

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmácia

JADEL MÜLLER KRATZ

**ESTUDO DO MECANISMO DA AÇÃO ANTI-HERPÉTICA DO
ÁCIDO GÁLICO E DO GALATO DE PENTILA**

FLORIANÓPOLIS

2007

JADEL MÜLLER KRATZ

**ESTUDO DO MECANISMO DA AÇÃO ANTI-HERPÉTICA DO
ÁCIDO GÁLICO E DO GALATO DE PENTILA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmácia.
Área de concentração: Farmaco-Medicamentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cláudia Maria Oliveira Simões
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Célia Regina Monte Barardi

FLORIANÓPOLIS

2007

Kratz, Jadel Müller

Estudo do mecanismo da ação anti-herpética do ácido gálico e do galato de pentila / Jadel Müller Kratz. Florianópolis, 2007. 79 p.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, 2007.

1. atividade antiviral; 2. Herpes Simplex Vírus tipo 1; 3. mecanismo de ação; 4. galatos; 5. ácido gálico; 6. galato de pentila

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Aplicada, coordenado pelas Professoras Dr^a. Cláudia Maria Oliveira Simões (Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS) e Dr^a. Célia Regina Monte Barardi (Departamento de Microbiologia e Parasitologia, CCB), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.

Este trabalho recebeu apoio financeiro do CNPq / MCT, Edital Universal 2005-2007 (projeto número 472748/2004-1), e da CAPES / MEC através da concessão da bolsa de Mestrado.

Aos meus pais Delso e Jacinta e ao meu irmão Mahil,
pelo apoio e amor incondicionais, e à minha orientadora,
pelo imenso aprendizado.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmão pelo amor, compreensão e pelas palavras de incentivo.

À Professora Cláudia Maria Oliveira Simões pela notável orientação, pelo aprendizado, pela amizade e pelo incentivo na busca da excelência.

À Professora Célia Regina Monte Barardi pela orientação, atenção e amizade.

Aos amigos Cícero e Rodrigo pela amizade e companheirismo únicos.

Aos amigos do Laboratório de Virologia Aplicada pelo coleguismo e amizade.

Aos Professores Ricardo Nunes e Rosendo Yunes e a Paulo César Leal, por terem gentilmente cedido os compostos.

À CAPES pela concessão da bolsa e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos professores, colegas, amigos e alguém especial que, de alguma forma, estiveram ao meu lado e contribuíram para a realização desta dissertação.

Jadel Müller Kratz

RESUMO

O ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico - AG) é um composto fenólico presente em muitas plantas. Seus n-alkil ésteres, também conhecidos como galatos, em especial o galato de propila, octila e dodecila, são amplamente utilizados como antioxidantes pelas indústrias de alimentos, cosméticos e medicamentos. Os efeitos inibitórios do ácido gálico e de quinze galatos sobre a replicação do Herpes Simplex Vírus tipo 1 (HSV-1) foram investigados. Inicialmente, a citotoxicidade e a atividade anti-HSV-1 em células Vero foram avaliadas através do ensaio colorimétrico com o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-difeniltetrazolium (MTT). Após a seleção dos compostos com atividade superior aos demais, sua atividade antiviral foi confirmada através do ensaio de redução de placas de lise. Em seguida, após nova seleção, agora de 2 compostos com atividade superior, o mecanismo da ação anti-herpética destes compostos foi estudado através de uma série de ensaios que visaram avaliar a possível interferência dos compostos sobre as diversas etapas da replicação viral. Dentre as avaliações realizadas estão: a atividade virucida, a influência sobre a adsorção e penetração dos vírus nas células, a avaliação do possível sinergismo dos compostos entre si e com o aciclovir, a avaliação da interferência sobre a síntese de proteínas virais através do ensaio de Western blotting, a avaliação da interferência sobre a expressão gênica viral através do ensaio de RT-PCR e a avaliação da interferência sobre a síntese do DNA viral através do ensaio de PCR. Após uma triagem preliminar, o AG e o galato de pentila (GP) mostraram-se mais ativos e tiveram o seu mecanismo de ação estudado através de uma série de ensaios, que visaram determinar em qual(is) etapa(s) da replicação viral eles atuam. O mecanismo de sua atividade antiviral parece ser mediado, ao menos em parte, pela redução da infectividade viral (apenas GP), inibição da adsorção e penetração viral nas células, diminuição dos níveis da proteína do capsídeo viral ICP5, da proteína α ICP27 e das proteínas do envelope gB, gC, gD e gE, e interferência na síntese da proteína gD através do bloqueio da síntese de seu mRNA (apenas GP). Embora os tratamentos concomitantes com AG/GP, AG/aciclovir e GP/aciclovir não tenham resultado em interação alguma, a interferência destes dois compostos (AG e GP) em várias etapas da replicação do HSV-1 sugere a importância de estudos adicionais.

Unitermos: atividade antiviral; Herpes Simplex Vírus tipo 1 (HSV-1); mecanismo de ação; galatos; ácido gálico; galato de pentila.

ABSTRACT

In Vitro Antiherpetic Activity and Mode of Action of Gallic Acid and Pentyl Gallate.

Gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid - GA) is a phenolic compound present in a great variety of plants. Its synthetic n-alkyl esters, also known as gallates, especially propyl, octyl and dodecyl gallates, are vastly employed as antioxidants in food, cosmetic and pharmaceutical industries. The inhibitory effects of GA and fifteen gallates on herpes simplex virus type 1 (HSV-1) replication were investigated. Initially, the cytotoxicity and the anti-HSV-1 activity in Vero cells were evaluated by the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)] assay. After the selection of the compounds with the most prominent activities, their antiviral activity was confirmed by a plaque reduction assay. Then, after a selection of two compounds with the higher activities, their mechanism of action was studied through a series of assays in order to identify in which point of the replication process the compounds were active. Several evaluations were performed: the virucidal activity, the influence on the attachment and entry of virus into cells, the possible synergism of compounds with acyclovir, the interference with viral proteins synthesis through a Western blotting assay, the interference with viral gene expression through a RT-PCR assay, and the interference with the viral DNA synthesis through a PCR assay. After a preliminary screening, GA and pentyl gallate (PG) seemed to be the most active compounds and had their mechanism of action studied through a set of assays, as an attempt to identify in which point of the viral replication cycle the impairment occurred. Their mechanism of antiviral activity seem to be mediated, at least in part, by reduced viral infectivity (only PG), inhibition of virus attachment and entry to cells, impaired levels of viral capsid protein ICP5, α protein ICP27 and envelope proteins gB, gC, gD and gE and interference with gD protein synthesis due to blockage of gD mRNA synthesis (only PG). Although the combination of GA and PG with acyclovir resulted in no interaction, the detected multiple modes of action of both compounds suggest that further studies are merited.

Keywords: antiviral activity; Herpes simplex virus type 1 (HSV-1); mechanism of action; gallates; gallic acid; pentyl gallate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama representando a transcrição, tradução e replicação do DNA dos vírus herpéticos.	17
Figura 2 – Herpesvírus – microscopia eletrônica de transmissão.	19
Figura 3 – Estrutura básica dos galatos. No ácido gálico, o radical R = H e nos galatos, R = cadeia alquílica com número variável de carbonos.	23
Artigo – Figure 1 – Chemical structures of gallic acid and its n-alkyl esters (gallates).	55
Artigo – Figure 2 – Effects of 125 μ M of gallic acid (GA), methyl gallate (MG), ethyl gallate (EG), propyl gallate (PrG), butyl gallate (BG), pentyl gallate (PG) and acyclovir (ACV) on HSV-1 replication in Vero cells determined by plaque reduction assay.	56
Artigo – Figure 3 – Kinetics of inhibition of HSV-1 replication by gallic acid (GA) and pentyl gallate (PG).	57
Artigo – Figure 4 – Effect of gallic acid (GA) and pentyl gallate (PG) on HSV-1 attachment to GMK AH1 cells.	58
Artigo – Figure 5 – Effect of gallic acid (GA) and pentyl gallate (PG) on HSV-1 entry into GMK AH1 cells.	59
Artigo – Figure 6 – Effects of 125 μ M of gallic acid (GA) and pentyl gallate (PG) on HSV-1 protein synthesis in Vero cells detected by Western blot analysis.	60
Artigo – Figure 7 – Effects of 125 μ M of gallic acid (GA) and pentyl gallate (PG) on HSV-1 DNA synthesis in Vero cells detected by PCR.	61
Artigo – Figure 8 – Effects of 125 μ M of gallic acid (GA) and pentyl gallate (PG) on HSV-1 gene expression in Vero cells detected by RT-PCR.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Vírus herpéticos humanos.	14
Artigo – Table 1 – Anti-HSV-1 effect, cytotoxicity and selectivity indices of gallates on Vero cells determined by MTT assay.	64
Artigo – Table 2 – Effects of gallic acid and pentyl gallate on HSV-1 protein synthesis in GMK AH1 cells determined by ELISA.	65

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	HERPES SIMPLEX VÍRUS TIPO 1	13
2.2	ÁCIDO GÁLICO E SEUS N-ALQUIL ÉSTERES	23
3	OBJETIVOS	26
3.1	OBJETIVO GERAL	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4	ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO	27
	ABSTRACT	28
	INTRODUCTION	29
	MATERIALS AND METHODS	31
	RESULTS	39
	DISCUSSION	44
	ACKNOWLEDGMENTS	47
	REFERENCES	48
5	DISCUSSÃO	66
6	CONCLUSÕES	70
	REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

A pesquisa de novos fármacos passou por avanços significativos nos últimos anos, principalmente depois da introdução de modelos biológicos realizados *in vitro* e em grande escala, os quais podem avaliar várias amostras, em um curto período de tempo, permitindo a realização de várias repetições dos experimentos e propiciando uma análise estatística consistente dos resultados. Os avanços tecnológicos que contribuíram para a busca de novos compostos referem-se à descoberta de novos alvos moleculares, impulsionados pelas novas ferramentas de biologia molecular, e a evolução de novas técnicas de síntese orgânica, resultando em substâncias ativas mais eficazes e/ou menos tóxicas, que podem ser utilizadas como protótipos de fármacos com atividades farmacológicas semelhantes às originais (HOUGHTON, 1996; ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1996; HOUGHTON, 2000; NIELSEN, 2002; NEWMAN; CRAGG, 2003, 2004).

Em contraste com a enorme quantidade de fármacos antibacterianos e antifúngicos disponíveis, o atual arsenal terapêutico antiviral compreende em torno de 40 fármacos, sendo a maioria destes utilizados no tratamento de infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (DE CLERCQ, 2004, 2005).

Uma das principais razões para a falta de sucesso no desenvolvimento de fármacos antivirais é a natureza dos vírus, os quais possuem uma estrutura extremamente simples e um sistema enzimático bastante restrito, sendo totalmente dependentes dos processos metabólicos celulares para sua multiplicação e sobrevivência. Assim, agentes que inibem a replicação viral e/ou causam a morte do vírus, exibem também certo grau de toxicidade às células hospedeiras. O compromisso com a especificidade pelas células infectadas, a eficácia e um baixo nível de toxicidade são indispensáveis e, destes problemas, advém a escassez de medicamentos antivirais (WHITE; FENNER, 1994).

Dentre os inúmeros vírus de importância clínica, destaca-se a família Herpesviridae, na qual se incluem os Herpes Simplex Vírus tipos 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2), que infectam um grande número de pessoas no mundo todo. Os sintomas da doença não são sempre aparentes, mesmo durante a infecção primária, e podem variar desde lesões cutâneas e de mucosas até encefalites ou doenças sistêmicas envolvendo múltiplos órgãos. A transmissão da infecção de pessoa a pessoa ocorre, geralmente, pelo contato íntimo e o compartilhamento de fluídos contendo os vírus.

O HSV-2 causa, principalmente, o herpes genital, que é uma das doenças sexualmente transmissíveis de maior prevalência no mundo, e que está relacionada com um aumento na transmissão efetiva do HIV. O HSV-1, apesar de também poder causar infecções genitais, provoca mais comumente o herpes labial (SCHACKER, 2001; ROIZMAN; KNIPE, 2001; CELUM, 2004; SPEAR et al., 2006).

O composto de escolha para profilaxia e tratamento das infecções causadas pelos HSV é o aciclovir, que inibe seletivamente a replicação do DNA viral, com baixa toxicidade às células hospedeiras. Contudo, a resistência dos vírus herpéticos a este fármaco, a disseminação das cepas resistentes em pacientes, principalmente os imunocomprometidos, e a decorrente progressão da doença fizeram com que as infecções herpéticas se tornassem um grave problema de saúde pública (CASSADY; WHITLEY, 1997; FIELD, 2001; BRADY; BERNSTEIN, 2004), fatos que estimulam pesquisas para que novas terapias anti-herpéticas sejam encontradas (NIELSEN, 2002).

Diante deste quadro, o Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC vem, há vários anos, avaliando a citotoxicidade e a potencial atividade antiviral de produtos naturais e também de compostos sintéticos. Neste âmbito, recentemente, foi avaliada a atividade anti-HSV-1 de um grupo de substâncias sintéticas, os ésteres alquílicos do ácido gálico, também conhecidos como **galatos**, que foram preparados com base na estrutura de um composto de origem natural, o ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico). Neste trabalho foi estabelecida uma série de relações estrutura-atividade para estas moléculas, não somente no que diz respeito à ação anti-herpética, mas também à sua ação antioxidante e sua genotoxicidade (SAVI et al., 2005).

Embora relações estrutura-atividade já tenham sido propostas, o mecanismo pelo qual os galatos exercem sua atividade anti-herpética *in vitro* ainda não havia sido estudado. Levando em conta este fato, o presente trabalho teve como objetivo analisar em qual(is) etapa(s) da multiplicação viral os compostos em questão atuam, avaliando sua possível interferência na adsorção, na penetração, na síntese do DNA viral, na transcrição gênica e/ou na expressão de proteínas virais, além de sua atividade virucida e os efeitos da sua provável associação com o aciclovir, que é o fármaco de escolha para o tratamento de infecções por HSV-1.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Herpes Simplex Vírus tipo 1

Vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, que necessitam da atividade metabólica e das organelas da célula hospedeira para produção de energia e síntese de macromoléculas, ou seja, para sua multiplicação. Eles contêm apenas um tipo de material genético (RNA ou DNA) e seu material de reserva constitui-se apenas de proteínas ou glicogênio. Essas entidades infecciosas consistem de um genoma DNA ou RNA, acondicionado num capsídeo protéico, que pode ou não ser circundado por uma membrana de revestimento, o envelope. O material nucléico recoberto por proteína é denominado nucleocapsídeo. O termo vírion serve para designar partículas virais completas, potencialmente infecciosas, formadas na última fase da replicação viral. O capsídeo é composto por um número definido de unidades morfológicas, os capsômeros. A montagem dos vírus é definida pela natureza das ligações formadas entre os capsômeros individuais, o que confere a simetria do capsídeo, podendo esta ser helicoidal, icosaédrica ou mista (VOYLES, 1993).

Os vírus são capazes de reconhecer e de penetrar em células-alvo apropriadas, principalmente, pela especificidade dos receptores existentes na superfície dessas células hospedeiras e dos próprios vírus. O conjunto de eventos que vão desde a penetração do genoma viral na célula até a liberação dos vírions, é chamado de ciclo de multiplicação viral. A forma pela qual o vírus realiza as etapas do seu ciclo de multiplicação é determinada pela estrutura do genoma [se DNA ou RNA; se RNA positivo (+) ou negativo (-); segmentado ou não] e da estrutura do próprio vírion a ser replicado. As principais etapas de multiplicação de um vírus qualquer podem ser resumidas numa fase inicial, com adsorção do vírus à célula hospedeira, penetração e desnudamento (decapsidação) da partícula, e uma fase tardia, que vai desde a síntese macromolecular até a automontagem e liberação dos vírions (WHITE; FENNER, 1994).

Os vírus herpéticos são altamente disseminados na natureza. Aproximadamente 100 vírus da família Herpesviridae foram caracterizados, sendo que existem oito vírus herpéticos humanos (Tabela 1). Além disso, o vírus herpético

B de macacos pode também infectar o homem causando encefalite mortal (ROIZMAN; KNIPE, 2001; DA SILVA, 2000).

Tabela 1: Vírus herpéticos humanos.

Gênero	Nome oficial	Nome Comum	Sigla	
Alphaherpesvirinae Herpes simplex 1	Herpesvírus humano-1	Vírus herpes simples tipo 1	HSV-1	
	Herpes simplex 2	Herpesvírus humano-2	Vírus herpes simples tipo 2	HSV-2
	Varicella zoster	Herpesvírus humano-3	Vírus da varicela zoster	VZV
Betaherpesvirinae Citomegalovírus	Herpesvírus humano-5	Citomegalovírus	CMV	
	Roseolovirus	Herpesvírus humano-6	Vírus herpes humano tipo 6	HHV-6
		Herpesvírus humano-7	Vírus herpes humano tipo 7	HHV-7
Gama herpesvirinae Epstein-Barr	Herpesvírus humano-4	Vírus Epstein-Barr	EBV	
	Herpesvírus humano-8	Vírus herpes humano tipo 8	HHV-8	

Fonte: adaptado de DA SILVA (2000).

O HSV-1 pertence à subfamília Alphaherpesvirinae, apresentando propriedades biológicas de crescimento rápido, lise das células infectadas e estabelecimento de infecções latentes em gânglios nervosos sensoriais. O fato de o próprio vírus herpético codificar as principais enzimas necessárias à replicação do DNA viral, mantendo um grau de virulência suficiente para não ser subjulgado pelos mecanismos de defesa do hospedeiro, faz com que sua sobrevivência em células neurais constitua um fato bastante provável de ocorrer (WHITE; FENNER, 1994; LUPI; PEREIRA JR., 2000).

Ao contrário da maioria das outras famílias de vírus, os vírus herpéticos podem causar infecções líticas, latentes e transformadas. A infecção latente com subsequente doença recorrente é uma de suas características. Durante o período da latência herpética, os vírus são inacessíveis ao sistema imune e aos medicamentos atualmente disponíveis (ROIZMAN; KNIPE, 2001).

O HSV-1 é composto de quatro componentes distintos. No interior do vírion está o cerne contendo DNA linear de fita dupla, com aproximadamente 152 kbp. O genoma é dividido em dois segmentos ligados covalentemente, denominados longo

(L) e curto (S), ambos contendo seqüências únicas (U_L e U_S , respectivamente), que são flanqueadas por regiões de seqüências repetitivas invertidas. O rearranjo destes dois componentes dá origem a quatro populações de moléculas de DNA, diferindo entre si apenas na orientação das seqüências do DNA. Seu genoma é um dos maiores genomas virais dos vírus herpéticos humanos, codificando cerca de 70 a 200 proteínas (WHITE; FENNER, 1994; BOEHMER; LEHMAN, 1997; SUBAK-SHARPE; DARGAN, 1998; WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

Os demais componentes do vírion envolvem o *core*. Um capsídeo icosaédrico de 100nm de diâmetro composto de 162 capsômeros (150 hexâmeros e 12 pentâmeros); uma camada de proteínas amorfa, chamada de tegumento; e um envelope lipoprotéico de 120-200nm revestido por até 11 tipos de glicoproteínas virais e diversas proteínas não glicosiladas, lipídios e poliaminas (WHITE; FENNER, 1994; WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

Na infecção primária pelos vírus herpéticos ou primo-infecção, o vírus penetra no corpo por invasão das mucosas ou soluções de descontinuidade da pele. Muitos indivíduos são infectados já em idade precoce. O vírus sofre, então, replicação nas células situadas na base do sítio de entrada, podendo ou não produzir lesões vesiculares (ROIZMAN; KNIPE, 2001; WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

O ciclo de multiplicação dos vírus herpéticos consiste em uma seqüência complexa de eventos. Resumidamente, para iniciar sua infecção, o HSV-1 precisa se ligar a receptores celulares, fundir seu envelope com a membrana plasmática, e permitir que o capsídeo seja transportado até os poros da membrana do núcleo da célula, onde o genoma viral será liberado. Os eventos chave que ocorrem no núcleo incluem a transcrição, síntese de DNA e proteínas, montagem do capsídeo, empacotamento do DNA e envelopamento, culminando com a liberação de um novo vírion potencialmente infeccioso (WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

O contato inicial do HSV com a célula consiste no processo de adsorção. A ligação do vírion com cadeias de glicosaminoglicanas (GAG) de proteoglicanas da superfície celular inicia esta etapa. O sulfato de heparana, um dos diversos tipos de GAG, é preferencial e é considerado o principal receptor de ligação do HSV-1. Duas glicoproteínas (das onze descritas até o momento) presentes no envelope viral, denominadas gB e gC, são capazes de se ligar ao sulfato de heparana e mediar a adsorção viral, além de induzir a resposta imune (SHUKLA; SPEAR, 2001; SPEAR, 2004).

Embora a adsorção aumente significativamente a eficiência da infecção herpética, ela não é absolutamente essencial, ao menos em infecções de células em cultura, uma vez que as partículas virais podem penetrar na célula-alvo por endocitose. A ausência de gC reduz a eficiência da infecção em até 10 vezes, ao passo que, a ausência das duas glicoproteínas envolvidas neste processo impede a infecção, sendo este fato creditado ao papel que a gB desempenha no processo de entrada do vírus, descrito a seguir (SHUKLA; SPEAR, 2001; SPEAR, 2004; SPEAR et al., 2006).

A principal via de penetração do HSV é por fusão na membrana da superfície celular, mas também pode ocorrer por endocitose. Neste último caso, o capsídeo é digerido por enzimas lisossomais celulares, enquanto que, no primeiro caso, a fusão do envelope viral com a membrana celular permitirá que o material genético seja liberado (WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

Para que ocorra a penetração por fusão, após a adsorção da partícula viral à superfície celular, é necessário que a glicoproteína gD interaja com um dos seus diversos receptores de entrada. Estes receptores estão divididos em três classes: um membro da família dos receptores do fator de necrose tumoral, o HVEM (mediador de entrada de herpesvírus); as nectinas 1 e 2, membros da superfamília das imunoglobulinas; e sítios específicos no sulfato de heparana, gerados por certas 3-O-sulfotransferases (SHUKLA; SPEAR, 2001; SPEAR, 2004; SPEAR et al., 2006).

A ligação de gD com um dos receptores resulta na fusão do envelope viral com a membrana da célula, possibilitando a entrada do nucleocapsídeo e do tegumento no citoplasma celular. Neste processo estão envolvidas, além da gD e seus receptores, também a glicoproteína gB e o heterodímero gH-gL (SHUKLA; SPEAR, 2001; SPEAR, 2004).

Após a penetração, o nucleocapsídeo é transportado até a membrana nuclear e, através de poros, o DNA viral penetra no núcleo, acompanhado pelas proteínas do tegumento α -TIF ou VP16 e *vhs*, que, como muitas outras, além de serem proteínas estruturais, desempenham importantes papéis no processo de replicação viral. O α -TIF possui a função de promover a transcrição viral imediata, através da formação de um complexo multiprotéico com os fatores celulares de transcrição Oct1 e HCF, que se liga a uma região específica do genoma viral. Já a proteína *vhs* parece permanecer no citoplasma, onde desempenha a função de degradar RNA celular e viral, sendo que o último possui vantagem, uma vez que sua produção está

altamente induzida (WHITE; FENNER, 1994; MCKNIGHT; KRISTIE; ROIZMAN, 1987; WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

A síntese dos produtos gênicos virais, tanto RNA quanto proteínas, é realizada em três fases seqüenciais (Figura 1): imediata (α), precoce (β), e tardia (γ), sendo a última ainda subdividida em tardia falsa (γ_1) e tardia verdadeira (γ_2) (MCKNIGHT; KRISTIE; ROIZMAN, 1987; BOEHMER; LEHMAN, 1997; WHITLEY; ROIZMAN, 2001; ROIZMAN; GU; MANDEL, 2005).

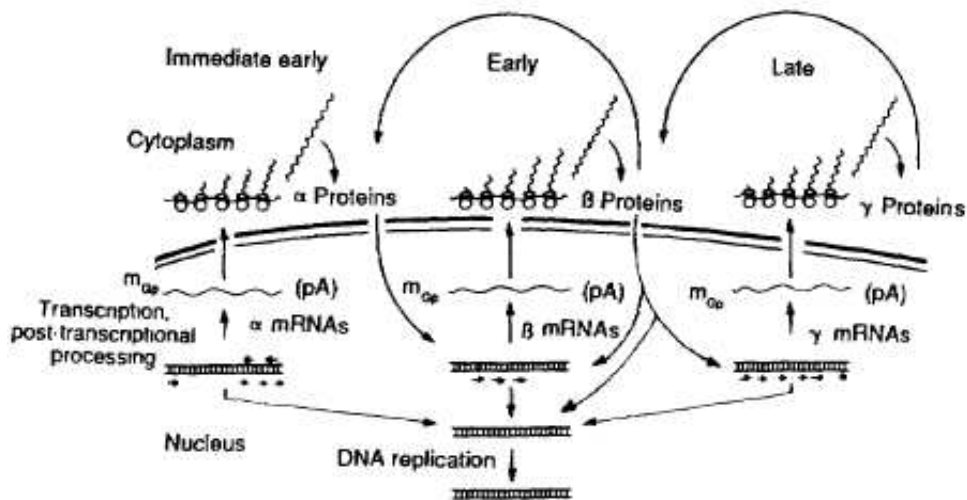


Figura 1. Diagrama representando a transcrição, tradução e replicação do DNA dos vírus herpéticos. Fonte: WHITE; FENNER (1994).

Na fase imediata, cinco genes são expressos, regulados por α -TIF, gerando os produtos de tradução: ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 e ICP47, que funcionam como trans-ativadores da fase seguinte, regulando a expressão gênica viral em nível transcricional. O pico de síntese destas proteínas α ocorre entre 2-4 horas pós-infecção, e estas são necessárias para a produção de todas as proteínas virais codificadas (BOEHMER; LEHMAN, 1997; WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

A proteína de célula infectada 4 (ICP4) liga-se diretamente ao DNA tanto em sítios de alta quanto de baixa afinidade, atuando como repressor ou promotor, respectivamente, da transcrição de genes virais. Na ausência desta proteína todos os processos transcricionais pós- α não ocorrem (ROIZMAN; GU; MANDEL, 2005).

Outra α -proteína, ICP0, atua como ativador não específico de diversos genes. As funções relativas a esta proteína têm, pelo menos, dois papéis importantes: estabilizar importantes proteínas reguladoras do ciclo celular, obrigando a célula a

entrar em fase S (entretanto sem permitir divisão celular), e manter um vigoroso processo de síntese protéica (WHITLEY; ROIZMAN, 2001; ROIZMAN; GU; MANDEL, 2005).

A ICP27, por sua vez, também possui diversos papéis. O mais destacado é o controle do processamento pós-transcricional do RNA. Diferentemente dos genes celulares, a grande maioria dos genes virais não possui íntrons. Esta proteína bloqueia o processamento do mRNA, o que acarreta numa diminuição da produção de proteínas celulares. Adicionalmente, a ICP27 atua como transportadora de RNAs tardios do núcleo para o citoplasma e, conseqüentemente, regula a expressão de proteínas da fase tardia ou γ (WHITLEY; ROIZMAN, 2001; LARRALDE et al., 2006; ROIZMAN; GU; MANDEL, 2005; SMITH; MALIK; CLEMENTS, 2005).

Após a ativação da maquinaria transcricional da célula pelos produtos dos genes α , inicia-se a síntese de proteínas da fase precoce ou β , que atinge seu pico entre 5-7 horas pós-infecção. Nesta classe estão incluídas enzimas necessárias para a replicação do genoma viral, como a DNA polimerase viral, a proteína de ligação de DNA fita simples ou polipeptídeo de célula infectada 8 (ICP8), DNA helicase-primase e as demais enzimas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos. A replicação do DNA viral inicia-se imediatamente após o acúmulo das primeiras proteínas β , e pode estender-se até 15 horas pós-infecção (BOEHMER; LEHMAN, 1997; WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

O programa temporal de expressão gênica alcança sua última fase com o aparecimento de transcritos da fase tardia ou γ . Com o início da replicação, e conseqüente acúmulo de DNA viral, ocorre a sinalização para que os genes tardios sejam transcritos, gerando mais de 30 produtos de transcrição tardios, que codificam proteínas estruturais do capsídeo e tegumento, e outras proteínas que formarão o vírion, como as glicoproteínas presentes no envelope viral (BOEHMER; LEHMAN, 1997; WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

As proteínas estruturais do capsídeo são transportadas para o núcleo, onde são reunidas em pró-capsídeos vazios, que posteriormente são preenchidos com DNA viral associado a poliaminas de caráter básico. Os nucleocapsídeos ligam-se em porções modificadas da membrana nuclear interna, que contém glicoproteínas virais, são temporariamente envelopados e liberados no espaço nuclear intermembranário (Figura 2).

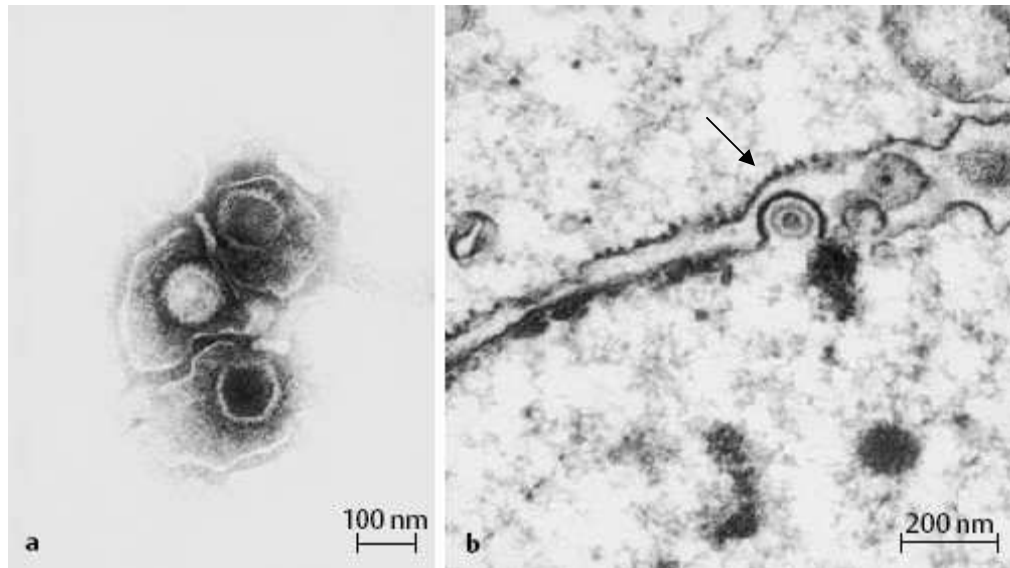


Figura 2. Herpesvírus – microscopia eletrônica de transmissão. (a) Três partículas virais não envelopadas; (b) No núcleo da célula hospedeira / formação do envelope na membrana nuclear. Fonte: BIENZ (2005).

Posteriormente, os vírions passam para o citoplasma ainda sem o envelope. No citoplasma são adicionadas as proteínas do tegumento e ocorre a maturação final, onde o capsídeo e o tegumento fundem-se com vesículas exocíticas, cujas membranas contêm todas as glicoproteínas virais, formando o envelope. Os vírions infectivos, agora prontos, podem permanecer na célula associados a estas vesículas ou serem liberados da célula. Este processo, iniciando na adsorção e culminando na liberação de uma partícula viral infectiva, leva em torno de 18h (WHITE; FENNER, 1994; WHITLEY; ROIZMAN, 2001; METTENLEITER, 2002).

Após a infecção primária, o vírus pode disseminar-se para células nervosas adjacentes. Nos neurônios, o nucleocapsídeo é encaminhado para o núcleo, iniciando a infecção latente. Nesta fase, o genoma viral está reprimido e parcialmente integrado ao DNA da célula, sendo que apenas algumas regiões bem específicas do genoma viral são transcritas, as chamadas regiões LAT. O vírus pode, então, ser ativado por vários estímulos, como estresse, febre, trauma, mudanças hormonais, radiação ultravioleta, etc, e depois passar retrogradamente pelo nervo, causando lesões características em sítios específicos da pele e mucosas (CLEMENTS; TIMBURY; GRIFFITHS, 1990; LUPI; PEREIRA JR., 2000).

As manifestações clínicas primárias e recorrentes podem variar desde gengivomastites, faringotonsilites e herpes labial até querato-conjuntivites,

encefalites e doença disseminada. Após a recuperação da infecção primária, o indivíduo retém o DNA herpético no gânglio trigêmeo por toda a vida, com no mínimo 50% de chances de sofrer ataques recorrentes de herpes labial, várias vezes no decorrer da sua existência. Em pacientes imunocomprometidos (submetidos a transplantes, terapia antineoplásica e indivíduos com AIDS), as infecções latentes são freqüentemente reativadas (WHITE; FENNER, 1994; WHITLEY; ROIZMAN, 2001). Adicionalmente, este vírus tem sido apontado como um importante fator na disseminação do HIV, através do recrutamento de células do sistema imune para as mucosas afetadas, acarretando numa maior disponibilidade das células-alvo do vírus HIV (SCHACKER, 2001; CELLUM, 2004).

Conforme dito anteriormente, o HSV-1 está associado a infecções orais, enquanto que o HSV-2 a infecções genitais. Contudo, ambos os vírus podem causar infecções clinicamente indistinguíveis em vários locais e podem permanecer latentes no gânglio sensorial, o qual pode ser reativado em infecções recorrentes sintomáticas ou assintomáticas (BRADY; BERNSTEIN, 2004).

Normalmente, o isolamento do HSV é feito em cultura de tecidos, onde 2-7 dias são necessários para a visualização dos efeitos citopáticos característicos. O diagnóstico mais rápido para lesões mucocutâneas é a imunofluorescência direta de fragmentos corados de pele. O uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar o DNA do HSV em fluido cérebro-espinhal é mais rápido e mais sensível do que a cultura viral, e o diagnóstico pode detectar encefalite herpética, além de confirmar infecções em outros locais do corpo. Testes sorológicos específicos podem ser usados para diferenciar infecções por HSV-1 e/ou HSV-2, ou confirmar casos suspeitos (BRADY; BERNSTEIN, 2004).

As infecções herpéticas estão descritas na literatura médica há séculos, porém, a terapia anti-herpética começou a ser desenvolvida somente na década de 60. Atualmente, as infecções causadas pelo HSV estão entre as mais comuns na população e, é estimado que 60-95% das pessoas adultas estejam infectadas. Para a seleção do tratamento, alguns fatores importantes devem ser considerados, tais como a imunidade do paciente, o local da infecção e, se a infecção é primária ou recorrente. Os agentes anti-herpéticos (anti-HSV-1 e anti-HSV-2) atualmente disponíveis na clínica são:

Aciclovir e Valaciclovir: possuem ação seletiva contra os vírus herpéticos, pois esses induzem a atividade de uma timidina quinase (TQ) nas células que infectam. Essa enzima catalisa a fosforilação do aciclovir em monofosfato e as enzimas celulares completam a fosforilação em trifosfato. A atividade destes fármacos contra os vírus herpéticos está diretamente relacionada à sua capacidade indutora de TQ. Os vírus HSV-1 e 2 são os indutores de TQ mais ativos e são facilmente inibidos pelo aciclovir. Para tornar-se ativo, ele precisa ser fosforilado, o que ocorre somente em células infectadas por vírus herpéticos. O trifosfato de aciclovir inibe a replicação viral através da competição com o trifosfato de guanosina pela DNA polimerase viral. Essa enzima incorpora o trifosfato de aciclovir à cadeia do DNA em formação, uma vez que o aciclovir não possui a hidroxila em 3', essencial à incorporação dos demais nucleotídeos à cadeia de DNA em formação. O aciclovir é cem vezes mais seletivo para a DNA polimerase viral do que para a enzima celular, possuindo, desta forma, toxicidade mínima. O aciclovir não elimina o vírus do hospedeiro e deve ser usado nas recidivas. A resistência dos vírus herpéticos ao aciclovir não é uma questão recente, mas a disseminação de cepas resistentes em pacientes imunocomprometidos e a decorrente progressão da doença são preocupantes. A resistência pode ser devido à expressão reduzida da TQ viral nessas cepas, ou à existência de uma TQ não funcional, além de TQ mutantes capazes de selecionar o substrato nucleosídico do aciclovir. O desenvolvimento da resistência pode estar relacionado com o uso de altas doses terapêuticas ou profiláticas do aciclovir, associado à imunossupressão no caso de pacientes com AIDS. A biodisponibilidade do aciclovir oral é de 10-20%, enquanto que a do valaciclovir (éster L-valina do aciclovir) é em torno de 50%. A administração oral do valaciclovir resulta na conversão em aciclovir, no fígado e no intestino, sendo mais eficiente do que a administração parenteral. Devido à sua maior biodisponibilidade, o valaciclovir pode ser administrado com menor frequência, tornando-se uma opção conveniente para o tratamento oral de infecções herpéticas em pacientes imunocompetentes. Entretanto, o valaciclovir não é efetivo contra infecções resistentes ao aciclovir.

Penciclovir e Fanciclovir: possuem mecanismo de ação similar ao do aciclovir. O trifosfato de penciclovir é cerca de cem vezes menos potente na inibição da replicação viral do que o aciclovir; entretanto, esse atinge maior concentração plasmática e tem maior tempo de meia-vida nas células infectadas. O penciclovir só

está disponível em cremes para uso tópico, e estudos sobre sua segurança e eficácia ainda estão em andamento. O fanciclovir, éster diacetil do penciclovir, é bem absorvido no trato gastrointestinal, e está disponível somente em formas farmacêuticas orais.

Trifluoridina: o trifosfato de trifluoridina inibe a DNA polimerase celular e viral, em baixas concentrações; porém, é tóxico no uso sistêmico. Está disponível como solução nos tratamentos de infecções oculares pelo HSV.

Vidarabina: análogo da adenina, que é fosforilado por quinases celulares à trifosfato de vidarabina, o qual inibe a DNA polimerase viral e, um pouco menos, a celular. Está disponível em pomadas para o tratamento de infecções oculares.

Foscarnet: inibe diretamente a DNA polimerase viral e não requer fosforilação pela TQ do vírus. É ativo contra vírus resistentes ao aciclovir e vírus deficientes de TQ. A resistência ao foscarnet é rara e surge de mutações do vírus.

Cidofovir: nucleosídeo 5'-monofosfato, que é fosforilado por TQ de células hospedeiras em um metabólito biologicamente ativo, o qual inibe seletivamente a replicação viral. Por não ser dependente da TQ viral, pode ser ativo contra vírus deficientes em TQ. A resistência ao cidofovir é rara e surge de mutações virais. Seu tempo de meia-vida é longo e, por isso, permite apenas uma dose semanal. Pode ser usado topicamente ou por via intravenosa no tratamento de HSV resistente ao aciclovir e ao foscarnet.

Docosanol: inibe a fusão entre a membrana plasmática da célula hospedeira e o envelope do HSV, bloqueando a entrada do vírus. É disponível em cremes tópicos no tratamento de herpes labial recorrente.

Brivudina: atua como inibidor da DNA polimerase viral, após fosforilação intracelular. Pode atuar como um substrato alternativo e, portanto, ser incorporado pelo DNA viral, reduzindo sua integridade e prejudicando seu funcionamento. Esta disponível para uso tópico e oral no tratamento de infecções causadas pelo HSV-1.

Ganciclovir: atua na DNA polimerase viral, onde é fosforilado a trifosfato de ganciclovir, sendo então incorporado como monofosfato de ganciclovir ao DNA viral, impedindo sua replicação. É encontrado em formas intravenosas, orais e implantes intra-oculares.

Todas as informações sobre a terapia anti-HSV-1 e anti-HSV-2 aqui apresentadas encontram-se na literatura consultada (CASSADY; WHITLEY, 1997; BRADY; BERNSTEIN, 2004; DE CLERCQ, 2004, 2005).

2.2 Ácido gálico e seus ésteres n-alquílicos

O ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico - AG) é um composto fenólico presente em diversas plantas, que pode ser obtido através de hidrólise ácida ou alcalina de taninos. Seus ésteres n-alquílicos, também conhecidos como galatos, em especial o galato de propila, octila e dodecila, são utilizados como aditivos antioxidantes em alimentos, para prevenir mudanças no sabor e no valor nutritivo devido à oxidação de gorduras insaturadas (Figura 3) (VAN DER HEIJDEN; JANSSEN; STRIK, 1986; KUBO et al., 2002a; MUNOZ et al., 2002; OW; STUPANS, 2003).

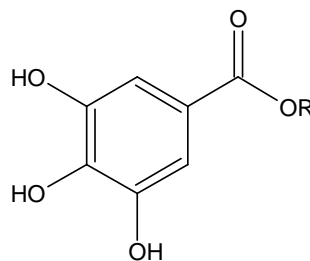


Figura 3. Estrutura básica dos galatos. No ácido gálico, o radical R = H e nos galatos, R = cadeia alquílica com número variável de carbonos.

Os galatos podem ser usados isoladamente ou em combinação com outros antioxidantes, como o hidroxitolueno butilado (BHT). Contudo a sua quantidade deve permanecer dentro de limites estabelecidos. Nos EUA, o percentual permitido para esta classe de antioxidantes é de 0,01% em qualquer tipo de alimento, já na Holanda a quantidade permitida é de 0,01% em óleos e gorduras, como antioxidante total, e de 0,04 e 0,01% na fração lipídica de biscoitos e sopas, respectivamente. Este controle acerca da quantidade presente nos alimentos deve-se principalmente a estudos anteriores a década de 60, onde o perfil toxicológico destas substâncias foi traçado (para revisão ver VAN DER HEIJDEN; JANSSEN; STRIK, 1986), e aos diversos relatos de sensibilização e dermatite de contato, em especial ao galato de propila (BOJS; NICKLASSON; SVENSSON, 1987; POULSEN, 1991; HAUSEN; BEYER, 1992; MAHENDRAN; QUINLAN; WILKINSON, 2002; MUNOZ et al., 2002)

A ação destes compostos sobre os radicais livres já foi bastante estudada, e atualmente sabe-se que o tamanho da cadeia alquílica interfere nesta atividade, e

que algumas destas moléculas podem agir tanto como antioxidantes como pró-oxidantes (GUNKEL et al., 1998; KUBO et al., 2002a; YOSHINO et al., 2002; HA; NIHEI; KUBO, 2004; AZMI et al., 2005). Sua atividade benéfica está relacionada com a prevenção da formação de radicais superóxido e de ácido úrico através da inibição da enzima xantina oxidase, além da modulação da atividade da mieloperoxidase e seqüestro de ácido hipocloroso (KUBO et al., 2002a; MASUOKA; NIHEI; KUBO, 2006; ROSSO et al., 2006). Já a ação pró-oxidante é cobre-dependente, e resulta em quebras na molécula de DNA e formação de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, dano reconhecidamente provocado por espécies reativas de oxigênio (YOSHINO et al., 2002; AZMI et al., 2005).

Além da atividade antioxidante, diversas outras atividades biológicas já foram descritas para este grupo de moléculas. As observações feitas variam enormemente entre si, entretanto, tornou-se inquestionável o fato de que o tamanho da cadeia alquílica interfere nas atividades biológicas, porém não existe um padrão para tal, sendo necessária a avaliação de cada caso. Dentre as atividades relatadas estão: influência sobre enzimas hepáticas (OW; STUPANS, 2003), sobre 5-alfa-redutases envolvidas no processamento de hormônios como a testosterona (HIIPAKKA et al., 2002), e sobre a esqualeno epoxidase, enzima relacionada com a biossíntese do colesterol (ABE; SEKI; NOGUCHI, 2000); atividades antiinflamatória (MURASE et al., 1999), vaso-relaxante (PAULINO et al., 1999) e neuroprotetora (BASTIANETTO et al., 2006). Entretanto, grande parte dos esforços na busca por um melhor entendimento das atividades biológicas destes compostos restringe-se ao âmbito da sua utilização como agentes antineoplásicos e antiinfeciosos.

Na pesquisa do câncer, Feng e colaboradores (2003) relataram que os galatos possuem atividade antimutagênica e de inibição de CYP1A, uma enzima do metabolismo de xenobióticos da família do citocromo p450, enquanto que outros pesquisadores demonstraram citotoxicidade e indução de apoptose em células tumorais, modulação da glicoproteína P, envolvida no mecanismo de extrusão de quimioterápicos, e supressão do gene do vírus tumoral mamário de camundongos (BAER-DUBOWSKA; GNOJKOSWKI; FENRYCH, 1997; SAEKI et al., 2000; ABE et al., 2001; GNOJKOSWKI; KRAJKA-KUZNIAK; BAER-DUBOWSKA, 2001; FIUZA et al., 2004; KITAGAWA et al., 2005; FREY et al., 2006; VELURI et al., 2006)

Em relação à atividade dos galatos contra agentes infecciosos, grande parte dos estudos tem demonstrado propriedades antibacteriana e antifúngica (KUBO;

XIAO; FUJITA, 2001, 2002; FUJITA; KUBO, 2002a, b; KUBO; FUJITA; NIHEI, 2002; KUBO et al., 2002b, 2003, 2004; STAPLETON et al., 2004; KREANDER; VUORELA; TAMMELA, 2005; SHIBATA et al., 2005; HSU; CHANG; CHANG, 2007) e, mais recentemente e, em menor número, ação antiviral (KANE et al., 1988; AHN et al., 2000; SAVI et al., 2005; UOZAKI et al., 2006) e tripanocida (ALBINO, 2005).

Primeiramente, Kane e colaboradores (1988) relataram a potente inibição dos vírus herpéticos tipo 1 e 2 pelo galato de metila, evidenciando a importância da cadeia carbônica lateral e da presença de três hidroxilas na molécula para manutenção da atividade. Além disso, demonstraram que a inibição do HSV-2 pelo galato de metila é 40 e 110 vezes maior que a do ácido gálico e do galato de propila, respectivamente.

Ahn e colaboradores (2000), em um estudo com diversos compostos fenólicos com o grupamento galoil, também presente nos galatos, evidenciaram a importância desta estrutura na atividade destes compostos contra a integrase do HIV-1; no entanto, o AG apresentou uma fraca atividade em relação aos compostos com mais de um grupamento galoil avaliados neste estudo.

Mais recentemente, a atividade anti-herpética de diversos galatos foi relatada em um trabalho que estabeleceu uma série de relações estrutura-atividade para estas moléculas, não somente no que diz respeito à ação anti-herpética, mas também à sua ação antioxidante e sua genotoxicidade (SAVI et al., 2005). Ainda mais recentemente, Uozaki e colaboradores (2006) demonstraram a atividade antiviral pronunciada do galato de octila contra o HSV-1 e a capacidade deste composto de acelerar a morte de células infectadas, e, também, sua atividade contra dois vírus de RNA, o vírus da estomatite vesicular e o poliovírus.

Tendo em vista o potencial deste grupo de compostos na terapia anti-herpética, o presente trabalho teve como objetivo principal o estudo do mecanismo pelo qual os galatos inibem a replicação do HSV-1.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Estudar a citotoxicidade e o mecanismo da ação anti-herpética *in vitro* do ácido gálico e do galato de pentila.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade e a ação anti-herpética (anti-HSV-1, cepa KOS) do ácido gálico e 15 galatos em células VERO, através do ensaio colorimétrico do MTT.
- Confirmar a atividade antiviral dos seis compostos que apresentaram melhor ação antiviral numa triagem preliminar, através do ensaio de placas de lise e selecionar os dois compostos com melhor atividade antiviral confirmada (ácido gálico e galato de pentila).
- Avaliar a possível atividade virucida destes dois compostos.
- Avaliar a possível ação destes compostos na adsorção e penetração viral.
- Avaliar a influência destes compostos na multiplicação viral em função do tempo, através da sua adição em diferentes períodos pós-infecção.
- Avaliar o possível sinergismo destes compostos com o aciclovir.
- Avaliar a possível interferência destes compostos na síntese do DNA viral, através da técnica de PCR.
- Avaliar a possível interferência destes compostos na expressão gênica viral, em diferentes fases da replicação viral, utilizando a técnica de RT-PCR.
- Avaliar a possível interferência destes compostos na expressão de proteínas virais, em diferentes fases da replicação viral, através do ensaio de Western Blotting.
- Propor o mecanismo de ação anti-herpética para estes dois compostos.

1 **4 ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO**

2
3 **Periódico: Antimicrobial Agents and Chemotherapy**

4 Fator de Impacto (JCR 2005): 4,379

5
6 **In Vitro Antiherpetic Activity and Mode of Action of Gallic Acid and Pentyl Gallate**

7 Antiviral Activity of Gallic Acid and Pentyl Gallate

8
9 Jadel Müller Kratz¹, Carla Regina Andrighetti-Fröhner^{1,3,4}, Deise Juliana Kolling¹, Paulo César
10 Leal³, Ricardo José Nunes³, Rosendo Augusto Yunes³, Tomas Bergström⁴, Edward Trybala⁴,
11 Célia Regina Monte Barardi², Cláudia Maria Oliveira Simões^{1*}

12
13 Laboratory of Applied Virology, ¹Department of Pharmaceutical Sciences, ²Department of
14 Microbiology and Parasitology,

15 ³Laboratory of Synthesis and Structure-Relationship, Department of Chemistry,

16 Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Campus Universitário Trindade, Florianópolis,
17 SC, Brazil.

18 ⁴Department of Clinical Virology, Göteborg University, Göteborg, Sweden.

19
20 * Corresponding author. Mailing address: Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC,
21 Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC),
22 Campus Universitário Trindade, Florianópolis, 88040-900, SC, Brasil.

23 Tel.: +55-48-3331-5207; fax: +55-48-3331-9258.

24 E-mail address: claudias@reitoria.ufsc.br (Cláudia M. O. Simões).

25 **ABSTRACT**

26 Gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid - GA) is a phenolic compound present in a great variety
27 of plants. Its synthetic n-alkyl esters, also known as gallates, especially propyl, octyl and dodecyl
28 gallates, are vastly employed as antioxidants by food, cosmetic and pharmaceutical industries.
29 The inhibitory effects of GA and fifteen gallates on herpes simplex virus type 1 (HSV-1)
30 replication were investigated. After a preliminary screening, GA and pentyl gallate (PG) seemed
31 to be the most active compounds and had their mechanism of action studied through a set of
32 assays, which attempted to localize the point in the viral replication cycle where impairment
33 occurred. Their mechanism of antiviral activity seem to be mediated, at least in part, by reduced
34 viral infectivity (only PG), inhibition of virus attachment and entry to cells, impaired levels of
35 viral capsid protein ICP5, α protein ICP27 and envelope proteins gB, gC, gD and gE, as well as
36 by interference with gD protein synthesis due to blockage of gD mRNA synthesis (only PG).
37 Although the combination of GA and PG with acyclovir resulted in no interaction, the detected
38 multiple modes of action of both compounds suggest that further studies are merited.

39

40

41

42

43

44

45

46

47 **INTRODUCTION**

48 Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is an enveloped DNA virus that causes one of the most
49 common viral infections in humans, leading to a variety of diseases ranging from mild to severe
50 and sometimes life-threatening. Immunocompromised patients are at increased risk of severity
51 and recurrence of HSV-1 infection. In addition, HSV-1 and HSV-2 may facilitate the
52 transmission of human immunodeficiency virus (HIV) (6, 9, 51, 52).

53 The sequentially ordered transcriptional program of HSV-1 is regulated by viral and cellular
54 factors. The virion-associated factor α -TIF in association with two cellular factors Oct1 and HCF
55 promote expression of the immediate-early (α – IE) mRNAs, encoding the infected-cell proteins
56 ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 and ICP47. After the activation of the transcriptional machinery, early
57 (β – E) genes, such as DNA polymerase and thymidine kinase are expressed followed by viral
58 genome replication and late (γ – L) gene expression, which leads to the production of structural
59 proteins such as glycoprotein B (gB). Inhibition of any of these stages blocks HSV-1 replication
60 and, consequently, is a potential target for antiviral therapy (12, 21, 36, 52).

61 Several nucleoside analogues have been approved for clinical use. Among those, acyclovir is
62 widely used for the systemic treatment of HSV infections. It is a highly selective antiviral agent
63 because it is specifically phosphorylated by viral thymidine kinase in infected cells (12).

64 However, acyclovir-resistant HSV infection in immunocompromised patients such as
65 transplanted patients and patients with AIDS has recently been observed. Therefore, it is
66 desirable to develop new anti-HSV agents in order to substitute or complement acyclovir (8, 12,
67 14).

68 The gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid) is a phenolic compound present in a great variety
69 of plants. Its synthetic n-alkyl esters, also known as gallates, especially propyl, octyl and dodecyl

70 gallates, are vastly employed as antioxidants by food, cosmetic and pharmaceutical industries
71 (27, 49).

72 Besides the antioxidant activity, other biological activities have been described for this group of
73 molecules. The reports vary enormously, but one aspect has become very perceptible: the
74 variable influence of the alkyl chain on the profile of the biological activities. Among them, it can
75 be cited their influence on hepatic enzymes (34), anti-inflammatory activity (32), neuroprotective
76 effects (4), and mainly anticancer (15, 16, 23, 50), antibacterial and antifungal properties (17, 24,
77 25, 26, 28, 46).

78 There are few reports about the antiviral activity of n-alkyl esters of gallic acid. In 1988, a study
79 described the potent inhibition of HSV-1 and HSV-2 by methyl gallate (20). In 2000, as part of
80 the screening of phenolic compounds against HIV-1 integrase, gallic acid was found to be active
81 (1). More recently, the anti-herpetic activity of several gallates was described by our research
82 group, which proposed various structure-relationships regarding the antiviral, antioxidant and
83 genotoxic effects (38). Furthermore, the pronounced anti-HSV-1 activity of octyl gallate, its
84 ability to induce the death of infected cells, and its inhibitory effect against RNA viruses were
85 also recently demonstrated (48).

86 In the present study, gallic acid and fifteen gallates were screened for anti-HSV-1 activity,
87 followed by the selection of the most promising compounds and the study of their mechanism of
88 antiviral action.

89

90

91

92

93

94 **MATERIALS AND METHODS**

95 **Compounds.** Gallic acid and all the gallates used in this study (Fig. 1) were synthesized as
96 described previously (38). The compounds (50 mM) were dissolved in dimethyl sulphoxide,
97 stored at -20°C protected from light, and further diluted in culture medium prior to use. Acyclovir
98 was purchased from Sigma® (St. Louis, MO, USA).

99 **Cells and viruses.** African green monkey kidney (Vero) cells (ATCC:CCL 81, Rockville, MD,
100 USA) were grown in minimum essential medium (MEM) (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)
101 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS – Gibco BRL, Grand Island, NY, USA),
102 penicillin (100U/ml), streptomycin (100 µg/ml) and amphotericin B (25 µg/ml). African green
103 monkey kidney (GMK AH1) cells (obtained from Department of Clinical Virology, Göteborg
104 University, Göteborg, Sweden) were grown in Eagle's minimum essential medium (EMEM,
105 Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) supplemented with 2% newborn calf serum (NCS, Gibco
106 BRL, Grand Island, NY, USA) and 0.05% Primaton RT substance (Kraft Inc., Norwich, CT,
107 USA), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml). The cell cultures were maintained at
108 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. HSV-1 strains, KOS (obtained from Laboratory of
109 Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of Rennes, France) and KOS 321, a plaque
110 purified isolate of wild-type strain KOS (19), were propagated in Vero and GMK AH1 cells,
111 respectively. Stock viruses were prepared as described previously (41). After three cycles of
112 freezing/thawing the fluids were titrated on the basis of PFU count as previously described (7)
113 and stored at -80°C until use.

114 **Virus purification.** Extracellular HSV particles were purified as previously described (22), with
115 some modifications. Briefly, GMK AH1 cells were infected with HSV-1, KOS 321 strain, at a
116 multiplicity of infection (MOI) of 3 PFU per cell. After 1–2 h of incubation at 37°C, 20 µCi/ml of
117 methyl-[³H] thymidine (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) were added and the

118 cells were incubated for 48 h at 37°C. All subsequent steps of the procedure were carried out at
119 4°C. The cells and the infectious medium were harvested and centrifuged for 15 min at 1,000xg.
120 The supernatant medium was further clarified by centrifugation for 7 min at 5,000xg, and then
121 centrifuged for 2 h at 22,000xg. The resulting viral pellet was stored overnight at 4°C and
122 resuspended in PBS. The virus suspension was loaded on top of a discontinuous sucrose gradient
123 consisting of 2 ml each of 50, 40 and 30% sucrose in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA at pH 7.4,
124 and centrifuged for 2 h at 20,000 rpm (SW28.1 rotor, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).
125 The 40/50% interphase band was aspirated, diluted in PBS and centrifuged for 90 min at 19,000
126 rpm (SW28.1 rotor). The resulting viral pellet was washed twice with PBS, then dissolved in the
127 same buffer and stored at 4°C. The specific activity (counts per minute [cpm]/PFU) was 1.29 x
128 10⁻² for HSV-1, KOS 321 strain.

129 **Cytotoxicity evaluation.** Vero or GMK-AH1 cells were seeded into 96-well microplates
130 (Corning, Corning, NY, USA) at 2.5 x 10⁴ cells per well. After 24h, cells were treated with
131 compounds at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere for 72h at concentrations ranging from
132 7.8 to 1000 μM (ratio 1:2). Cell viability was assessed by MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2,5-
133 diphenyl tetrazolium bromide] assay (47). Each experiment was repeated three times, and the
134 concentration (CC₅₀) of each compound that inhibited cellular growth to 50% in comparison to
135 untreated controls was estimated by nonlinear regression of concentration-response curves
136 generated from these data.

137 **Screening of in vitro anti-HSV-1 effect.** Vero cells were seeded into 96-well microplates
138 (Corning, Corning, NY, USA) at 2.5 x 10⁴ cells per well. After 24h, cells were infected with
139 HSV-1 at a MOI of 0.5 at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere and treated for 72h with non
140 cytotoxic concentrations of each compound. Cell, viral and acyclovir (100 μM) controls were run
141 simultaneously. The same method used to evaluate cell viability with MTT was followed. Each

142 experiment was repeated three times and the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of each
143 compound was calculated as $[(A-B)/(C-B) \times 100]$, where A, B and C indicate the absorbances of
144 the tested compound, virus and cell controls, respectively.

145 **Plaque reduction assay.** This assay followed the procedures previously described (29) with
146 minor modifications. Acyclovir (10 μ M) was used as a positive control. Vero cells were seeded
147 into 24-well microplates (Corning, Corning, NY, USA) at 2.5×10^5 cells per well. After 24h,
148 cells were incubated with 100 PFU of HSV-1. After 1h of adsorption at 37°C, the cells were
149 washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) and overlaid with MEM + 1.5%
150 carboxymethylcellulose (CMC) containing or not different concentrations of the compounds.
151 After 72h at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere, the overlay medium was removed and the
152 cells were fixed and stained with naphthol blue-black (Sigma®, St. Louis, MO, USA). The
153 inhibitory activity (%) of each compound was determined by the following formula: (Number of
154 plaques control – Number of plaques experiment) X 100 / (Number of plaques control). Each
155 experiment was repeated three times, and the concentration that inhibited 50% of plaque
156 formation (IC₅₀) in comparison to untreated controls was estimated by nonlinear regression of
157 concentration-response curves generated from these data.

158 **Direct virucidal assay.** This assay followed the procedures previously described (41). Gallic
159 acid (GA) and pentyl gallate (PG) at 125 μ M were mixed, individually, with an equal volume of
160 HSV-1 suspension for 2h at 37°C. Each mixture was then serially diluted 10-fold and their
161 residual infectivity was determined by plaque reduction method, as described above.

162 **Time-of-addition study.** This assay followed the procedures described previously (29) with
163 minor modifications. Vero cells were seeded into 24-well microplates (Corning, Corning, NY,
164 USA) at 2.5×10^5 cells per well. After 24h, cells were incubated with HSV-1 at a MOI of 0.1 and
165 125 μ M of GA or PG was added into wells either prior to infection (-3h), concomitantly with

166 infection (0h) or at intervals of 2, 4, 6, 8, 12, 16 or 24h post-infection. After 25h of infection at
167 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere, cells were submitted to three cycles of
168 freezing/thawing and the virus titre of each supernatant was determined by plaque assay, as
169 described above.

170 **Inhibition of virus attachment assay. (a)** This assay followed the procedures described
171 previously (39) with minor modifications. Vero cells were seeded into 24-well microplates
172 (Corning, Corning, NY, USA) at 2.5×10^5 cells per well. After 24h, cells were incubated with
173 100 PFU of HSV-1 in the presence or absence of different concentrations of GA or PG for 2h at
174 4°C. Then the virus inocula and the compounds were removed, cells were washed three times
175 with PBS and the inhibitory activity of the compounds was determined by the plaque reduction
176 assay, as described above. **(b)** GMK AH1 cells in 24-well microplates were pre-cooled for 30
177 min at 4 °C. Serial two-fold dilutions of compounds were mixed with purified radiolabelled
178 HSV-1 KOS 321 in PBS supplemented with 1 mM CaCl₂ and 0.5 mM MgCl₂ (PBS-A) and were
179 incubated for 15 min at 37°C. Cells were washed with cold PBS-A, the virus-compound mixture
180 was added, and the plates were left for virus adsorption for 2 h at 4°C under moderate agitation.
181 Subsequently, the cells were washed three times with PBS-A and lysed with PBS-A containing
182 5% SDS. The lysates were transferred to scintillation vials for radioactivity quantification. The
183 results are expressed as a percentage of attached viral cpm found with test compound-treated
184 vírions relative to mock-treated controls. Values shown are means of four determinations from
185 two separate experiments.

186 **Inhibition of virus entry assay.** This assay followed the procedures described previously (40)
187 with minor modifications. Briefly, mixtures of GA or PG (125 µM) and radiolabelled virus in
188 serum-free EMEM were pre-incubated for 15 min at 37°C prior to the addition to GMK AH1
189 cells in 12-well microplates and subsequent incubation for 3 h at 37°C. After twice washing with

190 PBS, cells from six wells were harvested for radioactivity quantification as in the virus
191 attachment assay. The remaining cells were incubated with warm citrate-buffered saline (pH 3)
192 for 1 min, then washed twice with PBS and treated with pronase (200 µg/ml; Sigma®, St. Louis,
193 MO, USA) for 15 min at 37°C. The cells were harvested and washed twice with PBS by
194 centrifugation at 250xg for 5 min. Half of the volume of sedimented cells was mixed with 5%
195 SDS and subjected to quantification of radioactivity, whereas the remaining cells were lysed with
196 1% NP40 solution in hypotonic phosphate buffer and centrifuged for 10 min at 800xg to sediment
197 the nuclei. The sedimented fraction was lysed with 5% SDS and subjected to quantification of
198 radioactivity. The results are expressed as a percentage of cpm found with test compound-treated
199 virions relative to mock-treated controls. Values shown are means of four determinations from
200 two separate experiments.

201 **Extraction of total cellular DNA and RNA.** Vero cells (2.0×10^6) were seeded into 25 cm²
202 culture flasks (Corning, Corning, NY, USA). After 24h, cells were incubated or not with HSV-1
203 at a MOI of 0.1 for 1h at 37°C. Then, cells were washed three times with PBS and incubated in a
204 humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C in the presence or absence of 125 µM of GA or PG and
205 harvested at various times. For DNA extraction, at 2, 4, 8, and 16h post-infection, cells were
206 lysed with 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA, 0.5% SDS (w/v), and 100 µg/ml proteinase
207 K, at 37°C for 30 min. The samples were then extracted with an equal volume of phenol-
208 chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1), followed by extraction with an equal volume of
209 chloroform (CHCl₃). The nucleic acids were precipitated from the aqueous phase using 3
210 volumes of cold 100% isopropanol. The resulting pellets were washed with cold 70% (v/v)
211 ethanol and suspended in 50 µl of Milli-Q water (37). For RNA extraction, 8h post-infection, 1ml
212 of Trizol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was added to cells and RNA was extracted

213 according to the manufacturer instructions. The concentrations of DNA and RNA samples were
214 determined by measuring the optical density at 260/280 nm.

215 **Synthesis of first-strand cDNA.** For cDNA synthesis, a two-step RT-PCR using the ImProm-
216 II® Reverse Transcription System (Promega, Southampton, UK) was performed according to the
217 manufacturer instructions. Aliquots of 5 µg of RNA, 0.06 µg/ml of random primers (Invitrogen,
218 Carlsbad, CA, USA), and 10 U of RNase OUT® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were used.
219 Annealing and first-strand synthesis were carried out at 25°C for 5 min and at 42°C for 60 min,
220 respectively.

221 **PCR.** The assay followed the procedures described previously (29) with minor modifications.
222 Briefly, 5 µl of cDNA or total cellular DNA were mixed with 35 pmoles of primers, 1.5 U of *Taq*
223 polymerase, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 0.01 mM EDTA, 5% glycerol, 1.5 mM
224 MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP and water in a total volume of 50 µl. The oligonucleotide primer
225 pairs were as follows: for gB (amplicon, 341 bp), 5'-CTGGTCAGCTTTCGGTACGA-3' and 3'-
226 GTTTGTCGACGTGCTGGAC-5'; for ICP0 (amplicon, 157 bp), 5'-
227 TTCGGTCTCCGCCTGAGAGT-3' and 3'-AGCATA CGCCGACCTCCCAG-5'; for ICP27
228 (amplicon, 289 bp), 5'-TTTCTCCAGTGCTACCTGAAGG-3' and 3'-
229 GCTCAGCACCGACGCTCAACT-5'; for gD (amplicon, 222 bp), 5'-
230 ATCACGGTAGCCCGGCCGTGTGACA-3' and 3'-GTATGGCCTTGCGTGGT GTGTT-5';
231 for β-actin as PCR control (amplicon, 461 bp), 5'-TCATGTTTGAGACCTTCAA-3' and 3'-
232 CAGAAACGCCTACAGGTGC-5' (5, 13, 30). The PCR amplification was carried out at the
233 following settings: denaturing temperature of 94°C for 1 min, annealing temperature of 53°C for
234 1 min, and elongation temperatures of 72°C for 2 min for the first 25 cycles and then 72°C for 10
235 min for final extension. The amplified products were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis

236 followed by ethidium bromide staining. The size of the amplified products was determined by
237 comparison with standard DNA markers (100 bp, Sigma®, St. Louis, MO, USA).

238 **Western blotting analysis.** This assay followed the procedures described previously (29) with
239 minor modifications. Vero cells were seeded into 6-well microplates (Corning, Corning, NY,
240 USA) at 6.0×10^5 cells per well. After 24h, cells were incubated or not with HSV-1 at a MOI of
241 0.1 for 1h at 37°C. Then, cells were washed three times with PBS and 125 μ M of GA or PG was
242 added. The plates were incubated in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C for 18h. Extracted
243 cellular proteins (~50 μ g – Bradford) were dissolved in the dissociation buffer (2% sodium
244 dodecyl sulfate (SDS), 5% β -mercaptoethanol, 0.125 M Tris-HCl, 30% glycerol, 0.8%
245 bromophenol blue, and phenylmethylsulfonyl fluoride (100 μ g/ml - PMSF) (Sigma®, St. Louis,
246 MO, USA) and boiled for 5 min. Then proteins were resolved by 10% SDS-PAGE and
247 transferred to Immobilon PVDF® membranes (Millipore®, Billerica, MA, USA). Membranes
248 were blocked overnight with 10% nonfat dry milk in Tris-Base saline buffer (TBS), and then
249 were incubated with the following antibodies: mouse monoclonal antibodies raised against HSV-
250 1 γ proteins gD and gC (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; [42, 43],
251 respectively); rabbit polyclonal antibody raised against HSV-1 γ protein ICP5 (kindly provided
252 by Dr. G. Cohen and Dr. R. Eisenberg, University of Pennsylvania, Philadelphia); and goat
253 polyclonal antibody raised against HSV-1 α protein ICP27 (Santa Cruz Biotechnology, Santa
254 Cruz, CA, USA). Specific reactive proteins were detected by diaminobenzidine (DAB)
255 colorimetric reaction, after incubation with a rabbit anti-mouse, a swine anti-rabbit or a donkey
256 anti-goat immunoglobulin secondary antibodies, respectively, linked to horseradish peroxidase.

257 **ELISA.** The assay followed the procedures described previously (33). Briefly, serial two fold
258 dilutions of compounds were mixed with HSV-1 suspension, KOS 321 strain (MOI 0.1) and were

259 incubated for 10 min at room temperature. The mixtures were added to GMK AH1 cells in 96-
260 well microplates and incubated at 37°C for 24h. Then, cells were washed with PBS and fixed
261 with 0.25% glutaraldehyde in PBS for 10 min at room temperature. Thereafter, cells were washed
262 repeatedly and blocked with 2% BSA in PBS for 30 min at room temperature and incubated with
263 monoclonal antibodies B1C1B4 (anti-gC-1), B11D8 (anti-gB) or B1E6A5 (anti-gE) (42, 43) for 1
264 h at room temperature. After incubation, cells were washed three times with PBS and incubated
265 with alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch
266 Laboratory, Newmarket, Suffolk, UK). Finally, cells were washed three times with PBS and
267 incubated with diethanolamine buffer containing p-nitrophenyl phosphate. Absorbance value of
268 the supernatant was measured at 405 nm with background subtraction at 690 nm. Each
269 experiment was repeated three times, and the concentration that inhibited 50% of absorbance
270 (IC_{50}) in comparison to untreated controls was estimated by nonlinear regression of
271 concentration-response curves generated from these data.

272 **Drug combination assay.** This assay followed the procedures described previously (18) with
273 minor modifications. A plaque reduction assay was performed as described above, and the
274 treatment consisted in GA, PG or acyclovir alone ($0.125 \times IC_{50}$, $0.25 \times IC_{50}$, $0.5 \times IC_{50}$, $1 \times IC_{50}$,
275 $2 \times IC_{50}$), and the mixture of varying concentrations of each compound in a fixed ratio (i.e. $0.5 \times$
276 IC_{50} of GA + $0.5 \times IC_{50}$ of acyclovir; $0.25 \times IC_{50}$ of GA + $0.25 \times IC_{50}$ of PG). Based on the
277 inhibitory activities, the synergistic or antagonistic antiviral effect among compounds was
278 determined using the software MacSynergy II (kindly provided by Dr. Mark Prichard, University
279 of Michigan), through a three-dimensional analytical method (35).

280 **Statistical analysis.** Data were presented as means \pm standard deviations, and the differences
281 between groups were assessed with Student's *t* test or one-way ANOVA + SNK post test.

282 RESULTS

283 **Cytotoxicity evaluation and screening of in vitro anti-HSV-1 effect.** As shown in Table 1,
284 gallic acid and its alkyl esters were evaluated for their cytotoxicity and anti-HSV-1 activity in
285 Vero cells by MTT assay. After 72h of treatment, cytotoxic effects increased along with the
286 number of carbons in the alkyl moiety, reaching maximum effect at carbon number 11 (undecyl
287 gallate), while compounds with a longer alkyl chain were gradually less cytotoxic. Similar results
288 were obtained with GMK-AH1 cells (data not shown). After the determination of cytotoxic
289 concentrations, gallic acid and gallates were screened for their anti-HSV-1 activity, in which,
290 different degrees of antiviral activity were found. While gallates with more than seven carbons in
291 the alkyl moiety had little effects in viral replication, in exception of nonyl and octadecyl gallates,
292 gallic acid and the other gallates showed a concentration-depended response, with IC₅₀ values
293 varying from 15.0 to 288.5 µM. Analyzing the results presented in Table 1, we selected six
294 compounds (gallic acid, methyl, ethyl, propyl, butyl and pentyl gallates) which presented a good
295 ratio between cytotoxicity and anti-HSV-1 activity (higher SI values) in order to confirm their
296 antiviral activity by a plaque reduction assay. Octadecyl gallate was excluded due to its low
297 solubility in aqueous media.

298 **Gallic acid and pentyl gallate presented higher percentages of HSV-1 inhibition.** To confirm
299 and further select the best candidates to have their mechanism of action studied, we performed a
300 plaque reduction assay with the six compounds chosen in the MTT screening. Acyclovir was
301 used as positive control (IC₅₀ = 0.43 ± 0.1 µM). After 72h of treatment, the IC₅₀ values were 57.1
302 ± 2.3 µM for gallic acid, 102.4 ± 2.7 µM for methyl gallate, 112.5 ± 19.7 µM for ethyl gallate,
303 110.8 ± 20.7 µM for propyl gallate, 101.5 ± 26.6 µM for butyl gallate and 45.4 ± 2.5 µM for
304 pentyl gallate. As shown in Fig. 2, at the highest concentration evaluated (125 µM), only gallic

305 acid and pentyl gallate thoroughly inhibited HSV-1 replication. Thus the following study was
306 focused on these compounds.

307 **Effect of GA and PG on viral infectivity.** In order to evaluate the direct virucidal effect of
308 compounds, 3.75×10^7 PFU of HSV-1 were incubated with 125 μ M of GA and PG for 2h at
309 37°C. The results demonstrated that GA had no effect on the viral infectivity (data not shown)
310 while PG reduced the virus titre in over 3 \log_{10} when compared to virus control, with a
311 percentage of inhibition of $99.9 \pm 0.1\%$.

312 **Time-of-addition studies of GA and PG on viral replication.** Time course experiments were
313 performed to investigate in which step of the replication process GA and PG inhibited HSV-1
314 replication. 125 μ M of each compound were added either prior to infection (-3h), concomitantly
315 with infection (0h) or at intervals of 2, 4, 6, 8, 12, 16 or 24h post-infection, and infected cells
316 were harvested at 25h post-infection. The effect on virus yield was determined by plaque
317 reduction assay. The results showed that GA or PG completely inhibited virus yield when added
318 at 0-8h post-infection, and this activity remained important when compounds were added 12h
319 post-infection (Fig. 3). Delaying the time of adding PG did not critically affect its antiviral
320 activity, since $85.7 \pm 0.1\%$ of inhibition is still observed when PG is added 24h post-infection.
321 Nonetheless, when GA was added 16h post-infection its antiviral activity decreased to $60.7 \pm$
322 1.0% of inhibition and at 24h post-infection no significant reduction in virus yield was observed.
323 These results indicate that GA and PG may affect late stages of HSV-1 replication, even though
324 GA activity is dramatically decreased at 24h post-infection.

325 Also, during the time-of-addition experiments, in order to evaluate the effects of GA and PG on
326 prophylaxis of HSV-1 infection, Vero cells were incubated with each compound for 3h prior to
327 infection. The results indicated that both compounds did not exert any significant effect on the

328 number of HSV-1 plaques when compared to untreated controls (data not shown), thus, neither
329 GA nor PG possess in vitro prophylactic effect on HSV-1 infection.

330 **Effect of GA and PG on virus attachment and entry.** To further elucidate whether GA and PG
331 antiherpetic activity was related to blocking the early events of HSV-1 infection, their effect on
332 virus attachment and entry were investigated. Figure 4 shows the effect of each compound on the
333 attachment of HSV-1 to GMK AH1 cells. Both compounds inhibited virus attachment, although
334 GA presented a superior effect, with an IC_{50} value of $23.9 \pm 9.4 \mu\text{M}$. PG presented substantial
335 inhibition of virus attachment only at $125 \mu\text{M}$, with $51.0 \pm 4.6\%$ of inhibition. Since similar
336 results were obtained in the modified plaque reduction assay in Vero cells (data not shown), the
337 pre-treatment of virus with compounds was not required for the inhibition of its attachment to
338 cells, which suggests that the blockage of viral attachment component(s) rather than the
339 disintegration of viral particles by GA and PG was responsible for the observed effects. The entry
340 of HSV-1 into GMK AH1 cells was also investigated. Purified radiolabelled HSV-1 virions were
341 treated with GA or PG for 15 min at 37°C prior to their incubation with cells for 3 h at 37°C . The
342 amount of radiolabelled virus associated with intact cells (Figure 5; attachment), the low pH- and
343 pronase treated cells (Figure 5; entry 1 – cell entry), and the NP40 resistant nuclear fraction
344 (Figure 5; entry 2 – nucleus entry) were quantified, and compared with controls. The decreased
345 amounts of labeled HSV-1 in all these fractions suggest that GA and, in a lesser extension, PG
346 impaired the capability of the virus to attach to cells and to enter into the cell or into the nucleus.
347 However, the reduced cell- and nuclear-entry of HSV-1 might be a consequence of impairment in
348 the virus binding to cells. These results indicate that GA and PG affect early stages of HSV-1
349 replication.

350 **Effect of GA and PG on HSV-1 DNA synthesis.** We further defined whether GA and PG has
351 any effect on HSV-1 DNA replication, a key event during the complex transcription program of

352 the virus. After HSV-1 adsorption, total DNA was extracted at 2, 4, 8 and 16h post-infection and
353 viral DNA was analyzed by PCR using the ICP27 primer pair. As shown in Fig. 6A, HSV-1
354 DNA could not be detected in uninfected Vero cells (lane 1) but its presence was clearly verified
355 in HSV-1 infected cells (lanes 2 to 5). In relation to the effect of compounds, 125 μ M of PG did
356 not suppressed viral DNA synthesis in Vero cells (Fig. 6C) since corresponding bands were
357 found in all points of the extraction. Although GA seemed to inhibited HSV-1 DNA synthesis
358 (Fig. 6B), its effect could not be determined since β -actin DNA, the internal control, was also
359 absent. The cause could not be determined, but hypothesis were raised in the discussion section
360 of this work. These results suggested that the antiherpetic activity of compounds is not related to
361 impairment of HSV-1 DNA synthesis in Vero cells.

362 **Effect of GA and PG on HSV-1 gene expression in Vero cells.** RT-PCR analysis was
363 performed to determine whether inhibition of gene expression caused the impairment of viral
364 protein production in GA and PG-treated cells. After HSV-1 adsorption, total RNA was extracted
365 at 8h post-infection and analyzed by RT-PCR. As show in Fig. 7, while ICP27, gB and gD
366 mRNAs were absent in uninfected Vero cells (lane 1) and present in HSV-1 infected cells (lane
367 2), the treatment with PG (125 μ M) suppressed the expression of gD mRNA in the cells (lane 4).
368 Once again, the effect of GA could not be determined since β -actin RNA, the internal control,
369 was also absent. These results suggested that the decrease of gD proteins caused by PG was the
370 result of its impairment of gD mRNA expression in Vero cells.

371 **Effect of GA and PG on HSV-1 protein synthesis.** We also analyzed whether GA and PG
372 inhibition of HSV-1 replication was related to blocking the synthesis of proteins in Vero and
373 GMK AH1 cells. After cells have been treated with 125 μ M of each compound for 18h (1 cycle
374 of HSV-1 replication), the expression of viral γ proteins gD (61 kDa), gC (130 kDa) and ICP5

375 (154 kDa) and α protein ICP27 (63 kDa) in Vero cells was determined by Western blotting
376 analysis. As shown in Fig. 8, while uninfected cells (lane 1) did not express these proteins, all of
377 them were detectable in HSV-1 infected Vero cells (lane 2). Treatment with 125 μ M of GA (lane
378 3) and PG (lane 4) suppressed the expression of these proteins. Additionally, the effect of
379 compounds on the expression of viral γ proteins gB, gC and gE in GMK AH1 cells was
380 determined by an ELISA-based procedure. As shown in Table 2, both GA and PG presented
381 inhibitory effects, although in different degrees. PG presented IC₅₀ values at least 2.5 times lower
382 than GA, revealing its higher inhibitory effect against HSV-1 proteins synthesis. These results
383 suggest that GA and PG inhibit HSV-1 replication, in part, through the blockage of viral proteins
384 synthesis.

385 **Combined effect of GA, PG and ACV on viral replication.** In order to evaluate the possible
386 synergism among compounds and acyclovir, drug combination assays were performed with
387 combinations of GA, PG and ACV in various concentrations in a fixed ratio. The analyses were
388 done using the software MacSynergy II through a three-dimensional analytical method. Our
389 results demonstrated that the combined treatment with GA/PG, GA/ACV or PG/ACV presented
390 no significant interaction (data not shown).

391

392

393

394

395

396

397 **DISCUSSION**

398 In a previous study from our group, the antiviral activity of GA and its alkyl esters (gallates)
399 against HSV-1, strains KOS and 29R, was described (38). Although structure-relationships
400 regarding the antiviral, antioxidant and genotoxic effects were proposed, the mechanism of the
401 antiherpetic activity was not determined (38). Accordingly, in the present study, extemporaneous
402 preparations (in contrast with our previous study) of GA and 15 gallates were screened for their
403 in vitro anti-HSV-1 activity, and the best candidates had their mechanism of action studied. The
404 extemporaneous preparation was employed to minimize the possible degradation of compounds
405 in aqueous media stock solutions.

406 The screening process initiate with the evaluation of cytotoxic effects of compounds in Vero cells
407 followed by the determination of their antiviral activity by MTT assay. While cytotoxicity
408 increased along with the number of carbons in the alkyl moiety, GA and gallates with as much as
409 five carbons in the alkyl chain presented the optimum anti-HSV-1 activity (higher SI values)
410 among the evaluated compounds, and therefore, their anti-HSV-1 activity was confirmed by a
411 plaque reduction assay, in which, GA and PG were chosen due to their higher percentages of
412 HSV-1 inhibition at 125 μ M (Fig. 2).

413 In the present study, we clarified the mechanism of the HSV-1 inhibition of GA and PG. The first
414 step was the evaluation of the interference of compounds on viral infectivity. Even though GA
415 did not present virucidal activity, the treatment with PG for 2h at 37°C reduced the virus titre in
416 99.9 \pm 0.1% in a cell-free system. The direct virucidal activity was also found in other gallate
417 derivatives, such as epigallocatechin-3-gallate and octyl gallate (45, 48).

418 The pretreatment of cells with GA and PG did not affect viral multiplication, thus, neither GA
419 nor PG possess in vitro prophylactic effect on HSV-1 infection. However, the addition of GA and
420 PG concomitantly with virus, in specific conditions, revealed that both compounds affect virus

421 attachment and entry into cells (Fig. 4 and 5). These observations suggest that GA and PG affect
422 the virus infection process not through the binding to membrane molecules, but possibly
423 detaching viruses that have already bound to cell, perhaps by disturbance of viral glycoproteins
424 (11).

425 We found that GA and PG suppressed ICP27 protein synthesis in Vero cells. Since no inhibition
426 of its mRNA expression was detected, the mechanism by which compounds suppresses ICP27
427 synthesis remains unknown. ICP27 plays important roles in the post-transcription processing of
428 RNA, and acts as a γ RNA transporter from nucleus to cytoplasm, regulating the synthesis of γ
429 proteins (31, 36, 44, 52). Accordingly, we found that the production of gB, gC, gD, gE and ICP5
430 proteins was attenuated in infected cells treated with 125 μ M of GA and PG (Fig. 8 and Table 2).
431 These results suggested that the antiviral activity of GA and PG may be in part related to the low
432 levels of viral proteins, however, the protein synthesis impairment cannot be fully understood,
433 since, in despite of ICP27 depletion, the addition of tested compounds 12h post-infection still
434 inhibited HSV-1 replication, and the decreased expression of gD mRNA was detected only in PG
435 treated cells but not in those GA treated (Fig. 7).

436 Additionally, we examined the effect of compounds on the HSV-1 DNA synthesis. While PG
437 presented no effect, GA seemed to inhibited HSV-1 DNA synthesis, although its effect could not
438 be determined since β -actin amplicon, the internal control, was also absent. These results
439 suggested that the antiherpetic activity of compounds is not related to impairment of HSV-1
440 DNA synthesis in Vero cells. In order to find an explanation, the viability of infected Vero cells
441 treated with GA was evaluated by a trypan blue dye exclusion method. The results showed that
442 viability was not substantially affected when compared to untreated infected controls (data not
443 shown). In a further attempt, genotoxicity of GA and PG in Vero cells was evaluated by a

444 micronucleus assay, as previously described (2). While PG did not induce genotoxicity, the
445 results showed that concentrations as low as 31.2 μ M of GA induced an increase in the number of
446 micronucleated cells when compared to controls (data not shown). Therefore, we believe that
447 DNA damage induced by GA may explain the failure of the amplification of β -actin and/or HSV-
448 1 genes, since its ability to induce DNA damage is already described (38, 53).

449 During the course of our studies, Uozaki et al. (48) described the pronounced anti-HSV-1 activity
450 of octyl gallate, its ability to induce the death of infected cells, and its inhibitory effect against
451 RNA viruses. In their study, the antiviral activity and cytotoxicity increased along with the alkyl
452 moiety, reaching its maximum at carbon 12 (dodecyl gallate), although octyl gallate showed a
453 marked antiviral activity with a relatively moderate cytotoxicity. In our study, the cytotoxicity
454 presented a similar profile, although the antiviral activity was found only in gallates with as much
455 as 7 carbons in the alkyl moiety. The discrepancy between the studies may come from the
456 different way in which antiviral activity was evaluated, as already supposed by the authors, when
457 referring to our previous work (38).

458 The results shown here indicated that GA and PG suppressed HSV-1 replication in Vero and
459 GMK AH1 cells (both African green monkey kidney cells) at multiple stages of virus infection,
460 as also observed in other studies on the antiviral activity of gallate-related compounds (10, 48) or,
461 for instance, tannins (11, 30).

462 From the present results, we hypothesize that the impairment of HSV-1 replication in GA- and
463 PG-treated Vero/GMK AH1 cells, at least in part, was related to (a) reduced viral infectivity
464 (only PG), (b) inhibition of virus attachment and entry to cells, (c) impaired levels of viral capsid
465 protein ICP5, α protein ICP27 and envelope proteins gB, gC, gD and gE, (d) interference with
466 gD protein synthesis due to blockage of gD mRNA synthesis (only PG). Although the

467 combination of GA and PG with acyclovir resulted in no interaction, the detected multiple modes
468 of action of both compounds suggest that further studies are merited.

469

470

471

472

473

474

475

476 **ACKNOWLEDGMENTS**

477

478 This study was partially supported by a grant from CNPq/MCT/Brazil (project number
479 472748/2004-1).

480 R. J. Nunes, R. A. Yunes, C. R. M. Barardi and C. M. O. Simões are grateful to CNPq for their
481 research fellowships. J. M. Kratz, C. R. Andrighetti-Fröhner, D. J. Kolling and P. C. Leal
482 acknowledged their graduate and undergraduate research fellowships from CNPq/MCT/Brazil
483 and CAPES/MEC/Brazil.

484

485

486

487

488

489

490

491 **REFERENCES**

492

- 493 1. **Ahn, M. J., Kim, C. Y., Lee, J. S., Kim, T. G., Kim, S. H., Lee, C. K., Lee, B. B., Shin, C.**
494 **G., Huh, H. and Kim, J.** 2002. Inhibition of HIV-1 integrase by galloyl glucoses from
495 *Terminalia chebula* and flavonol glycoside gallates from *Euphorbia pekinensis*. *Planta Med.*
496 **68**:457-459.
- 497 2. **Andrighetti-Frohner, C. R., Kratz, J. M., Antonio, R. V., Creczynski-Pasa, T. B.,**
498 **Barardi, C. R. and Simões, C. M.** 2006. In vitro testing for genotoxicity of violacein
499 assessed by Comet and Micronucleus assays. *Mutat. Res.* **603**:97-103.
- 500 3. **Azmi, A. S., Bhat, S. H., Hanif, S. and Hadi, S. M.** 2006. Plant polyphenols mobilize
501 endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: a
502 putative mechanism for anticancer properties. *FEBS Lett.* **580**:533-538.
- 503 4. **Bastianetto, S., Yao, Z. X., Papadopoulos, V. and Quirion, R.** 2006. Neuroprotective
504 effects of green and black teas and their catechin gallate esters against beta-amyloid-induced
505 toxicity. *Eur. J. Neurosci.* **23**:55-64.
- 506 5. **Bettega, J. M., Teixeira, H., Bassani, V. L., Barardi, C. R. and Simoes, C. M.** 2004.
507 Evaluation of the antiherpetic activity of standardized extracts of *Achyrocline satureioides*.
508 *Phytother. Res.* **18**:819-823.
- 509 6. **Brady, R. C. and Bernstein, D. J.** 2004. Treatment of herpes simplex virus infections.
510 *Antiviral Res.* **61**:73-81.
- 511 7. **Burleson, F. G., Chamberts, T. M. and Wiedbrauk, D. L.** 1992. *Virology: a laboratory*
512 *manual.* Academic Press, San Diego, CA.
- 513 8. **Cassady, K. A. and Whitley, R. J.** 1997. New therapeutic approaches to the
514 alpha herpesvirus infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **39**:119-128.

- 515 9. **Celum, C. L.** 2004. The interaction between herpes simplex virus and human
516 immunodeficiency virus. *Herpes*. **11**:36-45.
- 517 10. **Cheng, H. Y., Lin, T. C., Ishimaru, K., Yang, C. M., Wang, K. C. and Lin, C. C.** 2003. In
518 vitro antiviral activity of prodelfinidin B-2 3,3'-di-O-gallate from *Myrica rubra*. *Planta*
519 *Med.* **69**:953-956.
- 520 11. **Cheng, H. Y., Lin, T. C., Yang, C. M., Wang, K. C., Lin, L. T. and Lin, C. C.** 2004.
521 Putranjivain A from *Euphorbia jolkini* inhibits both virus entry and late stage replication of
522 herpes simplex virus type 2 in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**:577-583.
- 523 12. **De Clercq, E.** 2005. Antiviral drug discovery and development: where chemistry meets with
524 biomedicine. *Antiviral Res.* **67**:56-75.
- 525 13. **Delsol, G., Lamant, L., Mariame, B., Pulford, K., Dastugue, N., Brousset, P., Rigal-**
526 **Huguet, F., al Saati, T., Cerretti, D. P., Morris, S. W. and Mason, D. Y.** 1997. A new
527 subtype of large B-cell lymphoma expressing the ALK kinase and lacking the 2; 5
528 translocation. *Blood*. **89**:1483-1490.
- 529 14. **Field, H. J.** 2001. Herpes simplex virus antiviral drug resistance - current trends and future
530 prospects. *J. Clin. Virol.* **21**:261-269.
- 531 15. **Fiuza, S. M., Gomes, C., Teixeira, L. J., Girao da Cruz, M. T., Cordeiro, M. N.,**
532 **Milhazes, N., Borges, F. and Marques, M. P.** 2004. Phenolic acid derivatives with potential
533 anticancer properties--a structure-activity relationship study. Part 1: methyl, propyl and octyl
534 esters of caffeic and gallic acids. *Bioorg. Med. Chem.* **12**:3581-3589.
- 535 16. **Frey, C., Pavani, M., Cordano, G., Munoz, S., Rivera, E., Medina, J., Morello, A., Diego**
536 **Maya, J. and Ferreira, J.** 2006. Comparative cytotoxicity of alkyl gallates on mouse tumor
537 cell lines and isolated rat hepatocytes. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*
538 doi:10.1016/j.cbpa.2006.03.007.

- 539 17. **Fujita, K. and Kubo, I.** 2002. Antifungal activity of octyl gallate. *Int. J. Food Microbiol.*
540 **79**:193-201.
- 541 18. **Gong, Y., Raj, K. M., Luscombe, C. A., Gadawski, I., Tam, T., Chu, J., Gibson, D.,**
542 **Carlson, R. and Sacks, S. L.** 2004. The synergistic effects of betulin with acyclovir against
543 herpes simplex viruses. *Antiviral Res.* **64**:127-130.
- 544 19. **Holland, T. C., Homma, F. L., Marlin, S. D., Levine, M. and Glorioso, J.,** 1984. Herpes
545 simplex virus type 1 glycoprotein C-negative mutants exhibit multiple phenotypes, including
546 secretion of truncated glycoproteins. *J. Virol.* **52**:566-574.
- 547 20. **Kane, C. J., Menna, J. H., Sung, C. C. and Yeh, Y. C.** 1988. Methyl gallate, methyl-3,4,5-
548 trihydroxybenzoate, is a potent and highly specific inhibitor of herpes simplex virus in vitro.
549 II. Antiviral activity of methyl gallate and its derivatives. *Biosci. Rep.* **8**:95-102.
- 550 21. **Karaca, G., Hargett, D., McLean, T. I., Aguilar, J. S., Ghazal, P., Wagner, E. K. and**
551 **Bachenheimer, S. L.** 2004. Inhibition of the stress-activated kinase, p38, does not affect the
552 virus transcriptional program of herpes simplex virus type 1. *Virology.* **329**:142-156.
- 553 22. **Karger, A. and Mettenleiter, T. C.** 1993. Glycoproteins gIII and gp50 play dominant roles
554 in the biphasic attachment of pseudorabies virus. *Virology.* **194**:654-664.
- 555 23. **Kitagawa, S., Nabekura, T., Kamiyama, S., Takahashi, T., Nakamura, Y., Kashiwada,**
556 **Y. and Ikeshiro, Y.** 2005. Effects of alkyl gallates on P-glycoprotein function. *Biochem.*
557 *Pharmacol.* **70**:1262-1266.
- 558 24. **Kubo, I., Fujita, K. and Nihei, K.** 2002. Anti-Salmonella activity of alkyl gallates. *J. Agric.*
559 *Food Chem.* **50**:6692-6696.
- 560 25. **Kubo, I., Fujita, K., Nihei, K. and Masuoka, N.** 2003. Non-antibiotic antibacterial activity
561 of dodecyl gallate. *Bioorg. Med. Chem.* **11**:573-580.

- 562 26. **Kubo, I., Fujita, K., Nihei, K. and Nihei, A.** 2004. Antibacterial activity of alkyl gallates
563 against *Bacillus subtilis*. *J. Agric. Food Chem.* **52**:1072-1076.
- 564 27. **Kubo, I., Masuoka, N., Xiao, P. and Haraguchi, H.** 2002. Antioxidant activity of dodecyl
565 gallate. *J. Agric. Food Chem.* **50**:3533-3539.
- 566 28. **Kubo, I., Xiao, P. and Fujita, K.** 2002. Anti-MRSA activity of alkyl gallates. *Bioorg. Med.*
567 *Chem. Lett.* **12**:113-116.
- 568 29. **Kuo, Y. C., Chen, C. C., Tsai, W. J. and Ho, Y. H.** 2001. Regulation of herpes simplex
569 virus type 1 replication in Vero cells by *Psychotria serpens*: relationship to gene expression,
570 DNA replication, and protein synthesis. *Antiviral Res.* **51**:95-109.
- 571 30. **Kuo, Y. C., Lin, L. C., Tsai, W. J., Chou, C. J., Kung, S. H. and Ho, Y. H.** 2002.
572 Samarangenin B from *Limonium sinense* suppresses herpes simplex virus type 1 replication in
573 Vero cells by regulation of viral macromolecular synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.*
574 **46**:2854-2864.
- 575 31. **Larralde, O., Smith, R. W., Wilkie, G. S., Malik, P., Gray, N. K. and Clements, J. B.**
576 2006. Direct stimulation of translation by the multifunctional herpesvirus ICP27 protein. *J.*
577 *Virol.* **80**:1588-1591.
- 578 32. **Murase, T., Kume, N., Hase, T., Shibuya, Y., Nishizawa, Y., Tokimitsu, I. and Kita, T.**
579 1999. Gallates inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF-kappaB and expression
580 of leukocyte adhesion molecules in vascular endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc.*
581 *Biol.* **19**:1412-1420.
- 582 33. **Olofsson, S., Bolmstedt, A., Biller, M., Mardberg, K., Leckner, J., Malmstrom, B. G.,**
583 **Trybala, E. and Bergstrom, T.** 1999. The role of a single N-linked glycosylation site for a
584 functional epitope of herpes simplex virus type 1 envelope glycoprotein gC. *Glycobiology.*
585 **9**:73-81.

- 586 34. **Ow, Y. Y. and Stupans, I.** 2003. Gallic acid and gallic acid derivatives: effects on drug
587 metabolizing enzymes. *Curr. Drug Metab.* **4**:241-248.
- 588 35. **Prichard, M. N., Prichard, L. E. and Shipman, C., Jr.** 1993. Strategic design and three-
589 dimensional analysis of antiviral drug combinations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:540-
590 545.
- 591 36. **Roizman, B., Gu, H. and Mandel, G.** 2005. The first 30 minutes in the life of a virus:
592 unREST in the nucleus. *Cell Cycle.* **4**:1019-1021.
- 593 37. **Sambrook, R. and Russel, D. W.** 2001. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 3rd ed.
594 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.
- 595 38. **Savi, L. A., Leal, P. C., Vieira, T. O., Rosso, R., Nunes, R. J., Yunes, R. A., Creczynski-**
596 **Pasa, T. B., Barardi, C. R. and Simões, C. M.** 2005. Evaluation of anti-herpetic and
597 antioxidant activities, and cytotoxic and genotoxic effects of synthetic alkyl-esters of gallic
598 acid. *Arzneimittelforschung.* **55**:66-75.
- 599 39. **Schmidtke, M., Karger, A., Meerbach, A., Egerer, R., Stelzner, A. and Makarov, V.**
600 2003. Binding of a N,N'-bisheteryl derivative of dispirotripiperazine to heparan sulfate
601 residues on the cell surface specifically prevents infection of viruses from different families.
602 *Virology.* **311**:134-143.
- 603 40. **Schnipper, L. E., Lewin, A. A., Swartz, M. and Crumpacker, C. S.** 1980. Mechanisms of
604 photodynamic inactivation of herpes simplex viruses: comparison between methylene blue,
605 light plus electricity, and hematoporphyrin plus light. *J. Clin. Invest.* **65**:432-438.
- 606 41. **Simões, C. M., Amoros, M. and Girre, L.** 1999. Mechanism of antiviral activity of
607 triterpenoid saponins. *Phytother. Res.* **13**:323-328.
- 608 42. **Sjogren-Jansson, E. and Jeansson, S.** 1985. Large-scale production of monoclonal
609 antibodies in dialysis tubing. *J. Immunol. Methods.* **84**:359-64.

- 610 43. **Sjogren-Jansson, E. and Jeansson, S.** 1990. Growing hybridomas in dialysis tubing:
611 optimization of the technique, p. 41-50. *In* H. Zola (ed.), Laboratory Methods in
612 Immunology. CRC press, Boca Raton, FL.
- 613 44. **Smith, R. W., Malik, P. and Clements, J. B.** 2005. The herpes simplex virus ICP27 protein:
614 a multifunctional post-transcriptional regulator of gene expression. *Biochem. Soc. Trans.*
615 **33**:499-501.
- 616 45. **Song, J. M., Lee, K. H. and Seong, B. L.** 2005. Antiviral effect of catechins in green tea on
617 influenza virus. *Antiviral Res.* **68**:66-74.
- 618 46. **Stapleton, P. D., Shah, S., Anderson, J. C., Hara, Y., Hamilton-Miller, J. M. and Taylor,**
619 **P. W.** 2004. Modulation of beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and
620 gallates. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **23**:462-467.
- 621 47. **Takeuchi, H., Baba, M. and Shigeta, S.** 1991. An application of tetrazolium (MTT)
622 colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. *J. Virol.*
623 *Methods.* **33**:61-71.
- 624 48. **Uozaki, M., Yamasaki, H., Katsuyama, Y., Higuchi, M., Higuti, T. and Koyama, A. H.**
625 2006. Antiviral effect of octyl gallate against DNA and RNA viruses. *Antiviral Res.*
626 doi:10.1016/j.antiviral.2006.07.010.
- 627 49. **van der Heijden, C. A., Janssen, P. J. and Strik, J. J.** 1986. Toxicology of gallates: a
628 review and evaluation. *Food Chem. Toxicol.* **24**:1067-1070.
- 629 50. **Veluri, R., Singh, R. P., Liu, Z., Thompson, J. A., Agarwal, R. and Agarwal, C.** 2006.
630 Fractionation of grape seed extract and identification of gallic acid as one of the major active
631 constituents causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate
632 carcinoma cells. *Carcinogenesis.* **27**:1445-1453.

633 51. **White, D. O. and Fenner, F. J.** 1994. Medical Virology, 4th ed. Academic Press, San
634 Diego, CA.

635 52. **Whitley, R.J. and Roizman, B.** 2001. Herpes simplex virus infections. Lancet. **357**:1513-
636 1518.

637 53. **Yoshino, M., Haneda, M., Naruse, M., Htay, H. H., Iwata, S., Tsubouchi, R. and**
638 **Murakami, K.** 2002. Prooxidant action of gallic acid compounds: copper-dependent strand
639 breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. Toxicol. In Vitro.
640 **16**:705-709.

641

642

643

644

645

646

647

648

649

650

651

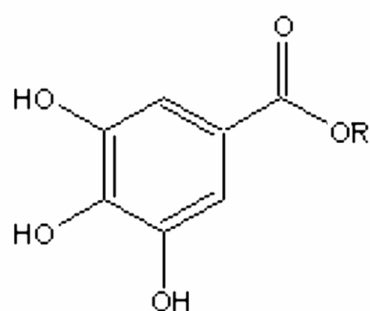
652

653

654

655

656



	R	Compound
1	H	Gallic Acid
2	CH ₃	Methyl gallate
3	C ₂ H ₅	Ethyl gallate
4	C ₃ H ₇	Propyl gallate
5	C ₄ H ₉	Butyl gallate
6	C ₅ H ₁₁	Pentyl gallate
7	C ₆ H ₁₃	Hexyl gallate
8	C ₇ H ₁₅	Heptyl gallate
9	C ₈ H ₁₇	Octyl gallate
10	C ₉ H ₁₉	Nonyl gallate
11	C ₁₀ H ₂₁	Decyl gallate
12	C ₁₁ H ₂₃	Undecyl gallate
13	C ₁₂ H ₂₅	Dodecyl gallate
14	C ₁₄ H ₂₉	Tetradecyl gallate
15	C ₁₆ H ₃₃	Hexadecyl gallate
16	C ₁₈ H ₃₇	Octadecyl gallate

657

658 **Figure 1.** Chemical structures of gallic acid and its n-alkyl esters (gallates).

659

660

661

662

663

664

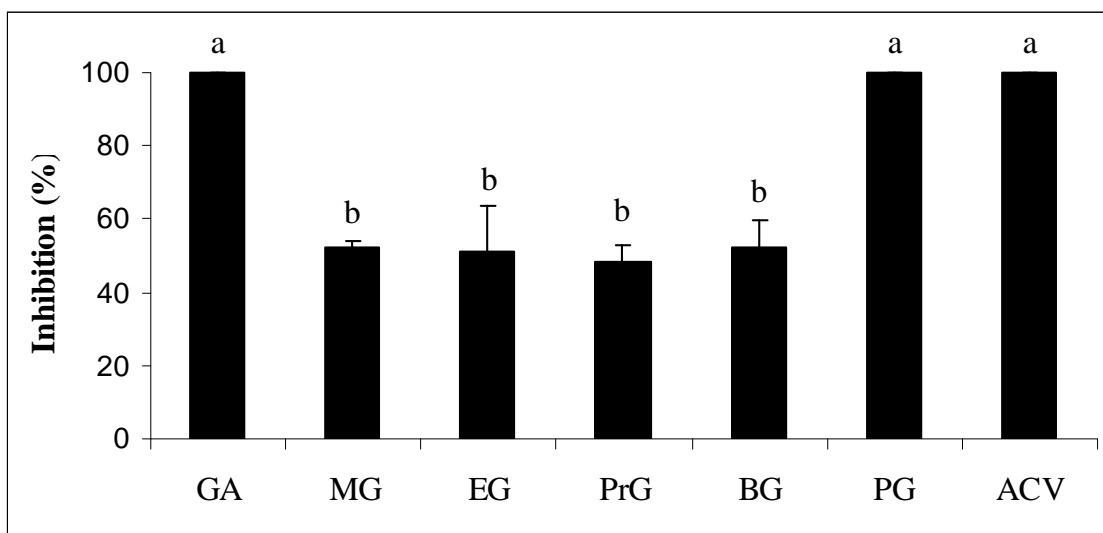
665

666

667

668

669



670

671 Figure 2. Effects of 125 μ M of gallic acid (GA), methyl gallate (MG), ethyl gallate (EG), propyl
672 gallate (PrG), butyl gallate (BG), pentyl gallate (PG) and acyclovir (ACV – 10 μ M) on HSV-1
673 replication in Vero cells determined by plaque reduction assay. Each bar represents the mean \pm
674 standard deviation of three independent experiments. ANOVA/SNK tests were carried out as
675 described in Materials and Methods. Different letters indicate significant statistical differences
676 among groups ($p < 0.05$).

677

678

679

680

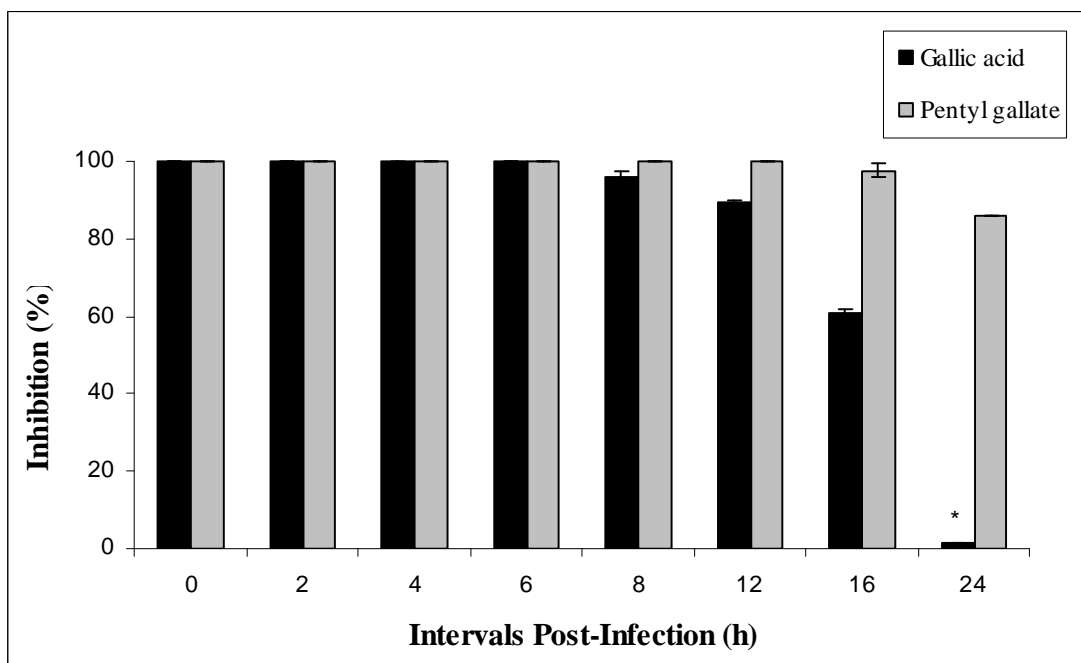
681

682

683

684

685



686

687 Figure 3. Kinetics of inhibition of HSV-1 replication by gallic acid (GA) and pentyl gallate (PG).

688 Vero cells (2.5×10^5) were infected with HSV-1 at a MOI of 0.1 and GA or PG ($125 \mu\text{M}$) were

689 added at the indicated times. Cells supernatants were collected at 25h post-infection and HSV-1

690 titers were determined as described in Materials and Methods. Each bar represents the mean \pm

691 standard deviation of three independent experiments. * No significant differences between test

692 sample and virus control (Student's t test; $p > 0.05$).

693

694

695

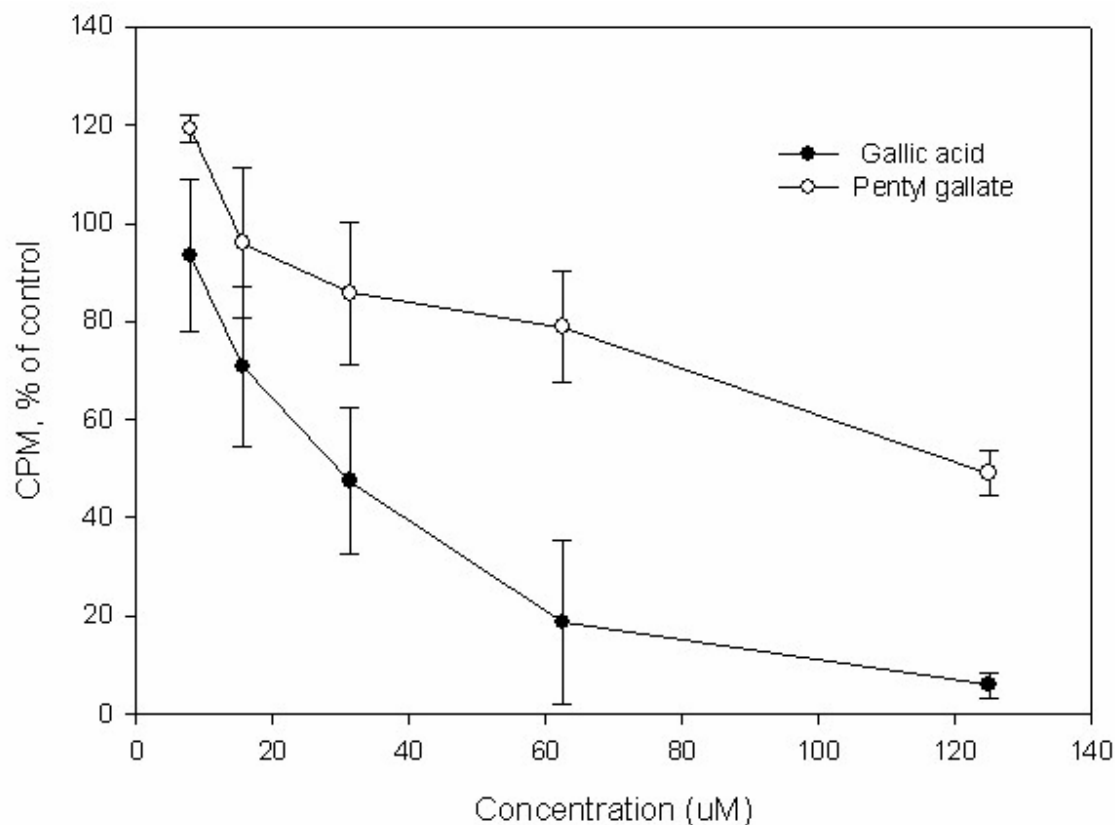
696

697

698

699

700



701

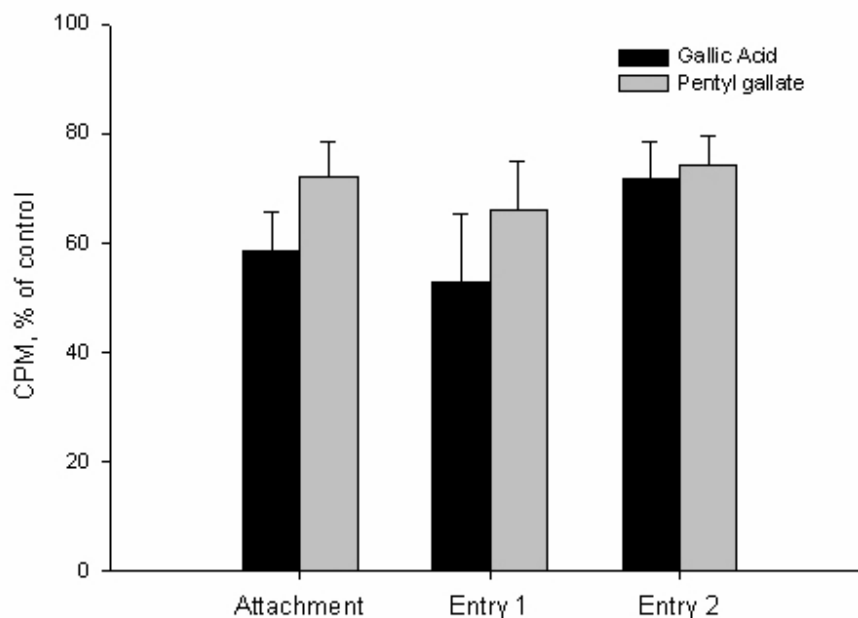
702 Figure 4. Effect of gallic acid (GA) and pentyl gallate (PG) on HSV-1 attachment to GMK AH1
703 cells. Mixtures of each compound and purified radiolabelled HSV-1 were incubated for 15 min at
704 37°C prior to the addition to cells. After the virus adsorption for 2h at 4°C, cells were washed and
705 then lysed with 5% SDS to quantify radioactivity. The results are expressed as a percentage of the
706 average number of counts per minute (CPM) found with compound-treated virus relative to
707 mock-treated controls. Values shown are the means of four determinations from two separate
708 experiments \pm standard deviation.

709

710

711

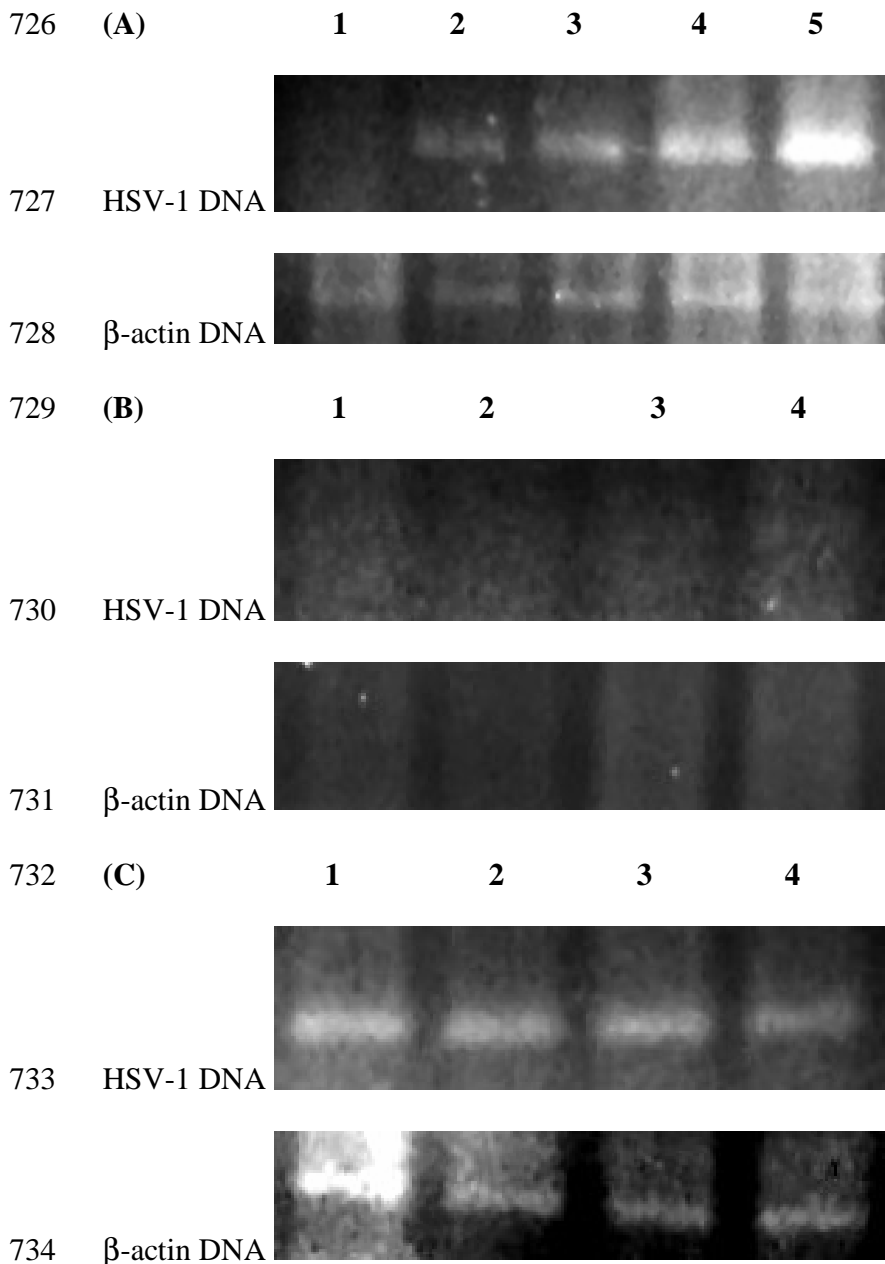
712



713

714 Figure 5. Effect of gallic acid (GA) and pentyl gallate (PG) on HSV-1 entry into GMK AH1
715 cells. Mixtures of each compound (125 μ M) and radiolabelled HSV-1 were incubated for 15 min
716 at 37°C prior to the addition to and incubation with cells for 3 h at 37°C. The cells in some wells
717 were harvested by lysis with SDS and subjected to quantification of radioactivity (attachment
718 column). The cells in remaining wells were washed with citrate-buffered saline (pH 3), then
719 treated with pronase and half of the volume of detached cells were lysed to quantify 3 H label
720 (entry 1). The remaining cells were treated with 1% NP40 solution to quantify radioactivity in the
721 nuclear fraction (entry 2). The results are expressed as a percentage of the average number of
722 counts per minute (CPM) found with compound-treated virus relative to mock-treated controls.
723 Values shown are the means of four determinations from two separate experiments \pm standard
724 deviation.

725



735

736 Figure 6. Effects of 125 μ M of gallic acid (GA) and pentyl gallate (PG) on HSV-1 DNA
 737 synthesis in Vero cells detected by PCR. Vero cells (2×10^6) were infected with HSV-1 (MOI
 738 0.1) or were not infected in the presence or absence of GA or PG. The cells were harvested at 2,
 739 4, 8 and 16h post-infection and total DNA was extracted with phenol-chloroform. The PCR was

740 done as described in Materials and Methods. Following the reaction, the amplified product was
741 run on a 1% agarose gel. **(A)** DNA extracted from uninfected Vero cells at 16 post-infection (lane
742 1) or from HSV-1 infected cells at 2, 4, 8 and 16h post-infection (lanes 2 to 5, respectively). **(B)**
743 DNA extracted at 2, 4, 8 and 16h (lanes 1 to 4, respectively) post-infection from HSV-1 infected
744 Vero cells treated with 125 μ M of GA. **(C)** DNA extracted at 2, 4, 8 and 16h (lanes 1 to 4,
745 respectively) post-infection from HSV-1 infected Vero cells treated with 125 μ M of PG.

746

747

748

749

750

751

752

753

754

755

756

757

758

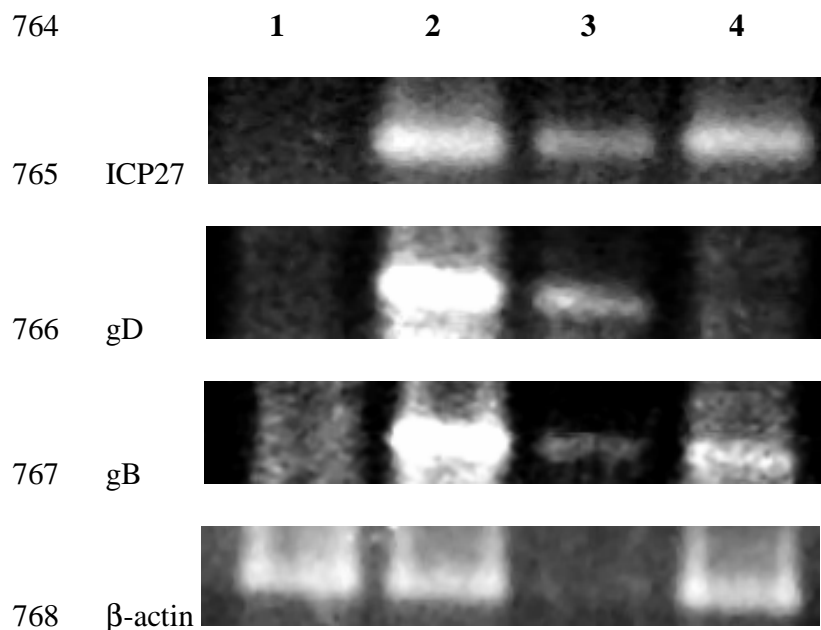
759

760

761

762

763



770 Figure 7. Effects of 125 μ M of gallic acid (GA) and pentyl gallate (PG) on HSV-1 gene
771 expression in Vero cells detected by RT-PCR. Vero cells (2×10^6) were infected with HSV-1
772 (MOI 0.1) or were not infected in the presence or absence of GA or PG. The cells were harvested
773 at 8h post-infection and total RNA was extracted with Trizol®. The synthesis of first-strand
774 cDNA and the PCR were done as described in Materials and Methods. **Lane 1**, uninfected Vero
775 cells; **lane 2**, HSV-1 infected Vero cells in the absence of compounds; **lane 3-4**, HSV-1 infected
776 Vero cells treated with 125 μ M of AG and PG, respectively.

777

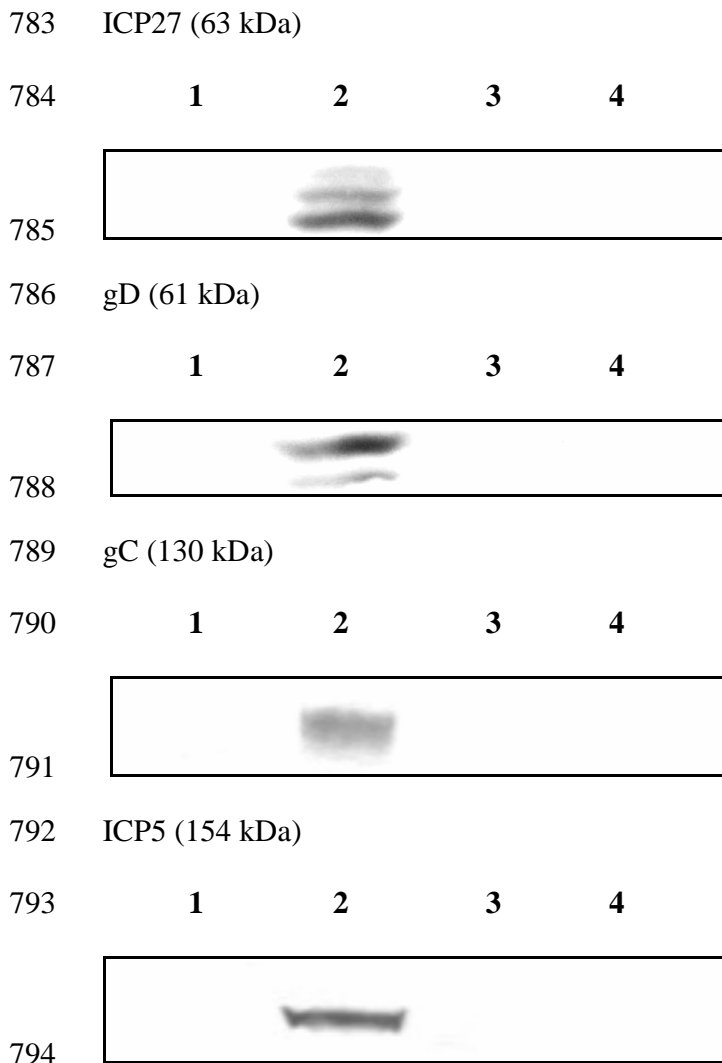
778

779

780

781

782



795 Figure 8. Effects of 125 μ M of gallic acid (GA) and pentyl gallate (PG) on HSV-1 protein
 796 synthesis in Vero cells detected by Western blotting analysis. Vero cells (6×10^5) were infected
 797 with HSV-1 (MOI 0.1) or were not infected in the presence or absence of GA or PG. Lysates
 798 ($\sim 50 \mu$ g of protein) were collected at 18h post-infection and run on an SDS-10% PAGE gel and
 799 analyzed by immunoblotting with an anti-ICP27, -gD, -gC-, -ICP5 antibodies. **Lane 1**, uninfected
 800 Vero cells; **lane 2**, HSV-1 infected Vero cells; **lane3**, HSV-1 infected Vero cells treated with GA;
 801 **lane 4**, HSV-1 infected Vero cells treated with PG.
 802

803 Table 1. Anti-HSV-1 effect, cytotoxicity and selectivity indices of gallates on Vero cells
 804 determined by MTT assay.

Compound	Cytotoxicity CC ₅₀ (μM) ^a	Antiviral Activity IC ₅₀ (μM) ^a	Selectivity Index (SI) ^b
Gallic acid	668.7 ± 54.4	17.1 ± 1.9	39.1
Methyl Gallate	>1000	288.5 ± 25.4	>3.5
Ethyl Gallate	893.9 ± 107.2	142.1 ± 0.8	6.3
Propyl Gallate	713.2 ± 153.1	141.2 ± 16.4	5.1
Butyl Gallate	361.6 ± 92.8	67.5 ± 3.5	5.4
Pentyl Gallate	268.7 ± 45.2	29.1 ± 4.1	9.2
Hexyl Gallate	56.6 ± 5.7	37.3 ± 6.1	1.5
Heptyl Gallate	31.1 ± 2.3	16.0 ± 4.2	1.9
Octyl Gallate	17.6 ± 1.6	<50% ^c	-
Nonyl Gallate	36.5 ± 3.3	15.0 ± 6.3	2.4
Decyl Gallate	17.4 ± 1.0	<50%	-
Undecyl Gallate	15.4 ± 1.9	<50%	-
Dodecyl Gallate	19.3 ± 2.7	<50%	-
Tetradecyl Gallate	35.5 ± 6.7	<50%	-
Hexadecyl Gallate	74.8 ± 22.6	<50%	-
Octadecyl Gallate	>1000	230.5 ± 46.7	>4.3

805

806 ^a Values represent the mean ± SD for three independent experiments.

807 ^b SI is the ratio of CC₅₀ and IC₅₀.

808 ^c Percentage of inhibition <50%, thus the SI values were not calculated.

809 CC₅₀ was the concentration that showed 50% cellular cytotoxic effect and IC₅₀ was the
 810 concentration that inhibited 50% of HSV-1 multiplication.

811

812 Table 2. Effects of gallic acid and pentyl gallate on HSV-1 protein synthesis in GMK AH1 cells
813 determined by ELISA.

814

Protein	Gallic acid IC ₅₀ (μM) ^a	Pentyl gallate IC ₅₀ (μM)
gB	22.9 ± 7.4% ^b	65.6 ± 7.2
gC	135.0 ± 33.8	44.7 ± 9.9
gE	127.9 ± 16.8	51.4 ± 11.1

815

816 ^a Values represent the mean ± SD for three independent experiments. IC₅₀ was the concentration
817 that inhibited 50% of absorbance in comparison to untreated controls.

818 ^b % of inhibition < 50%, consequently the IC₅₀ value was not calculated.

819

820

821

822

823

824

825

826

827

828

829

5 DISCUSSÃO

Nosso grupo de trabalho, em um estudo anterior, descreveu a atividade antiviral do ácido gálico (AG) e de seus ésteres n-alquílicos (galatos) contra o HSV-1, cepas KOS e 29R (SAVI et al., 2005). Embora relações estrutura-atividade tenham sido propostas no que se refere a sua atividade antiviral, antioxidante e genotóxica, o seu mecanismo de ação anti-herpética não foi descrito (SAVI et al., 2005). Tendo em vista este fato, no presente estudo a atividade anti-HSV-1 *in vitro* de preparações extemporâneas do AG e de 15 galatos (Figura 1 do artigo) foi avaliada e os melhores candidatos tiveram seu mecanismo de ação estudado. Preparações extemporâneas foram utilizadas a fim de minimizar a possível degradação (oxidação) dos compostos nas soluções-estoque em meio aquoso.

O processo de triagem teve início com a avaliação da citotoxicidade dos compostos frente a células Vero e foi seguido da avaliação da atividade antiviral, ambas realizadas através do ensaio colorimétrico do MTT. A citotoxicidade aumentou em função do número de carbonos na cadeia alquílica, sendo que o AG e os galatos com até cinco carbonos na cadeia alquílica apresentaram atividade antiviral promissora (índices de seletividade superiores aos demais) (Tabela 1 do artigo). Assim, a atividade anti-HSV-1 desses compostos foi confirmada através do ensaio de redução de placas de lise, no qual o AG e o galato de pentila (GP) foram selecionados para continuar os estudos, devido aos altos percentuais de inibição da replicação do HSV-1 na concentração de 125 μ M (Figura 2 do artigo).

No presente trabalho, está descrito o mecanismo da ação anti-herpética do AG e do GP. O primeiro passo foi a avaliação da interferência dos compostos sobre a infectividade do vírus. Nesta etapa, cada composto foi misturado com o fluído viral e incubado por 2h a 37°C. Após o período de incubação, a mistura foi diluída (1:10) e titulada pelo ensaio de placas de lise. Embora o AG não tenha apresentado atividade virucida, o tratamento com GP por 2h a 37°C reduziu o título viral em 99.9% na ausência de células. A atividade virucida direta já foi relatada para outros compostos fenólicos, tais como o galato de 3-epigalocatequina e o galato de octila (SONG; LEE; SEONG, 2005; UOZAKI et al., 2006).

O pré-tratamento das células com AG ou GP por 3h antes da infecção não afetou a multiplicação do vírus, portanto, nem o AG nem o GP possuem efeito

profilático *in vitro* contra a infecção por HSV-1. Entretanto, a adição de AG e GP concomitantemente com o vírus, em condições específicas, revelou que ambos os compostos afetam a adsorção e a penetração dos vírus nas células (Figuras 4 e 5 do artigo). Estas observações, em conjunto, sugerem que o AG e o GP afetam o processo de infecção do vírus não através da ligação a moléculas da membrana celular, mas sim através do desligamento dos vírus que já haviam adsorvido às células, possivelmente interferindo com as glicoproteínas virais (CHENG et al., 2004).

Durante os estudos do mecanismo de ação, foi verificado que o AG e o GP suprimiram a síntese da proteína viral precoce ICP27 em células Vero através do ensaio de Western blotting. Já que nenhuma inibição da expressão de seu mRNA foi detectada, o mecanismo pelo qual o AG e GP inibem a síntese desta proteína continua desconhecido. A ICP27 desempenha importantes papéis no processamento pós-transcricional do RNA e atua como um transportador de RNAs tardios do núcleo para o citoplasma, desta forma regulando a expressão de proteínas virais tardias (WHITLEY; ROIZMAN, 2001; ROIZMAN; GU; MANDEL, 2005; SMITH; MALIK; CLEMENTS, 2005; LARRALDE et al., 2006). Foi também constatado que a produção das proteínas virais tardias gB, gC, gD, gE e ICP5 estava atenuada em células infectadas e tratadas com 125 µM de cada composto (Figura 6 e Tabela 2 do artigo).

Estes resultados sugeriram que a atividade antiviral do AG e do GP pode estar, ainda que em parte, relacionada com os baixos níveis de proteínas virais, entretanto, a interferência na síntese protéica não pôde ser totalmente esclarecida, uma vez que, não obstante a depleção da ICP27, a adição dos compostos 12h pós-infecção ainda inibiu a replicação viral (Figura 3 do artigo), e a expressão reduzida do mRNA da proteína gD foi detectada apenas nas células tratadas com o GP, e não nas tratadas com o AG (Figura 8 do artigo).

Adicionalmente, foram avaliados os efeitos dos dois compostos sobre a síntese do DNA viral (Figura 7 do artigo) através da PCR. Enquanto o GP não apresentou efeito, o AG pareceu inibir a síntese do DNA viral, entretanto, seu efeito não pôde ser determinado, pois o produto amplificado do gene da β -actina, o controle interno da reação de PCR, também estava ausente. Estes resultados sugeriram que a atividade anti-herpética dos compostos não está relacionada com a interferência sobre a síntese do DNA do HSV-1. A fim de se encontrar uma

explicação para o fato, a viabilidade de células Vero infectadas pelo HSV-1 e tratadas com 125 μM de AG foi avaliada através do ensaio de exclusão do corante Azul de Trypan. Os resultados mostraram que a viabilidade das células não foi substancialmente afetada quando comparada com controles infectados, porém não tratados (dados não mostrados). Em uma tentativa adicional, a genotoxicidade do AG e do GP frente a células Vero foi avaliada através do ensaio do micronúcleo, conforme metodologia descrita por Andrighetti-Fröhner e colaboradores (2006). O GP não foi genotóxico nas condições experimentais utilizadas, entretanto os resultados mostraram que, em concentrações iguais ou superiores a 31,2 μM de AG, ocorreu um aumento no número de células micronucleadas quando comparado com controles não tratados (dados não mostrados). Portanto, acredita-se que o dano ao DNA causado pelo AG possa explicar a falha na amplificação dos genes da β -actina e/ou do HSV-1, uma vez que esta capacidade do AG já foi descrita (YOSHINO et al., 2002; SAVI et al., 2005).

Durante a realização deste estudo, Uozaki e colaboradores (2006) descreveram a pronunciada atividade anti-HSV-1 do galato de octila, sua habilidade de induzir a morte de células infectadas, e seus efeitos inibitórios sobre vírus de RNA (VSV e poliovírus). Foi demonstrado que a citotoxicidade e a atividade antiviral aumentaram em função do número de carbonos na cadeia alquílica, atingindo seu máximo com 12 carbonos (galato de dodecila), sendo que o galato de octila apresentou uma atividade antiviral marcante com uma moderada citotoxicidade. Nesta dissertação, o perfil da citotoxicidade foi muito semelhante, entretanto a atividade antiviral foi encontrada nos galatos com até sete carbonos na cadeia alquílica. Esta discrepância entre os estudos está provavelmente relacionada com as diferentes formas de avaliação da atividade antiviral, como já foi suposto pelos próprios autores em seu estudo, quando discutem nosso trabalho anterior (SAVI et al., 2005).

Os resultados aqui mostrados indicaram que o AG e o GP inibiram a replicação do HSV-1 em células Vero e GMK AH1 (ambas células de rim de macaco verde da África) em múltiplos estágios da replicação viral, fato que já foi observado em outros estudos que avaliaram a atividade antiviral de outros compostos fenólicos (KUO et al., 2002; CHENG et al., 2003, 2004; UOZAKI et al., 2006).

A partir destes resultados, formulou-se a hipótese de que a interferência do AG e do GP sobre a replicação do HSV-1 em células Vero e GMK AH1 esteja, ao menos em parte, relacionada com:

- a redução da infectividade viral (apenas GP);
- inibição da adsorção e da penetração dos vírus nas células (ambos os compostos);
- diminuição dos níveis das proteínas virais ICP5, ICP27, gB, gC, gD e gE (ambos os compostos);
- interferência sobre a síntese da proteína gD, através do bloqueio da expressão do seu mRNA (apenas GP).

Embora os tratamentos concomitantes com AG/GP, AG/aciclovir e GP/aciclovir não tenham resultado em interação alguma, a interferência destes dois compostos (AG e GP) em várias etapas da replicação do HSV-1 sugere a importância de estudos adicionais.

6 CONCLUSÕES

- Das 16 amostras avaliadas, apenas o galato de metila (1C) e de octadecila (18C) não apresentaram citotoxicidade em células Vero e GMK AH1, nas concentrações avaliadas pelo ensaio do MTT. Em relação aos demais compostos, a citotoxicidade aumentou em função do número de carbonos na cadeia alquílica, atingindo o seu máximo com 11 carbonos (galato de undecila), enquanto que os compostos com cadeia mais longa foram gradualmente menos citotóxicos.
- Em relação à triagem da atividade anti-HSV-1 pelo ensaio do MTT, os compostos com até 7 carbonos na cadeia alquílica apresentaram atividade, com exceção dos galatos de nonila (9C) e de octadecila (18C), que também foram ativos, em diferentes níveis. Assim, foram selecionados, para terem sua atividade antiviral confirmada através do ensaio de redução de placas de lise, o ácido gálico e os galatos de metila (1C), etila (2C), propila (3C), butila (4C) e pentila (5C), pois esses apresentaram atividade antiviral superior aos demais.
- Na confirmação da atividade antiviral, através do ensaio de redução de placas de lise, o ácido gálico e o galato de pentila mostraram-se superiores aos demais, pois foram os únicos capazes de inibir completamente a replicação viral na concentração de 125 μ M, e, portanto, foram selecionados para o estudo do seu mecanismo de ação.
- Na avaliação da atividade virucida, apenas o galato de pentila mostrou-se ativo, reduzindo o título viral em 99,9 % na concentração de 125 μ M.
- Na avaliação da interferência dos compostos sobre a adsorção e penetração viral, ambos os compostos foram ativos, sendo que o ácido gálico apresentou atividade superior a do galato de pentila.
- Na avaliação da atividade antiviral em função do tempo, ambos os compostos inibiram completamente a replicação viral quando adicionados até 8h pós-infecção, entretanto, o ácido gálico perde sua atividade gradualmente nos intervalos posteriores. Adicionalmente, ambos os compostos não apresentaram efeito profilático sobre a infecção do HSV-1.

- Os tratamentos simultâneos com ácido gálico/galato de pentila, ácido gálico/aciclovir e galato de pentila/aciclovir não apresentaram sinergismo nem antagonismo.
- Na avaliação da interferência dos compostos sobre a síntese de proteínas virais, ambos apresentaram atividade sobre a síntese das proteínas ICP5, ICP27, gB, gC, gD e gE.
- Na avaliação da interferência dos compostos sobre a expressão gênica viral, apenas o galato de pentila mostrou-se ativo, inibindo a expressão do mRNA da glicoproteína viral gD.
- Na avaliação da interferência dos compostos sobre a síntese do DNA viral, ambos os compostos não apresentaram atividade.
- O mecanismo proposto da ação anti-herpética do AG e do GP é o seguinte: redução da infectividade viral (apenas GP); inibição da adsorção e penetração viral nas células (AG e GP); diminuição dos níveis da proteína do capsídeo viral ICP5, da proteína α ICP27 e das proteínas do envelope gB, gC, gD e gE (AG e GP); e interferência na síntese da proteína gD, através do bloqueio da síntese de seu mRNA (apenas GP).

REFERÊNCIAS

ABE, I.; SEKI, T.; NOGUCHI, H. Potent and selective inhibition of squalene epoxidase by synthetic galloyl esters. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.270, p.137-140, 2000.

AHN, M.J.; KIM, C.Y.; LEE, J.S.; KIM, T.G.; KIM, S.H.; LEE, C.K.; LEE, B.B.; SHIN, C.G.; HUH, H.; KIM, J. Inhibition of HIV-1 integrase by galloyl glucoses from *Terminalia chebula* and flavonol glycoside gallates from *Euphorbia pekinensis*. **Planta Medica**, v.68, p.457-459, 2002.

ALBINO, D.B.L. **Avaliação da atividade tripanocida de compostos fenólicos**. 2005. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

ANDRIGHETTI-FROHNER, C.R.; KRATZ, J.M.; ANTONIO, R.V.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; BARARDI, C.R.; SIMOES, C.M. In vitro testing for genotoxicity of violacein assessed by Comet and Micronucleus assays. **Mutation Research**, v.603, p.97-103, 2006.

AZMI, A.S.; BHAT, S.H.; HANIF, S.; HADI, S.M. Plant polyphenols mobilize endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: a putative mechanism for anticancer properties. **FEBS Letters**, v.580, p.533-538, 2006.

BAER-DUBOWSKA, W.; GNOJKOWSKI, J.; FENRYCH, W. Effect of tannic acid on benzo[a]pyrene-DNA adduct formation in mouse epidermis: comparison with synthetic gallic acid esters. **Nutrition and Cancer**, v.29, p.42-47, 1997.

BASTIANETTO, S.; YAO, Z.X.; PAPADOPOULOS, V.; QUIRION, R. Neuroprotective effects of green and black teas and their catechin gallate esters against beta-amyloid-induced toxicity. **European Journal of Neuroscience**, v.23, p.55-64, 2006.

BIENZ, K.A. General virology. In: KAYSER, F.H.; BIENZ, K.A.; ECKERT, J.; ZINKERNAGEL, R.M. (eds.) **Medical Microbiology**. Berlin: Georg Thieme Verlag, 2005.

BOEHMER, P.E.; LEHMAN I.R. Herpes simplex virus DNA replication. **Annual Reviews in Biochemistry**, v.66, p.347-384, 1997.

BOJS, G.; NICKLASSON, B.; SVENSSON, A. Allergic contact dermatitis to propyl gallate. **Contact Dermatitis**, v.17, p. 294-298, 1987.

BRADY, R.C.; BERNSTEIN, D.J. Treatment of herpes simplex virus infections. **Antiviral Research**, v. 61, p. 73-81, 2004.

CASSADY, K.A.; WHITLEY, R.J. New therapeutic approaches to the alphaherpesvirus infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.39, p.119-128, 1997.

CELUM, C.L. The interaction between herpes simplex virus and human immunodeficiency virus. **Herpes**, v.11 Suppl 1, p.36A-45A, 2004.

CHENG, H.Y.; LIN, T.C.; ISHIMARU, K.; YANG, C.M.; WANG, K.C.; LIN, C.C. In vitro antiviral activity of prodelphinidin B-2 3,3'-di-O-gallate from *Myrica rubra*. **Planta Medica**, v.69, p.953-956, 2003.

CHENG, H.Y.; LIN, T.C.; YANG, C.M.; WANG, K.C.; LIN, C.C. Mechanism of action of the suppression of herpes simplex virus type 2 replication by pterocarnin A. **Microbes Infection**, v.6, p.738-744, 2004.

CLEMENTS, J.B.; TIMBURY, M.C.; GRIFFITHS, P.D. Herpesviridae. In: COLLIER, L.H.; TIMBURY, M.C. (eds.) **Topley & Wilson's. Principles of bacteriology, virology and immunity**, 8 ed. London: Edward Arnold, v. 4. p.415-429, 1990.

DA SILVA, A.G. Propriedades gerais dos herpesvirus. In: LUPI, O.; DA SILVA, A.G.; PEREIRA JR, A.C. (Org.). **Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: Medsi, p. 1-14, 2000.

DE CLERCQ, E. Antiviral drug discovery and development: where chemistry meets with biomedicine. **Antiviral Research**, v.67, p.56-75, 2005.

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

FIELD, H.J. Herpes simplex virus antiviral drug resistance--current trends and future prospects. **Journal of Clinical Virology**, v.21, p.261-269, 2001.

FIUZA, S.M.; GOMES, C.; TEIXEIRA, L.J.; GIRAO DA CRUZ, M.T.; CORDEIRO, M.N.; MILHAZES, N.; BORGES, F.; MARQUES, M.P. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties--a structure-activity relationship study. Part 1: methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.12, p.3581-3589, 2004.

FREY, C.; PAVANI, M.; CORDANO, G.; MUNOZ, S.; RIVERA, E.; MEDINA, J.; MORELLO, A.; DIEGO MAYA, J.; FERREIRA, J. Comparative cytotoxicity of alkyl gallates on mouse tumor cell lines and isolated rat hepatocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, 2006, in press.

FUJITA, K.; KUBO, I. Antifungal activity of octyl gallate. **Internation Journal of Food Microbiology**, v.79, p.193-201, 2002a.

FUJITA, K.; KUBO, I. Plasma membrane injury induced by nonyl gallate in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, p.1035-1042, 2002b.

GNOJKOWSKI, J.; KRAJKA-KUZNIAK, V.; BAER-DUBOWSKA, W. Monoclonal antibody-directed analysis of benzo[a]pyrene metabolism in rat liver and extrahepatic tissues: effect of propyl and octyl gallate. **Nutrition and Cancer**, v.39, p.117-125, 2001.

GUNCKEL, S.; SANTANDER, P.; CORDANO, G.; FERREIRA, J.; MUNOZ, S.; NUNEZ-VERGARA, L.J.; SQUELLA, J.A. Antioxidant activity of gallates: an electrochemical study in aqueous media. **Chemico-Biological Interactions**, v.114, p.45-59, 1998.

HA, T.J.; NIHEI, K.; KUBO, I. Lipoyxygenase inhibitory activity of octyl gallate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.3177-3181, 2004.

HAUSEN, B.M.; BEYER, W. The sensitizing capacity of the antioxidants propyl, octyl, and dodecyl gallate and some related gallic acid esters. **Contact Dermatitis**, v.26, p.253-258, 1992.

HIIPAKKA, R.A.; ZHANG, H.Z.; DAI, W.; DAI, Q.; LIAO, S. Structure-activity relationships for inhibition of human 5 α -reductases by polyphenols. **Biochemical Pharmacology**, v.63, p.1165-1176, 2002.

HOUGHTON, P.J. Compounds with anti-HIV activity from plants. **Transactions from the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.90, p.601-604, 1996.

HOUGHTON, P.J. Use of small scale bioassays in the discovery of novel drugs from natural sources. **Phytotherapy Research**, v.14, p.419-423, 2000.

HSU, F.L.; CHANG, H.T.; CHANG, S.T. Evaluation of antifungal properties of octyl gallate and its synergy with cinnamaldehyde. **Bioresources Technology**, v.98, p.734-738, 2007.

KANE, C.J.; MENNA, J.H.; SUNG, C.C.; YEH, Y.C. Methyl gallate, methyl-3,4,5-trihydroxybenzoate, is a potent and highly specific inhibitor of herpes simplex virus in vitro. II. Antiviral activity of methyl gallate and its derivatives. **Bioscience Reports**, v.8, p.95-102, 1988.

KITAGAWA, S.; NABEKURA, T.; KAMIYAMA, S.; TAKAHASHI, T.; NAKAMURA, Y.; KASHIWADA, Y.; IKESHIRO, Y. Effects of alkyl gallates on P-glycoprotein function. **Biochemical Pharmacology**, v.70, p.1262-1266, 2005.

KREANDER, K.; VUORELA, P.; TAMMELA, P. A rapid screening method for detecting active compounds against erythromycin-resistant bacterial strains of Finnish origin. **Folia Microbiologica (Praha)**, v.50, p.487-493, 2005.

KUBO, I.; FUJITA, K.; NIHEI, K. Anti-Salmonella activity of alkyl gallates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.6692-6696, 2002.

KUBO, I.; FUJITA, K.; NIHEI, K.; MASUOKA, N. Non-antibiotic antibacterial activity of dodecyl gallate. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.11, p.573-580, 2003.

KUBO, I.; FUJITA, K.; NIHEI, K.; NIHEI, A. Antibacterial activity of alkyl gallates against *Bacillus subtilis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.1072-1076, 2004.

KUBO, I.; MASUOKA, N.; XIAO, P.; HARAGUCHI, H. Antioxidant activity of dodecyl gallate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.3533-3539, 2002a.

KUBO, I.; XIAO, P.; FUJITA, K. Antifungal activity of octyl gallate: structural criteria and mode of action. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.11, p.347-350, 2001.

KUBO, I.; XIAO, P.; FUJITA, K. Anti-MRSA activity of alkyl gallates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.12, p.113-116, 2002.

KUBO, I.; XIAO, P.; NIHEI, K.; FUJITA, K.; YAMAGIWA, Y.; KAMIKAWA, T. Molecular design of antifungal agents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.3992-3998, 2002b.

KUO, Y.C.; LIN, L.C.; TSAI, W.J.; CHOU, C.J.; KUNG, S.H.; HO, Y.H. Samarangenin B from *Limonium sinense* suppresses herpes simplex virus type 1 replication in Vero cells by regulation of viral macromolecular synthesis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.2854-2864, 2002.

LARRALDE, O.; SMITH, R.W.; WILKIE, G.S.; MALIK, P.; GRAY, N.K.; CLEMENTS, J.B. Direct stimulation of translation by the multifunctional herpesvirus ICP27 protein. **Journal of Virology**, v.80, p.1588-1591, 2006.

LUPI, O.; PEREIRA JR, A.C. Herpes simples. In: LUPI, O.; DA SILVA, A.G.; FERREIRA JR, A.C. **Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: Medsi, p. 43-70, 2000.

MAHENDRAN, R.; QUINLAN, R.M.; WILKINSON, S.M. Allergic contact dermatitis from occupational propyl gallate exposure. **Contact Dermatitis**, v.47, p.122-123, 2002.

MASUOKA, N.; NIHEI, K.; KUBO, I. Xanthine oxidase inhibitory activity of alkyl gallates. **Molecular Nutrition and Food Research**, v.50, p.725-731, 2006.

MCKNIGHT, J.L.C.; KRISTIE, T.M.; ROIZMAN, B. Binding of the virion protein mediating γ gene induction in herpes simplex virus 1-infected cells to its cis site required cellular proteins. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.84, p.7061-7065, 1987.

METTENLEITER, T.C. Herpesvirus assembly and egress. **Journal of Virology**, v.76, p.1537-1547, 2002.

MUNOZ, D.; AUDICANA, M.; GASTAMINZA, G.; FERNÁNDEZ E. Dermatitis de contacto por galatos. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 17, p. 173-177, 2002.

MURASE, T.; KUME, N.; HASE, T.; SHIBUYA, Y.; NISHIZAWA, Y.; TOKIMITSU, I.; KITA, T. Gallates inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF-kappaB and expression of leukocyte adhesion molecules in vascular endothelial cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.19, p.1412-1420, 1999.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SANDER M.K. Advanced preclinical and clinical trials of natural products and related compounds from marine sources. **Current Medical Chemical**, v. 11, p. 1693-713, 2004.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SANDER M.K. Natural products as sources over the period 1981-2002. **Jornal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NIELSEN, J. Combinatorial synthesis of natural products. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, p. 297-305, 2002.

OW Y.Y.; STUPANS I. Gallic acid and gallic acid derivatives: effects on drug metabolizing enzymes. **Current Drug Metabolism**, v. 4, p. 241-248, 2003.

PAULINO, N.; PIZOLLATTI, M.G.; YUNES, R.A.; FILHO, V.C.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; CALIXTO, J.B. The mechanisms underlying the relaxant effect of methyl and ethyl gallates in the guinea pig trachea in vitro: contribution of potassium channels. **Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, v.360, p.331-336, 1999.

POULSEN, E. Safety evaluation of substances consumed as technical ingredients (food additives). **Food Additives Contamination**, v.8, p.125-133, 1991.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997.

ROIZMAN, B.; GU, H.; MANDEL, G. The first 30 minutes in the life of a virus: unREST in the nucleus. **Cell Cycle**, v.4, p.1019-1021, 2005.

ROIZMAN, B.; KNIPE, D. Herpes simplex viruses and their replication. In: KNIFE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D.; LAMB, R.; MARTIN, M.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. (Eds.). **Fields Virology**, 4 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, p. 2399-2459, 2001.

ROSSO, R.; VIEIRA, T.O.; LEAL, P.C.; NUNES, R.J.; YUNES, R.A.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Relationship between the lipophilicity of gallic acid n-alkyl esters' derivatives and both myeloperoxidase activity and HOCl scavenging. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.14, p.6409-6413, 2006.

SAEKI, K.; YUO, A.; ISEMURA, M.; ABE, I.; SEKI, T.; NOGUCHI, H. Apoptosis-inducing activity of lipid derivatives of gallic acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.23, p.1391-1394, 2000.

SAVI, L.A.; LEAL P.C.; VIEIRA T.O.; ROSSO R.; NUNES R.J.; YUNES R.A.; CRECZYNSKI-PASA T.B.; BARARDI C.R.; SIMOES C.M. Evaluation of anti-herpetic and antioxidant activities, and cytotoxic and genotoxic effects of synthetic alkyl-esters of gallic acid. **Arzneimittelforschung**, v.55, p.66-75, 2005.

SCHACKER, T. The role of HSV in the transmission and progression of HIV. **Herpes**, v.8, p.46-49, 2001.

SHIBATA, H.; KONDO, K.; KATSUYAMA, R.; KAWAZOE, K.; SATO, Y.; MURAKAMI, K.; TAKAISHI, Y.; ARAKAKI, N.; HIGUTI, T. Alkyl gallates, intensifiers of beta-lactam susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.549-555, 2005.

SHUKLA, D.; SPEAR P.G. Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. **Journal of Clinical Investigation**, v.108, p.503-510, 2001.

SMITH, R.W.; MALIK, P.; CLEMENTS, J.B. The herpes simplex virus ICP27 protein: a multifunctional post-transcriptional regulator of gene expression. **Biochemical Society Transactions**, v.33, p.499-501, 2005.

SONG, J.M.; LEE, K.H.; SEONG, B.L. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. **Antiviral Research**, v.68, p.66-74, 2005.

SPEAR, P.G. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. **Cell Microbiology**, v.6, p.401-410, 2004.

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

STAPLETON, P.D.; SHAH, S.; ANDERSON, J.C.; HARA, Y.; HAMILTON-MILLER, J.M.; TAYLOR, P.W. Modulation of beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.23, p.462-467, 2004.

SUBAK-SHARPE, J.H.; DARGAN D.J. HSV molecular biology: general aspects of herpes simplex virus molecular biology. **Virus Genes**, v.16, p.239-251, 1998.

UOZAKI, M.; YAMASAKI, H.; KATSUYAMA, Y.; HIGUCHI, M.; HIGUTI, T.; KOYAMA, A.H. Antiviral effect of octyl gallate against DNA and RNA viruses. **Antiviral Research**, 2006, in press.

VAN DER HEIJDEN, C.A.; JANSSEN, P.J.; STRIK, J.J. Toxicology of gallates: a review and evaluation. **Food and Chemical Toxicology**, v.24, p.1067-1070, 1986.

VELURI, R.; SINGH, R.P.; LIU, Z.; THOMPSON, J.A.; AGARWAL, R.; AGARWAL, C. Fractionation of grape seed extract and identification of gallic acid as one of the major active constituents causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells. **Carcinogenesis**, v.27, p.1445-1453, 2006.

VOYLES, B.A. **The biology of viruses**. St Louis: Mosby-Year Book, 1993, 386p.

WHITE, D.O.; FENNER, F.J. **Medical Virology**. 4th. ed., San Diego: Academic, 1994.

WHITLEY, R.J.; ROIZMAN B. Herpes simplex virus infections. **Lancet**, v.357, p.1513-1518, 2001.

YOSHINO, M.; HANEDA, M.; NARUSE, M.; HTAY, H.H.; IWATA, S.; TSUBOUCHI, R.; MURAKAMI, K. Prooxidant action of gallic acid compounds: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. **Toxicology In Vitro**, v.16, p.705-709, 2002.