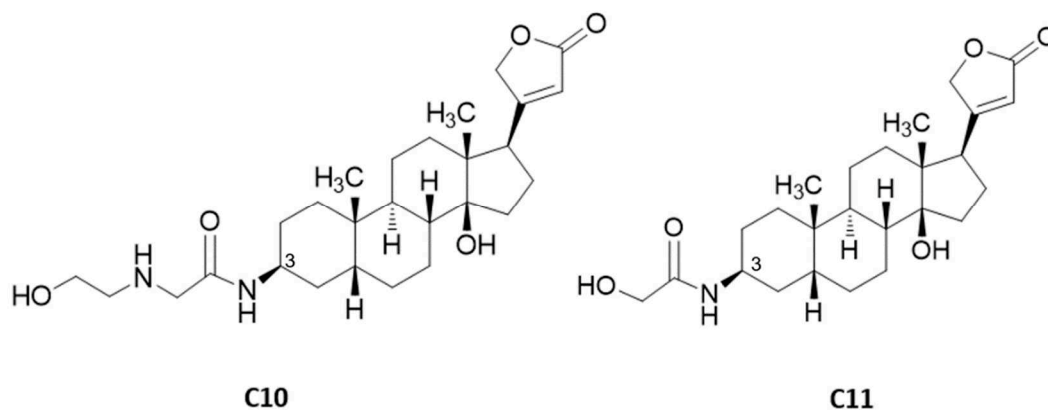
Como descrito no **Capítulo 2** desta Tese de doutorado, duas novas séries (i e ii) de cardenolídeos foram obtidas a partir da estrutura da digitoxigenina, resultando no total de 16 novos derivados semissintéticos de cardenolídeos:

(i) cardenolídeos desenhados são análogos do GEV, no qual a porção açúcar original (D-digitoxose) foi substituída por uma porção triazolil *O*-glicosídica, a fim de facilitar a síntese e avaliar a influência dos carboidratos escolhidos (por exemplo: glicose, manose, galactose) e do anel triazólico na atividade da digitoxigenina;

(ii) cardenolídeos desenhados com base na estrutura da AMANTADIG, que é um composto com promissores efeitos citotóxico e antiviral, tendo sido relatada sua atividade contra diferentes linhagens de células tumorais como leucemia (K562 e SEM), próstata (PC-3, DU145, LNCaP) e renais (A498, 786- O e Caki-1) (NOLTE et al., 2015; NOLTE et al., 2017; SILVA et al., 2018); e que foi também capaz de inibir a replicação dos vírus HSV-1 (IS=189,62 cepa KOS e IS=223,11 cepa 29-R) e HSV-2 (IS=59,70 cepa 333). Nessa série, o grupamento adamantano foi substituído por grupamentos menores para avaliar se a atividade dos novos compostos seria mantida, diminuída ou melhorada.

Esses 16 novos derivados foram submetidos às triagens citotóxica, anti-herpética e anti-influenza. Como resultado das três triagens, dois compostos (**C10** e **C11**) (Figura 1) se destacaram por suas potentes ações.

Figura 1 – Estruturas químicas dos compostos **C10** e **C11**.



As diferenças estruturais entre os cardenolídeos, que são relacionadas aos diferentes substituintes na porção aglicona, podem alterar a atividade dessa classe de compostos. Como discutido no **Capítulo 4**, a maioria dos cardenolídeos testados por Bertol et al. (2011), Dodson et al. (2007) e Su et al. (2008) possuem açúcares ligados ao carbono 3, diferentemente dos compostos aqui testados, especialmente **C10** e **C11**. Ambos os compostos possuem grupamentos amina no carbono 3 e foram capazes de inibir a replicação dos HSV em concentrações nM, mas não com a mesma potência daqueles contendo açúcares. Dessa maneira, a porção de açúcar parece não ser crucial para a atividade; porém, influencia positivamente tal ação. Além disso, o composto **C10** foi o mais ativo em todas as triagens e, portanto, é possível sugerir que o grupamento amina adicional localizado na cadeia lateral poderia estar contribuindo para o aumento dessa potência. Nesse sentido, pode-se citar os estudos de Fytas et al. (2010) e Tataridis et al. (2007), que mostraram aumento da atividade antiviral em derivados do adamantano com grupamentos amina adicionais.

Ainda, os compostos mais ativos nas triagens citotóxica, anti-herpética e anti-influenza foram os mesmos, **C10** e **C11**, sugerindo que ambos compartilham o mesmo alvo primário: a enzima Na^+/K^+ -ATPase. Como descrito na literatura, a Na^+/K^+ -ATPase desempenha um importante papel na homeostase iônica e é o principal alvo dos cardenolídeos por meio da sua ligação a subunidade alfa (NEWMAN et al., 2008; LAURSEN et al., 2013), que é super expressa em vários tipos de câncer, tais como os de pulmão do tipo NSCLC (MIJATOVIC et al., 2007). Os cardenolídeos apresentam a capacidade de inibir a bomba de Na^+/K^+ presente na superfície celular, a qual é responsável pelo estabelecimento e manutenção de um gradiente eletroquímico essencial para diversos processos fisiológicos, entre eles a replicação celular.

Ademais, sugere-se que a ligação dos cardenolídeos à Na^+/K^+ -ATPase cria um ambiente desfavorável a replicação viral e isso já foi demonstrado para os HSV (DODSON et al., 2007; SU et al., 2008) e para os VI (HUI; NAYAK, 2001; HOFFMANN et al., 2008; MI et al., 2010), visto que os vírus necessitam de uma concentração ideal de K^+ para que seu material genético seja sintetizado (HARTLEY et al., 1993). Nesse contexto, todos os 16 novos derivados também foram testados quanto a sua capacidade de inibir essa enzima. Novamente, os compostos **C10** e **C11** foram os mais ativos, e esse resultado correlaciona-se adequadamente com as bioatividades desses compostos.

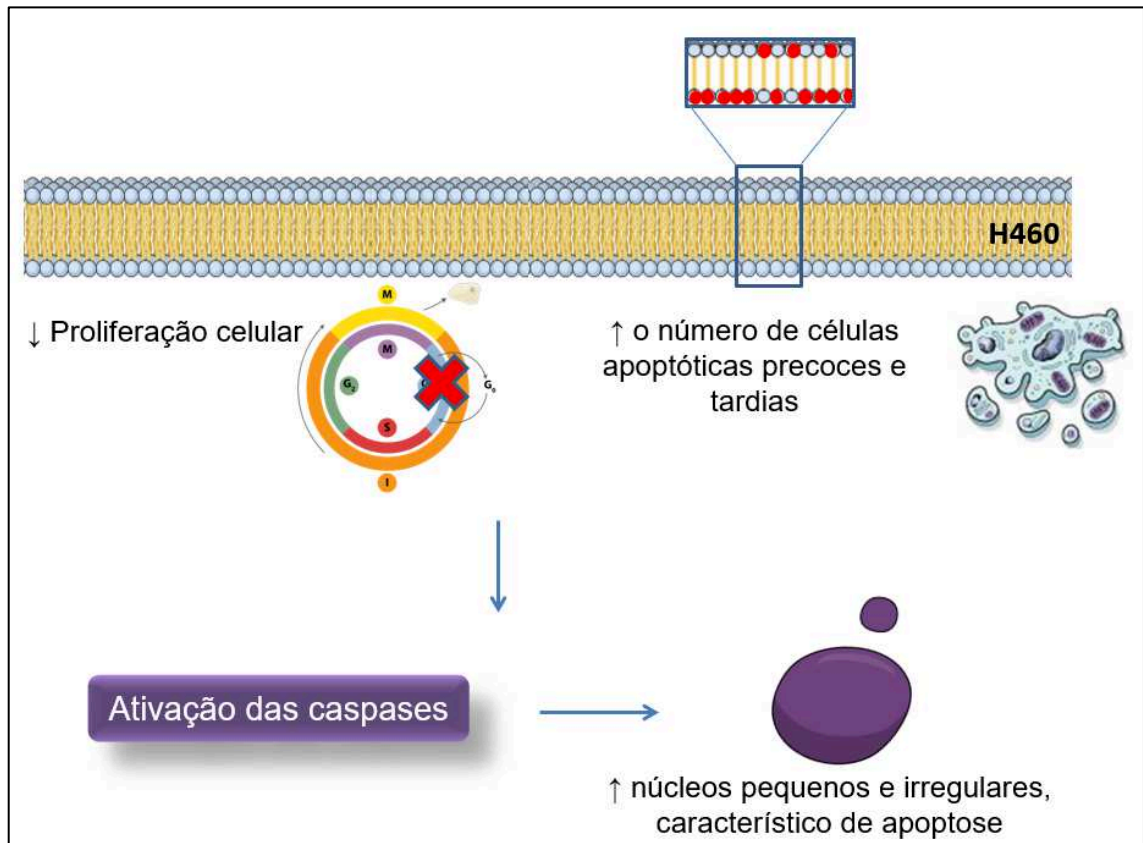
Conforme descrito no **Capítulo 3**, o mecanismo de morte celular induzido pelo composto **C10** nas células não pequenas de pulmão humano H460 (que foi a linhagem celular mais

sensível a ação desse composto na etapa de triagem) é característico de apoptose, por induzir aumento significativo dessas células na fase subG1 do ciclo celular, assim como das células apoptóticas precoces e tardias por meio da externalização da fosfatidilserina, e dos núcleos pequenos e irregulares. Tal morte celular foi confirmada pelo ensaio das caspases-3/7 (Figura 2), e esse mecanismo é um dos sugeridos para essa classe de compostos (DIEDERICH; MULLER; CERELLA, 2017). No entanto, pelo fato do mecanismo da ação citotóxica dos cardenólídeos ser bastante complexo, ele não foi, até o momento, totalmente elucidado.

A apoptose pode ser definida como um mecanismo vital para determinados processos fisiológicos, que incluem a eliminação de células indesejáveis, renovação das células normais, manutenção do sistema imunológico, desenvolvimento embrionário e atrofia dependente de hormônios (HEJMADI, 2010).

Quando considerada um tipo de morte celular, a apoptose possui as seguintes características morfológicas: condensação de cromatina, fragmentação nuclear, perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, formação de corpos apoptóticos, arredondamento celular e retração de pseudópodos. Geralmente, esse processo depende da ação das caspases, da fragmentação nuclear e da exposição da fosfatidilserina (ORLIKOVA; DICATO; DIEDERICH, 2013; GALLUZZI et al., 2018). Por ser altamente regulado, esse mecanismo de morte é considerado desejável para o desenvolvimento de quimioterápicos (ELMORE, 2007).

Figura 2 – Proposta do mecanismo de morte celular induzida pelo composto **C10** em células não pequenas de pulmão humano H460.



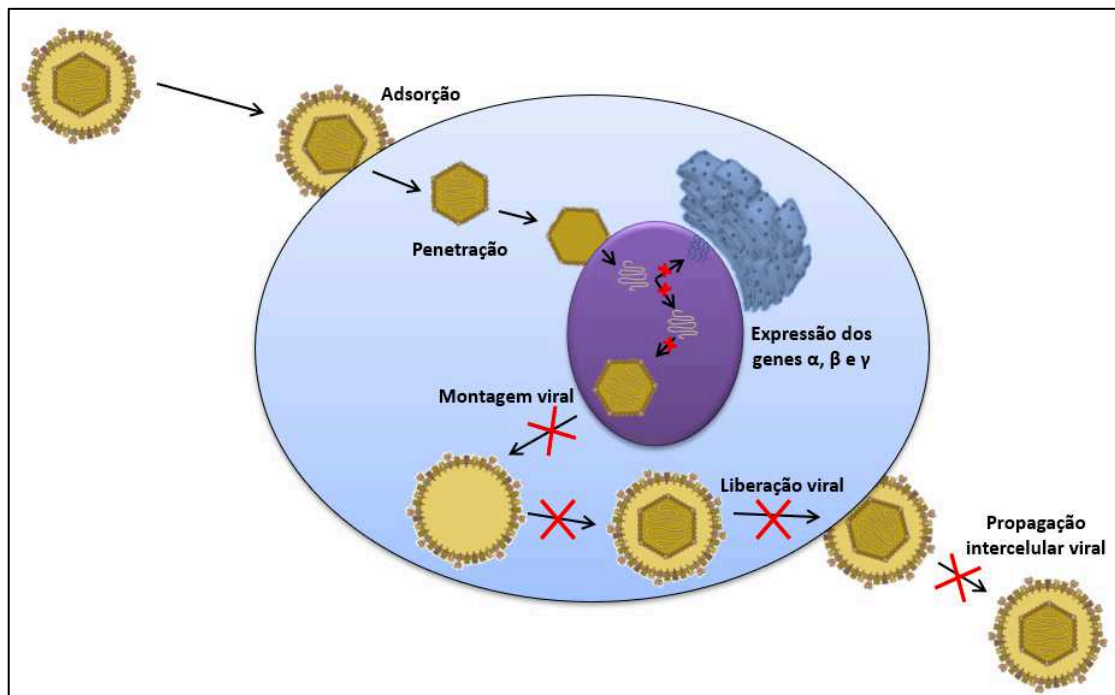
O nosso grupo de pesquisa já estudou a ação citotóxica de vários cardenolídeos em inúmeras linhagens celulares tumorais humanas, e para cada linhagem celular, cada composto pode apresentar resultados completamente diferentes (SCHNEIDER et al., 2015; SCHNEIDER et al., 2016; SCHNEIDER et al., 2017a; SCHNEIDER et al., 2018a,b). Já foi determinado que os cardenolídeos podem provocar parada do ciclo celular em diferentes fases (particularmente, G₂M), e induzir apoptose, autofagia, *anoikis* ou morte celular imunogênica em células tumorais, dependendo da linhagem celular e das características químicas dos cardenolídeos em estudo (MIJATOVIC et al., 2006; CERELLA et al., 2015; SCHNEIDER et al., 2017b).

Esse complexo potencial citotóxico atrai continuamente o interesse dos pesquisadores, pois pode ser considerado como uma alternativa para o tratamento de tumores resistentes à quimioterapia realizada com fármacos indutores de apoptose (SLINGERLAND et al., 2013; SCHNEIDER et al., 2017b).

Para a investigação do mecanismo de ação anti-herpética dos compostos **C10** e **C11** (**Capítulo 4**), a principal inovação desse trabalho comparado com os de Dodson et al. (2007) e SU et al. (2008) e, principalmente, com o de Bertol et al. (2011), visto que esse último é do nosso grupo de pesquisa; está nas diferenças estruturais entre os cardenolídeos testados, como já exposto acima.

O estudo realizado no âmbito desta Tese contribuiu para a identificação de um mecanismo anti-herpético exclusivo para essa classe de compostos, diferentemente do que é encontrado para o mecanismo citotóxico. Foi demonstrada a interferência dos compostos **C10** e **C11** nas etapas intermediárias e finais da replicação dos HSV, por inibirem total ou parcialmente a expressão dos genes α , β e γ , representados neste estudo pelas proteínas ICP27, UL42 e gD, respectivamente. Consequentemente, eles interferiram nas etapas de montagem, liberação e propagação intercelular viral das novas partículas virais geradas. Eles não apresentaram efeitos profiláticos ou afetaram as etapas iniciais da replicação dos HSV (adsorção, pós-adsorção e penetração) (Figura 3). Embora trabalhos anteriores tenham abordado os efeitos anti-herpéticos de diferentes cardenolídeos (DODSON et al., 2007; SU et al., 2008; BERTOL et al., 2011), a investigação do mecanismo de ação dos cardenolídeos, representados neste trabalho por **C10** e **C11**, contra o HSV-1 (cepa 29-R) e o HSV-2 (cepa 333), foram descritos aqui pela primeira vez.

Figura 3 – Proposta do mecanismo da ação anti-HSV-1 e anti-HSV-2 dos compostos **C10** e **C11**.

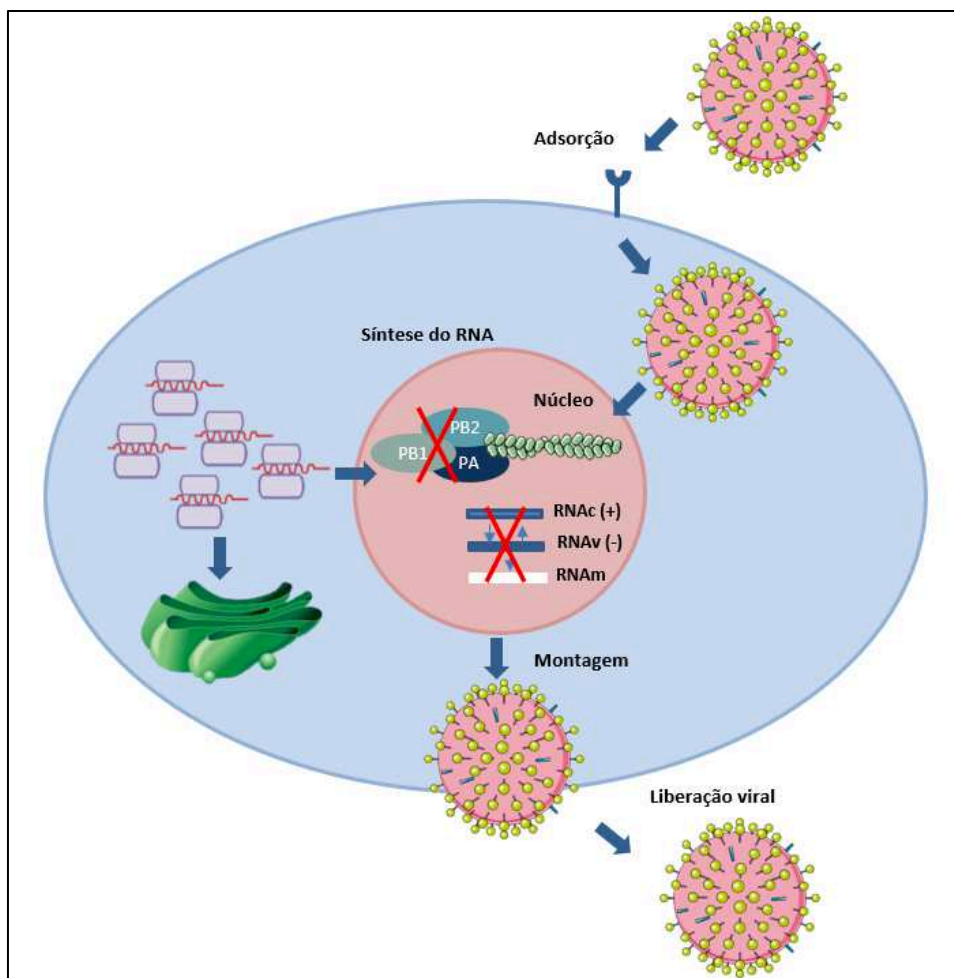


Objetivando a avaliação da ação anti-influenza de uma série de novos cardenólídeos semissintéticos, foi realizado um estágio de doutorado-sanduíche, durante o período de 12 meses, no Instituto de Virologia Molecular da Universidade de Münster, Alemanha. A probabilidade que esses compostos fossem ativos contra a replicação dos VI era bastante alta, tendo em vista trabalhos prévios com outros cardenólídeos ou plantas contendo heterosídeos cardioativos (GRIENKE et al., 2010; KIYOHARA et al., 2012; EHRHARDT et al., 2013; HAASBACH et al., 2013; VERSIANI et al., 2014; DERKSEN et al., 2016; SHOJI et al., 2017).

Após a triagem inicial com os 16 novos derivados semissintéticos de cardenólídeos, frente a duas linhagens celulares (A549 e MDCK) e diferentes vírus influenza dos tipos A e B, os compostos **C10** e **C11** foram novamente os mais ativos e, portanto, selecionados para a investigação do seu mecanismo de ação nas células MDCK e contra o vírus influenza A [cepa A/WSN/33(H1N1)], por terem sido os mais sensíveis (células e vírus) à ação desses compostos (**Capítulo 5**). Os resultados obtidos indicaram que **C10** e **C11** atuam nas etapas iniciais da replicação desse vírus, pois foi visível a redução da expressão de algumas das proteínas avaliadas (PB1, NP e NS1) 2 h após o tratamento, e também na transcrição do RNA viral. Essas ações são consequência da interferência na montagem do complexo da polimerase viral (Figura 4). Tal complexo é amplamente reconhecido como um alvo importante para a ação de novos compostos anti-influenza, dado seu papel crítico na replicação desses vírus e seu alto grau de

conservação entre os VIA (de origem humana ou zoonótica) e os VIB (LO; TANG; SHAW, 2018). Como resultado da ação dos compostos **C10** e **C11** na replicação dos VI, foi gerada uma polimerase viral com atividade deficiente, o que contribuiu para a inibição da replicação viral. Esse mecanismo pode ser considerado como sendo o majoritário para esses compostos, e até o momento, não foi relatado para nenhum outro cardenolídeo. Alguns estudos recentes relataram a inibição da atividade da polimerase viral por compostos sintéticos, tais como os derivados do 5-(5-fluor-1H-pirrol[2,3-*b*]piridina-3-il)pirazina-2(1H)-ona (YANG et al., 2019), R151785 (ZHANG et al., 2019) e JL-5001 (ZHAO et al., 2019), e tais inibidores estão sendo chamados de “agentes terapêuticos de geração futura”.

Figura 4 – Proposta do mecanismo da ação anti-influenza dos compostos **C10** e **C11**.



Como estudo complementar, os compostos **C10** e **C11** foram testados em um modelo *ex vivo* recém-padronizado no Instituto de Virologia Molecular da Universidade de Münster, que utiliza porções de tecidos saudáveis de pulmões humanos. Matos et al. (2019) relataram que esse modelo se mostrou adequado à replicação dos vírus influenza, uma vez que os pulmões humanos são o principal alvo desses vírus e, portanto, de extrema relevância para a investigação de novos fármacos anti-influenza. Os compostos **C10** e **C11** foram muito ativos nesse modelo, pois reduziram significativamente os títulos virais do VIA [cepa A/Panama/2007/1999 (H3N2)] abaixo do limite de detecção, quando testados na maior concentração (2 μ M). Tal abordagem ofereceu uma oportunidade única de analisar a replicação dos VI na complexidade dos tecidos pulmonares humanos, aproximando os resultados obtidos *in vitro* com um cenário real de infecção humana.

Amarelle e Lecuona (2018) descreveram que os estudos que avaliaram, de forma detalhada, o mecanismo da ação antiviral de vários cardenolídeos contra vírus DNA e RNA, relacionaram o comprometimento da replicação do genoma viral com a diminuição da transcrição de genes virais e a síntese prejudicada de proteínas virais, sugerindo que esses compostos agiriam em processos essenciais necessários para a replicação dos vírus. Tais achados corroboram os encontrados nesse trabalho.

Para finalizar, os compostos **C10** e **C11** não apresentaram atividades antioxidante, anti-inflamatória e anti-norovírus, e somente o **C10** apresentou atividade anti-Zika promissora (CI₅₀ de 0,17 μ M).

Os resultados apresentados encorajam a continuidade dos estudos com cardenolídeos como uma alternativa terapêutica para infecções virais e determinados tipos de câncer. Em especial, destacam-se os compostos **C10** e **C11**, que podem ser considerados novas moléculas bioativas com grande potencial a atingir etapas posteriores no processo de P&D de medicamentos para o tratamento dessas doenças.

REFERÊNCIAS

- AMARELLE, L.; LECUONA, E. The antiviral effects of Na,K-ATPase inhibition: a minireview. **Int J Mol Sci**, v.19, n.8; pii: E2154, 2018.
- BERTELLI, M.; KIANI, A. K.; PAOLACCI, S., et al. Hydroxytyrosol: A natural compound with promising pharmacological activities. **J Biotechnol**, v.309, p.29-33, 2019.
- BERTOL, J. W.; RIGOTTO, C.; PÁDUA, R. M., et al. Antiherpes activity of glucoevatromonoside, a cardenolide isolated from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata*. **Antiviral Res**, v.92, n.1, p.73-80, 2011.
- BESSEN, H. Therapeutic and toxic effects of digitalis: William Withering, 1785. **J Emerg Med**, v.4, n.3, p.243-248, 1986.
- BUTLER, M. S.; ROBERTSON, A. A.; COOPER, M. A. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. **Nat Prod Rep**, v.31, n.11, p.1612-1661, 2014.
- CARVALHO, A. Avaliação dos efeitos citotóxicos de cardenólídeos em células tumorais. 2012. 112 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia), Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2012.
- CERELLA, C.; MULLER, F.; GAIGNEAUX, A., et al. Early downregulation of Mcl-1 regulates apoptosis triggered by cardiac glycoside UNBS1450. **Cell Death Dis**, v.11, n.6, p.e1782, 2015.
- DERKSEN, A.; KÜHN, J.; HAFEZI, W., et al. Antiviral activity of hydroalcoholic extract from *Eupatorium perfoliatum* L. against the attachment of influenza A virus. **J Ethnopharmacol**, v.188, p.144-152, 2016.
- DIEDERICH, M.; MULLER, F.; CERELLA, C. Cardiac glycosides: from molecular targets to immunogenic cell death. **Biochem Pharmacol**, v.125, p.1-11, 2017.
- DODSON, A. W.; TAYLOR, T. J.; KNIPE, D. M., et al. Inhibitors of the sodium potassium ATPase that impair herpes simplex virus replication identified via a chemical screening approach. **Virology**, v.366, n.2, p.340-348, 2007.
- EHRHARDT, C.; DUDEK, S. E.; HOLZBERG, M., et al. A plant extract of *Ribes nigrum* folium possesses anti-influenza virus activity *in vitro* and *in vivo* by preventing virus entry to host cells. **PLoS One**, v.8, n.5, p.e63657, 2013.
- ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, v.35, n.4, p.495-516, 2007.
- FYTAS, C.; KOLOCOURIS, A.; FYTAS, G., et al. Influence of an additional amino group on the potency of aminoadamantanes against influenza virus A. II - Synthesis of spiropiperazines and *in vitro* activity against influenza A H3N2 virus. **Bioorg Chemistry**, v.38, n.6, p.247-251, 2010.
- GALLUZZI, L.; VITALE, I.; AARONSON, S. A., et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death Differ**, v.25, n.3, p.486-541, 2018.
- GRIENKE, U.; SCHMIDTKE, M.; KIRCHMAIR, J., et al. Antiviral potential and molecular insight into neuraminidase inhibiting diarylheptanoids from *Alpinia katsumadai*. **J Med Chem**, v.53, p.778-786, 2010.
- HAASBACH, E.; HARTMAYER, C.; HETTLER, A., et al. Antiviral activity of Lадania 067, an extract from wild black currant leaves against influenza A virus *in vitro* and *in vivo*. **Front Microbiol**, v.5, p.171, 2013.
- HARTLEY, C. E.; BUCHAN, A.; RANDALL, S.; et al. The effects of lithium and potassium on macromolecular synthesis in herpes simplex virus infected cells. **J Gen Virol**, v.74, p.1519-1525, 1993.
- HEJMADI, M. **Introduction to Cancer Biology**. New York: Momna Hejmadi & Ventus Publishing: ApS, 2010. p. 46.
- HOFFMANN, H. H.; PALESE, P.; SHAW, M. L. Modulation of influenza virus replication by alteration of sodium ion transport and protein kinase C activity. **Antiviral Res**, v.80, n.2, p.124-134, 2008.
- HUI, E. K.; NAYAK, D. P. Role of ATP in influenza virus budding. **Virology**, v.290, n.2, p.329-341, 2001.

- KIYOHARA, H.; ICHINO, C.; KAWAMURA, Y., et al. *In vitro* anti-influenza virus activity of a cardiotonic glycoside from *Adenium obesum* (Forssk.). **Phytomedicine**, v.19, n.2, p.111-114, 2012.
- LAURSEN, M.; YATIME, L.; NISSEN, P., et al. Crystal structure of the high-affinity Na⁺K⁺-ATPase-ouabain complex with Mg²⁺ bound in the cation binding site. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.110, n.27, p.10958-10963, 2013.
- LO, C. Y.; TANG, Y. S.; SHAW, P. C. Structure and function of influenza virus ribonucleoprotein. **Subcell Biochem**, v.88, p.95-128, 2018.
- MATOS, A. R., WUNDERLICH, K., SCHLOER, S., et al. Antiviral potential of human IFN- α subtypes against influenza A H3N2 infection in human lung explants reveals subtype-specific activities. **Emerg Microbes Infect**, v.8, n.1, p.1763-1776, 2019.
- MI, S.; LI, Y.; YAN, J., et al. Na⁺/K⁺-ATPase β 1 subunit interacts with M2 proteins of influenza A and B viruses and affects the virus replication. **Sci China Life Sci**, v.53, n.9, p.1098-1105, 2010.
- MIJATOVIC, T.; MATHIEU, V.; GAUSSIN, J. F., et al. Cardenolide-induced lysosomal membrane permeabilization demonstrates therapeutic benefits in experimental human non-small cell lung cancers. **Neoplasia**, v.8, n.5, p.402-412, 2006.
- MIJATOVIC, T.; ROLAND, I.; VAN QUAQUEBEKE, E., et al. The alpha1 subunit of the sodium pump could represent a novel target to combat non-small cell lung cancers. **J Pathol**, v.212, n.2, p.170-179, 2007.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J Nat Prod**, v.70, n.3, p.461-477, 2007.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **J Nat Prod**, v.79, n.3, p.629-661, 2016.
- NEWMAN, R. A.; YANG, P.; PAWLUS, A. D., et al. Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. **Mol Interv**, v.8, n.1, p.36-49, 2008.
- NOLTE, E.; SOBEL, A.; WACH, S., et al. The new semisynthetic cardenolide analog 3 β -[2-(1-amantadine)-1-on-ethylamine]-digitoxigenin (AMANTADIG) efficiently suppresses cell growth in human leukemia and urological tumor cell lines. **Anticancer Res**, v.35, n.10, p.5271-5275, 2015.
- NOLTE, E.; WACH, S.; SILVA, I. T., et al. A new semisynthetic cardenolide analog 3 β -[2-(1-amantadine)-1-on-ethylamine]-digitoxigenin (AMANTADIG) affects G2/M cell cycle arrest and miRNA expression profiles and enhances proapoptotic survivin-2B expression in renal cell carcinoma cell lines. **Oncotarget**, v.8, n.7, p.11676-11691, 2017.
- ORLIKOVA, B.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. 1,000 Ways to die: natural compounds modulate non-canonical cell death pathways in cancer cells. **Phytochem Rev**, v.13, n.1, p.277-293, 2013.
- PRASSAS, I.; DIAMANDIS, E. P. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. **Nat Rev Drug Discov**, v.7, n.11, p.926-935, 2008.
- SCHNEIDER, N. F. Z., CERELLA, C.; LEE, J. Y., et al. Cardiac glycoside Glucoevatromonoside induces cancer type-specific cell death. **Front Pharmacol**, v.9, n.70, p.1-17, 2018a.
- SCHNEIDER, N. F. Z.; PERSICH, L.; ROCHA, S. C., et al. Cytotoxic and cytostatic effects of digitoxigenin monodigitoxoside (DGX) in human lung cancer cells and its link to Na,K-ATPase. **Biomed Pharmacother**, v.97, p.684-696, 2018b.
- SCHNEIDER, N. F. Z.; SILVA, I. T.; PERSICH, L., et al. Cytotoxic effects of the cardenolide convallatoxin and its Na,K-ATPase regulation. **Mol Cell Biochem**, v.428, n.1-2, p.23-39, 2017a.
- SCHNEIDER, N. F. Z.; CERELLA, C.; SIMÕES, C. M. O., et al. Anticancer and Immunogenic Properties of Cardiac Glycosides. **Molecules**, v.22, n.11, p.E1932, 2017b.
- SCHNEIDER, N. F. Z.; GELLER, F. C.; PERSICH, L., et al. Inhibition of cell proliferation, invasion and migration by the cardenolides digitoxigenin monodigitoxoside and convallatoxin in human lung cancer cell line. **Nat Prod Res**, v.30, n.11, p.1327-1331, 2016.

SCHNEIDER, N. F. Z. Avaliação da ação citotóxica de cardenolídeos em células tumorais. 2015. 222 p. Tese (Doutorado em Farmácia), Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2015.

SHOJI, M.; WOO, S. Y.; MASUDA, A., et al. Anti-influenza virus activity of extracts from the stems of *Jatropha multifida* Linn. collected in Myanmar. **BMC Complement Altern Med**, v.17, n.1, p.96, 2017.

SILVA, I. T.; MUNKERT, J.; NOLTE, E., et al. Cytotoxicity of AMANTADIG - a semisynthetic digitoxigenin derivative - alone and in combination with docetaxel in human hormone-refractory prostate cancer cells and its effect on Na⁺/K⁺-ATPase inhibition. **Biomed Pharmacother**, v.107, p.464-474, 2018.

SLINGERLAND, M.; CERELLA, C.; GUCHELAAR, H. J., et al. Cardiac glycosides in cancer therapy: from preclinical investigations towards clinical trials. **Invest New Drugs**, v.31, n.4, p.1087-1094, 2013.

SU, C. T.; HSU, J. T.; HSIEH, H. P., et al. Anti-HSV activity of digitoxin and its possible mechanisms. **Antiviral Res**, v.79, n.1, p.62-70, 2008.

TATARIDIS, D.; FYTAS, G.; KOLOCOURIS, A., et al. Influence of an additional 2-amino substituent of the 1-aminoethyl pharmacophore group on the potency of rimantadine against influenza virus A. **Bioorg Med Chem Lett**, v.17, n.3, p.692-696, 2007.

VERSIANI, M. A.; AHMED, S. K.; IKRAM, A., et al. Chemical constituents and biological activities of *Adenium obesum* (Forsk.v) Roem et Schult. **Chem Biodivers**, v.11, n.2, p.171-180, 2014.

YANG, J.; DU, J.; HUANG, C., et al. Discovery of 5-(5-fluoro-1H-pyrrolo[2,3-b] pyridin-3-yl) pyrazin-2(1H)-one derivatives as new potent PB2 inhibitors. **Bioorg Med Chem Lett**, v.29, n.13, p.1609-1613, 2019.

ZHANG, J., HU, Y., WU, N., et al. Discovery of influenza polymerase PA-PB1 interaction inhibitors using an *in vitro* split-luciferase complementation-based assay. **ACS Chem Biol**, v.15, n.1, p.74-82, 2019.

ZHAO, X., WANG, Y., CUI, Q., et al. A parallel phenotypic versus target-based screening strategy for RNA-dependent RNA polymerase inhibitors of the influenza A virus. **Viruses**, v.11, n.9, pii: E826, 2019.

CONCLUSÕES

- Duas novas séries (i e ii) de cardenolídeos foram obtidas a partir da digitoxigenina, resultando no total de 16 novos derivados semissintéticos de cardenolídeos;
- Ambas as séries foram desenhadas com base em outros cardenolídeos (GEV e AMANTADIG), que possuem efeitos citotóxicos e antivirais constatados;
- Nas triagens citotóxica, anti-herpética e anti-influenza realizada com os 16 novos derivados, dois deles se destacaram (**C10** e **C11**) pelas suas potentes ações;
- **C10** e **C11** pertencem a segunda série (ii). Ambos os compostos apresentam grupamentos amina ligados ao C-3. O composto **C10** foi o mais ativo em todas as triagens, o que pode ser justificado pelo grupamento amina adicional;
- **C10** e **C11** apresentaram os maiores potenciais de inibição da Na^+/K^+ -ATPase. Tal potencial correlaciona-se adequadamente com as bioatividades desses compostos, já que os mesmos foram os mais ativos nas três triagens;
- Na triagem citotóxica, as duas linhagens humanas de células de câncer de pulmão (A549 e H460) foram as mais sensíveis aos compostos **C10** e **C11**, e em relação à seletividade, eles foram menos citotóxicos para as células não tumorais HGF quando comparados às células tumorais A549 e H460;
- **C10** foi selecionado para elucidação do mecanismo de morte celular envolvido nas células não pequenas de pulmão humano H460, que foi a linhagem celular tumoral mais sensível à ação desse composto;
- **C10** induziu um aumento significativo das células H460 na fase subG1 do ciclo celular, das células apoptóticas precoces e tardias por meio da externalização da fosfatidilserina, e dos núcleos pequenos e irregulares, característico de apoptose. Tal morte celular foi confirmada pelo ensaio das caspases-3/7. O composto **C10** também reduziu o potencial proliferativo a longo prazo e induziu uma diminuição significativa tanto da área quanto da viabilidade do modelo tridimensional de tumor (esferoides) das células H460;

- **C10** e **C11** foram selecionados para a elucidação dos seus mecanismos de ação anti-herpética em células Vero infectadas com os vírus HSV-1 (cepas KOS e 29-R) e HSV-2 (cepa 333);
- **C10** e **C11** não apresentaram efeitos profiláticos em relação aos HSV-1 e HSV-2, não inativaram diretamente esses vírus, e não interferiram nas etapas iniciais da replicação (adsorção, pós-adsorção e penetração viral). Esses compostos interferiram, principalmente, nas etapas intermediárias e finais da replicação do HSV, ou seja, na replicação do DNA viral [HSV-1 (cepa KOS)], montagem e liberação das novas partículas virais, e propagação intercelular viral [HSV-1 (cepas KOS e 29-R) e HSV-2 (cepa 333)];
- **C10** e **C11** foram selecionados para a elucidação dos seus mecanismos de ação anti-influenza em células MDCK, que foi a linhagem celular mais sensível à ação desses compostos, contra o vírus influenza A [cepa A/WSN/33(H1N1)];
- **C10** e **C11** reduziram a expressão das proteínas virais (PB1, NP e NS1) nos estágios iniciais do ciclo de replicação do VIA [cepa A/WSN/33(H1N1)], a transcrição do RNA e consequentemente, a síntese de novas proteínas virais. Tal ação foi devida à interferência na montagem do complexo da polimerase viral, resultando em uma atividade deficiente dessa enzima. Ambos, mas especialmente o **C10**, reduziram a replicação dos vírus influenza do tipo A [cepa A/Panama/2007/1999 (H3N2)] em um modelo *ex vivo* de pulmão humano isento de células tumorais, confirmando os resultados obtidos *in vitro*;
- Os compostos **C10** e **C11** não apresentaram atividades antioxidante nem anti-inflamatória;
- Somente o composto **C9** inibiu a replicação do norovírus murino tipo 1 (cepa NVM-1) acima de 30%;
- Somente o composto **C10** apresentou resultados promissores contra o vírus Zika com um valor de CI_{50} de 0,17 μ M.