

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
LABORATÓRIO DE VIROLOGIA APLICADA

Iara Zanella Guterres

**Avaliação da ação citotóxica e antiviral de uma nova geração de cardenolídeos
semissintéticos**

Florianópolis

2022

Iara Zanella Guterres

**Avaliação da ação citotóxica e antiviral de uma nova geração de cardenólídeos
semissintéticos**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Farmacêutica.

Orientadora: Profa. Dra. Izabella Thaís da Silva

Florianópolis

2022

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

Guterres, Iara Zanella

Avaliação da ação citotóxica e antiviral de uma nova
geração de cardenolídeos semissintéticos / Iara Zanella
Guterres ; orientadora, Izabella Thaís Silva, 2022.
45 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Farmácia. 3. Cardenolídeos. 4.
Antitumoral. 5. Antiviral. I. Silva, Izabella Thaís . II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Farmácia. III. Título.

Iara Zanella Guterres

**Avaliação da ação citotóxica e antiviral de uma nova geração de cardenolídeos
semissintéticos**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do
Título de Farmacêutica e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia

Florianópolis, 16 de março de 2022

Profª Dra Liliete Canes Souza Cordeiro
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Izabella Thaís da Silva
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa Dra. Gislaine Fongaro
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Ana Carolina Rabello de Moraes
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2022.

AGRADECIMENTOS

À Deus e a vida, por permitirem que eu esteja exatamente aqui, por ter traçado um caminho maravilhoso pra mim, por tanta generosidade ao meu redor e, por me apresentar uma vida linda, repleta de pessoas incríveis.

Aos meus pais, Sonia e Edgar, por serem os melhores do mundo, sempre me cercando de amor, fazendo de tudo para me ver feliz, apoiando incondicionalmente e dando suporte sempre, em todas as minhas decisões e escolhas. Por serem exemplos, de generosidade, humildade, bondade, dedicação, determinação, sabedoria e outros inúmeros adjetivos. Obrigada por todo colo, conversa e palavra de incentivo. Obrigada por me permitirem sonhar e, junto comigo, realizar tudo, me encorajando a alçar voo, mas, com a segurança de sempre poder contar com vocês. Sem vocês nada disso seria possível, serei eternamente grata.

Obrigada à toda minha família que, mesmo distante fisicamente, estão sempre presentes. Obrigada por todo amor e carinho. Especialmente a minha amada Mor, que é um presente em minha vida, obrigada por estar sempre aqui pra mim, sis. Sou sua fã número um, você é um exemplo de ser humano e profissional.

À minha orientadora, Profa. Dra. Izabella Thaís da Silva, pela atenção, pelo conhecimento compartilhado, por todas as oportunidades apresentadas. Obrigada por me aceitar e acolher. À Profa. Dra. Gislaine Fongaro que, juntamente com a Iza, abriu as portas do LVA, permitindo a realização desse trabalho. Obrigada Gis, por sua dedicação e cuidado. Vocês, juntamente com a Profa. Dra. Ariadne Cristiane Cabral da Cruz, possibilitam a realização de muitos sonhos. São grandes exemplos de pesquisadoras, pelas quais tenho grande admiração e, sou grata por ter vocês comigo nessa jornada.

Aos membros da banca examinadora pelas contribuições, por avaliarem e melhorarem a qualidade deste trabalho.

Aos queridos e lindos amigos que encontrei no LVA, Cati, Bea, Mari, Giulia, Paula, Rafa e Rapha. Obrigada por cada café e risada compartilhada entre um experimento e outro, vocês são muito especiais e merecem todo o sucesso que estão buscando, admiro muito vocês e o trabalho de cada um, exercido com tanta dedicação. Meu agradecimento

especial vai a querida Isabella, que me acolheu desde o meu primeiro dia de IC. Querida Isa, obrigada por ter me ensinado tanto, com tanta paciência e amor. Obrigada por ser essa amiga maravilhosa, presente e por me ajudar a manter a calma.

Às minhas amigas lindas que encontrei nesse curso, Fernanda, Tainee, Helo, Luisinha, Salim, Isa, e tantas outras pessoas especiais que conheci ao longo desses anos. Obrigada por cada momento compartilhado, cada café entre aulas, idas até o RU, caminhada entre EFI e CCB, festas, bares, jantãs, choros e muito estudo.

Ao meu namorado, Cássio, por deixar a vida tão mais leve e linda, por trazer mais cor, música e felicidade ao mundo. Por me apoiar e incentivar sempre e, fazer eu acreditar no meu potencial. Você é especial demais.

Aos meus amigos de longuíssima data, os quais eu amo muito e, distância nenhuma muda o que sentimos e somos um pro outro. Lillian, Dani, Luã, Raíssa, Amanda, Vitória, Gabi T, Gabi B, Lucas, Elio, Du, Martina, Vic, Julia e Maria Luiza, obrigada por sempre lembrarem de mim, por fazerem eu me sentir tão acolhida e tão querida.

A Universidade Federal de Santa Catarina, e todos os professores do curso de farmácia, pela infraestrutura e excelência de educação ofertada, a qual pude desfrutar nesses anos de graduação, além das maravilhosas experiências pessoais e de vida.

A todos que de alguma forma estiveram ao meu lado, contribuíram muito para a realização deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

Os produtos naturais são fontes importantes de compostos com grande diversidade estrutural, capacidade de ação biológica e farmacológica, além de apresentarem modelos que podem ser utilizados na síntese e semissíntese de novos fármacos, formulados a partir das necessidades que surgem na indústria médica e farmacêutica ao passar dos anos. Um exemplo desses compostos são os cardenólídeos, os quais são tradicionalmente utilizados no tratamento de insuficiência cardíaca congestiva e arritmias atriais, devido sua ação inibitória sob a Na^+/K^+ -ATPase, aumentando a força de contração do músculo cardíaco. Entretanto, nos últimos anos, diversos estudos vêm demonstrando a potencial atividade citotóxica, antitumoral e antiviral de algumas moléculas desta classe. O Herpes Simplex Virus tipos 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) são responsáveis por um número expressivo das infecções humanas virais. Outro problema de saúde mundial é o câncer, o qual apresenta uma elevada taxa de mortalidade, o que faz com que seja necessária a busca por novas alternativas ou reforços ao tratamento de combate a esta doença, pois os já existentes carecem de especificidade, além de causar sérios efeitos adversos. Neste sentido, com o intuito de contribuir com dados a respeito dessas atividades, foram testados oito novos análogos semissintéticos de cardenólídeos, utilizando ensaios como a sulforrodamina B, para avaliar sua citotoxicidade (CC_{50}) frente células de linhagens tumorais humanas de pulmão e próstata e, triagem anti-herpética frente ao HSV-1, cepa KOS, por meio do ensaio de redução de formação de placas de lise (CI_{50}). A partir dos resultados obtidos, serão calculados os índices de seletividade ($\text{IS}=\text{CC}_{50}/\text{CI}_{50}$), para então selecionar os compostos mais promissores. Dois compostos se destacaram, APSO-26 e APSO-28, pois foram os que apresentaram os menores valores de CC_{50} . O composto APSO-26 apresentou um valor de CC_{50} de 1,078, 1,185 e 2,229 μM para as linhagens A549, H460 e PC3, respectivamente. Já o composto APSO-28 apresentou valores de CC_{50} de 1,851, 1,585 e 2,555 μM para as células A549, H460 e PC3, respectivamente. Já em relação as células VERO, os compostos mais citotóxicos foram APSO-26 e APSO-28, com valores de CC_{50} de 16,38 μM e 21,90 μM , respectivamente, demonstrando ainda seletividade destes compostos pelas células tumorais. Além disso, estes mesmos compostos, APSO-26 e APSO-28, demonstraram atividade anti-herpética uma vez que, apresentaram as maiores porcentagens de inibição da replicação viral dentre os compostos testados, sendo 93,5% e 56,4%, respectivamente, em uma concentração de 2 μM , além de apresentarem redução no tamanho dos focos virais. Portanto, dentro dessa série inédita de cardenólídeos semissintéticos, dois compostos merecem destaque, podendo ser considerados moléculas bioativas com potencial para seguir às próximas etapas no processo de P&D de um novo fármaco, a fim de continuar contribuindo para o aumento do conhecimento nesta área e, surgindo como novas alternativas terapêuticas.

Palavras-chave: Glicosídeos cardioativos; antitumoral; anti-herpes; produtos naturais.

ABSTRACT

Natural products are important sources of compounds with great structural diversity, capacity for biological and pharmacological action, in addition to presenting models that can be used in the synthesis and semi-synthesis of new drugs, formulated based on the needs that arise in the medical and pharmaceutical industry when passing through of years. An example of these compounds are cardenolides, which are traditionally used in the treatment of congestive heart failure and atrial arrhythmias, due to their inhibitory action on Na⁺/K⁺-ATPase, increasing the force of contraction of the heart muscle. However, in recent years, several studies have demonstrated the potential cytotoxic, antitumor and antiviral activity of some molecules of this class. Herpes Simplex Virus types 1 and 2 (HSV-1 and HSV-2) are responsible for a significant number of human viral infections. Another global health problem is cancer, which has a high mortality rate, which makes it necessary to search for new alternatives or reinforcements to the treatment to combat this disease, as the existing ones lack specificity, in addition to cause serious adverse effects. In this sense, in order to provide data on these activities, eight new semi-synthetic cardenolide analogues were tested, using assays such as sulforhodamine B, to assess their cytotoxicity (CC₅₀) against human lung and prostate tumor cells and, anti-herpetic screening against HSV-1, KOS strain, using the lysis plaque reduction assay (IC₅₀). From the results obtained, the selectivity indices (IS=CC₅₀/CI₅₀) will be calculated, in order to select the most promising compounds. Two compounds stood out, APSO-26 and APSO-28, as they presented the lowest CC₅₀ values. The APSO-26 compound presented a CC₅₀ value of 1.078, 1.185 and 2.229 μM for the A549, H460 and PC3 strains, respectively. The APSO-28 compound presented CC₅₀ values of 1.851, 1.585 and 2.555 μM for cells A549, H460 and PC3, respectively. In relation to VERO cells, the most cytotoxic compounds were APSO-26 and APSO-28, with CC₅₀ values of 16.38 μM and 21.90 μM, respectively, demonstrating the selectivity of these compounds by tumor cells. Furthermore, these same compounds, APSO-26 and APSO-28, demonstrated anti-herpetic activity since they showed the highest percentages of inhibition of viral replication among the tested compounds, being 93.5% and 56.4%, respectively, at a concentration of 2 μM, in addition, showing a reduction in the size of viral foci. Therefore, within this unprecedented series of semi-synthetic cardenolides, two compounds deserve to be highlighted, which can be considered bioactive molecules with the potential to follow the next steps in the Research & Development process of a new drug, in order to continue contributing to the increase of knowledge in this area and, emerging as new therapeutic alternatives.

Keywords: Cardiac glycosides; antitumor; anti-herpes; natural products.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Estrutura química de um cardenolídeo..... | 13 |
| Figura 2 - Bufalina (aglicona de um bufadienolídeo)..... | 14 |
| Figura 3 - Estruturas químicas dos compostos APSO-26 e APSO-28..... | 36 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Estruturas químicas dos derivados triazólicos da digitoxigenina..... | 22 |
| Tabela 2 - Resultados da avaliação citotóxica dos derivados triazólicos O-glicosídicos da digitoxigenina em diferentes linhagens tumorais..... | 31 |
| Tabela 3. Resultados da avaliação citotóxica dos derivados triazólicos O-glicosídicos da digitoxigenina em células VERO..... | 33 |
| Tabela 4. Resultados da triagem anti-herpética (anti-HSV-1, cepa KOS) dos derivados triazólicos O-glicosídicos da digitoxigenina..... | 34 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

ATCC: *American Type Culture Collection*

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

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

CMC: Carboximetilcelulose

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (meio essencial mínimo)

DMSO: Dimetilsulfóxido

ECA2: Enzima conversora de angiotensina 2

H460: Linhagem de células de carcinoma de efusão pleural humano

HIF-1 α : Fator 1-alfa induzível por hipóxia

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

HSV: Herpes Simplex Virus

HSV-1: Herpes Simplex Virus tipo 1

HSV-2: Herpes Simplex Virus tipo 2

HPV: Papilomavírus humano

INCA: Instituto Nacional de Câncer

IS: Índice de seletividade

KOS: Cepa de HSV-1 sensível ao aciclovir

MEM: *Minimal Essential Medium* (meio essencial mínimo)

NF- κ B: Fator nuclear kappa B

VERO: Linhagem de células de rim de macaco verde africano

P&D: Pesquisa e desenvolvimento

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

RPMI-1640: Roswell Park Memorial Institute-1640

TQ: Timidina quinase

UFP: Unidades formadoras de placas de lise

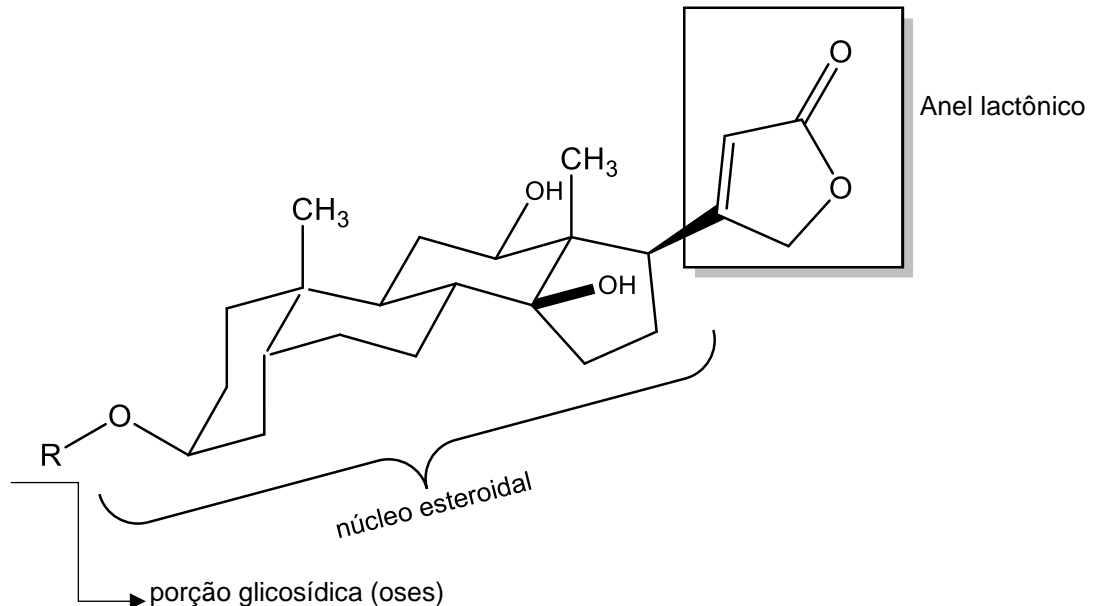
SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 OBJETIVOS | 21 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 21 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 21 |
| 3 METODOLOGIA | 22 |
| 3.1 MATERIAIS DE ESTUDO | 22 |
| 3.2 CULTURAS CELULARES..... | 24 |
| 3.2.1 Células | 24 |
| 3.2.2 Meios de cultura | 24 |
| 3.2.3 Origem da cepa viral | 25 |
| 3.2.4 Preparo da suspensão-estoque viral | 25 |
| 3.2.5 Determinação do título infeccioso viral | 26 |
| 3.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE..... | 27 |
| 3.4 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIVIRAL | 29 |
| 4 RESULTADOS | 31 |
| 4.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE..... | 31 |
| 4.1.2 Avaliação da citotoxicidade em células de linhagens tumorais | 31 |
| 4.1.2 Avaliação da citotoxicidade em células VERO | 32 |
| 4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HERPÉTICA | 33 |
| 5 DISCUSSÃO | 35 |
| 6 CONCLUSÕES | 38 |
| REFERÊNCIAS | 39 |

1 INTRODUÇÃO

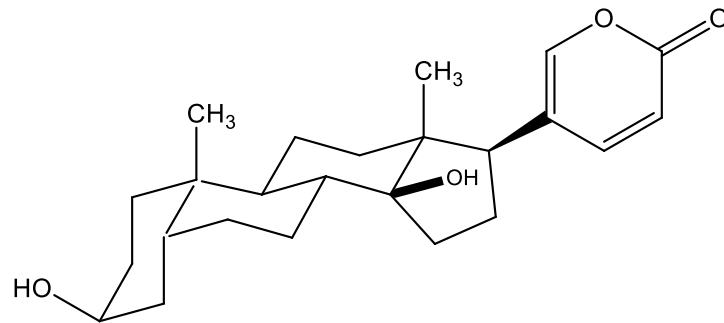
Os cardenólídeos ou heterosídeos cardioativos são compostos naturais encontrados em famílias vegetais como Scrophulariaceae (*Digitalis*), Asclepiadaceae (*Asclepias*), Apocynaceae e Plantaginaceae. Também podem ser encontrados em algumas espécies do reino animal, como anfíbios (RATES et al., 2017). Sua estrutura química consiste em moléculas de açúcar ligadas a uma aglicona esteroidal, e essa ligação deve ocorrer através da hidroxila, na posição C-3 β . Apresentam também um anel lactônico, na posição C-17 β , onde o número de carbonos desse anel irá definir se trata de um cardenólídeo, que possuem um anel com quatro carbonos, ou um bufadienólídeo, que apresenta um anel com cinco carbonos. Os cardenólídeos são os mais abundantes na natureza (RATES, et al., 2017; EL-SEEDI et al., 2019).

Figura 1. Estrutura química de um cardenólídeo



Fonte: adaptado de (RATES, et al., 2017; EL-SEEDI et al., 2019).

Figura 2. Bufalina (aglicona de um bufadienolídeo).



Fonte: adaptado de (RATES, et al., 2017; EL-SEEDI et al., 2019).

Os cardenolídeos possuem ação inotrópica positiva sobre o músculo cardíaco, aumentando a sua força de contração devido a inibição que estes compostos causam, a partir de sua ligação à enzima Na^+/K^+ -ATP-ase, aumentando a concentração intracelular de cálcio e, portanto, aumentando a intensidade da interação entre actina e miosina. Sendo assim, devido a essa específica ação cardiotônica, os cardenolídeos são de grande importância para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva, sendo a digoxina o cardenolídeo terapêuticamente empregado (PATEL, 2016).

Entretanto, diversos estudos vem demonstrando a possível utilização de cardenolídeos em outras doenças, abrindo a possibilidade de novas alternativas terapêuticas (PRASSAS; DIAMANDIS, 2008), como, por exemplo, na terapia anticâncer, devido a atividade citotóxica desses compostos (NGUYEN et al., 2020; PECIO et al., 2019; REDDY et al., 2020; REN et al., 2020). O reposicionamento de fármacos é uma estratégia que consiste em atribuir novas indicações terapêuticas a fármacos já consolidados no mercado (SONAYE; SHEIKH; DOIFODE, 2021). Cerca de 30% dos medicamentos e vacinas aprovados nos últimos anos pela FDA (*Food and Drug Administration*) são devido a essa abordagem, os quais incluem tratamentos para doenças de pele, inflamatórias, infecciosas, neurodegenerativas e câncer (PILLAIYAR et al., 2020). A quimioterapia utilizada como tratamento para o câncer apresenta efeitos adversos notórios e significativos, os quais reduzem a qualidade de vida dos pacientes submetidos à terapia, portanto, o reposicionamento de alguns fármacos, que se

encontram originalmente para tratamento de outras doenças, pode ser utilizado como uma alternativa com menos efeitos adversos (TURANLI et al., 2021).

Sabe-se que os compostos de origem natural são frequentemente utilizados como modelo para síntese e/ou semissíntese de novos fármacos, os quais podem ser modelados de acordo com a especificidade, segurança e potência que cada doença exige. Atrelado a isso, o reposicionamento de fármacos ganha cada vez mais relevância no cenário farmacêutico mundial, sendo que os cardenolídeos se apresentam como importante material de estudo merecendo atenção em relação às suas atividades farmacológicas e novos potenciais terapêuticos (CAO et al., 2015; KIRTONIA et al., 2021). Além disso, os produtos naturais apresentam um número expressivo de substâncias, com imensa diversidade e complexidade estrutural, os quais são de grande relevância à pesquisa e ao desenvolvimento (P&D) de novos fármacos, devido sua potencial atividade biológica (AZAB; NASSAR; AZAB, 2016; BERTELLI et al., 2020a; CRAGG et al., 1999; NEWMAN; CRAGG, 2016, 2020).

A estratégia de reposicionamento apresenta alguns desafios, como a dificuldade na regulamentação para utilização destes medicamentos. Em contrapartida, apresenta inúmeras vantagens (PUSHPAKOM et al., 2018), tais como: menor risco de falha, já que o fármaco já passou por ensaios de segurança e eficácia; menor prazo de desenvolvimento, já que diversos ensaios pré-clínicos necessários já foram realizados e, redução do custo de desenvolvimento de um novo medicamento. Portanto, o reposicionamento de fármacos pode ser uma estratégia para tornar mais rápido, barato e seguro o desenvolvimento de fármacos, além de possibilitar a descoberta de novos alvos e mecanismos, podendo ser explorados posteriormente (JOURDAN et al., 2020; XUE et al., 2018).

Os cardenolídeos são compostos naturais tradicionalmente utilizados no tratamento de cardiopatias, como a insuficiência cardíaca congestiva e arritmias, devido a sua ação inotrópica positiva, a partir da inibição da Na^+/K^+ -ATP-ase, demonstrada por moléculas como a digoxina e a digitoxina (FUERSTENWERTH, 2014). Além desta atividade, acredita-se que este grupo de metabólitos apresente também potenciais para o tratamento de outras doenças, abrindo oportunidades para a pesquisa a respeito da descoberta de novas possibilidades terapêuticas, como por exemplo, o desenvolvimento

de novos antineoplásicos, já que diversos estudos apontam a atividade citotóxica e antiproliferativa dos cardenólídeos e seus derivados (CHANG et al., 2013; DIEDERICH; MULLER; CERELLA, 2017; FELIPPE GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017), incluindo estudos realizados por nosso grupo de pesquisa (BOFF et al., 2020c; SCHNEIDER et al., 2021; SILVA et al., 2018).

Alguns estudos citam a potencial atividade citotóxica exercida pelos cardenólídeos sob a inibição da ativação de HIF-1 α (fator 1-alfa induzível por hipóxia) e NF- κ B (fator nuclear kappa B), mostrando alternativas para o desenvolvimento de novas terapias antineoplásicas (ELBAZ et al., 2012; GAYED et al., 2012; MENGER et al., 2013). A ação dos cardenólídeos possui efeito sob a atividade enzimática da Na⁺/K⁺-ATP-ase, o que pode estar relacionado também à indução de processos autofágicos e/ou apoptóticos (FARAH et al., 2016; GENG et al., 2020; WANG et al., 2012).

O câncer é um problema global, que cada vez mais instiga a pesquisa e busca por novos tratamentos, na tentativa de deter este mal que atinge um número expressivo de pessoas todos os anos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2019, o câncer de pulmão, juntamente com o de traqueia e brônquios, foi a sexta maior causa de mortalidade mundial, ficando atrás apenas de doenças cardiovasculares, respiratórias e condições neonatais. Além disso, estima-se que, no ano de 2018, aproximadamente 9,6 milhões de pessoas tiveram como causa de morte o câncer, sendo o câncer de pulmão a causa mais comum (1,76 milhões de mortes), e também, juntamente com o câncer de mama, o responsável pelo maior número de casos (cerca de 2,09 milhões). O câncer de próstata aparece em quarto lugar nessa lista, causando cerca de 1,28 milhões de casos (DE MARTEL et al., 2020; WHO, 2021; FERLAY et al., 2020). Já em 2020 este número foi superado, sendo o câncer de pulmão responsável pela morte de quase 1,8 milhões de pessoas, 18% do total de mortes por câncer no mundo.

No Brasil, segundo o INCA (Instituto Nacional de Câncer), o número de óbitos masculinos por câncer, cuja localização primária era traqueia, brônquios e pulmões, no ano de 2019, chegou a 16.733 registros, totalizando cerca de 13% dos números de óbitos por câncer no país, seguido por câncer cuja localização primária era a próstata, o qual foi responsável por 15.983 óbitos masculinos. Já o câncer de maior mortalidade entre as

mulheres foi o câncer de mama, responsável por mais de 18.000 óbitos em 2019, seguido também pelo câncer de traqueia, brônquios e pulmão, o qual apresentou 12.621 óbitos no mesmo ano (BRASIL/INCA, 2021).

Também, segundo o INCA, no Brasil, no ano de 2020, ocorreriam mais de 620.00 novos casos de câncer, incluindo homens e mulheres. Cerca de 387.980 dessas novas neoplasias malignas atingiriam homens, e destas, cerca de 65.840 (aproximadamente 29,2%) teriam como órgão primário a próstata. O pulmão, como órgão de localização primária da neoplasia, é o terceiro mais comum em homens, e o quarto em mulheres. Entretanto, apesar de não apresentar a maior incidência, é uma neoplasia com elevadas taxas de óbito, sendo assim uma grande preocupação para órgãos públicos e profissionais da área, já que se trata de um problema de saúde pública e requer atenção tanto na prevenção quanto no tratamento (BRASIL/INCA 2019).

Por outro lado, estimativas apontam que, no ano de 2040, são esperados 28,4 milhões de novos casos de câncer, isso representa um aumento de aproximadamente 47% em relação ao número de casos estimados no ano de 2020. Esse aumento será ainda mais expressivo em países com IDH considerado baixo ou médio, com estimativas de um crescimento de incidência em até 96% em relação a 2020. Essa projeção reflete e está associada com mudanças demográficas, associadas ainda a um aumento dos fatores de risco, que estão ligados ao processo de globalização (SUNG et al., 2021). Além do potencial antitumoral, outra alternativa é a utilização destes compostos no tratamento de doenças virais, a qual também já é bastante descrita na literatura (BERTOL et al., 2011; RIJSBERGEN et al., 2019; SU et al., 2008; YANG et al., 2018), devido a sua potencial ação contra a replicação viral. Há relatos na literatura já demonstraram a ação antiviral dos cardenólídeos contra o Chikungunya vírus (ASHBROOK et al., 2016), adenovírus (GROSSO et al., 2017), citomegalovírus (CAI et al., 2014), HIV (vírus da imunodeficiência humana) (WONG et al., 2013), HPV (papilomavírus humano) (KOLK et al., 2017), Influenza A (BOFF et al., 2020a) e HSV (Herpes Simplex Vírus) (BOFF et al., 2020b), esses dois últimos realizados por nosso próprio grupo de pesquisa. Ainda sobre a potencial ação antiviral dos cardenólídeos, há estudos recentes demonstrando sua ação *in vitro* contra o coronavírus humano OC43 (HCoV-OC43), coronavírus da

gastroenterite transmissível (TGEV) e ao SARS-CoV-2 (PLANTE et al., 2021; YANG et al., 2020).

Perante a recente pandemia causada pelo vírus SARS-CoV-2, responsável pela COVID-19, a busca e necessidade urgente por medicamentos para enfrentar a doença, apontou a potencial atividade de diversas substâncias já conhecidas, como os cardenólídeos, podendo ser alternativas para o tratamento e profilaxia da COVID-19 (PLANTE et al., 2020; ŠKUBNÍK et al., 2021). A partir da hipótese de que os glicosídeos cardiotônicos poderiam bloquear a ligação da proteína Spike do SARS-CoV, responsável por iniciar o processo de infecção, à enzima conversora da angiotensina 2 (ECA2), receptor celular do hospedeiro, bloqueando a penetração viral nas células-alvo, foi desenvolvido um ensaio bioquímico de ligação ECA2:Spike e foram testados cardenólídeos como inibidores desta ligação (CAOHUY et al., 2021). Foi relatado que a oubaína, digitoxina, digoxina, digitoxigenina e digoxigenina são inibidores competitivos de alta afinidade da ligação ECA2 ao domínio de ligação do receptor da proteína Spike, portanto, podem bloquear a penetração viral na célula alvo.

Segundo um estudo, onde foi apontado o provável mecanismo de ação anti-Covid-19 dos glicosídeos cardíacos, chegou-se à conclusão de que, a atividade antiviral destes compostos parece estar relacionada com a inibição do fator nuclear kappa B (NF- κ B) através da sinalização tirosina quinase (Src) ligada à Na⁺ /K⁺ -ATPase. Além disso, diferentes efeitos podem ser induzidos, dependendo da concentração, podendo causar a inibição da replicação viral, ou apenas, modulando a resposta inflamatória exacerbada de pacientes com COVID-19, apresentando então efeitos anti-inflamatórios (SOUZA E SOUZA et al., 2021).

Os vírus herpéticos fazem parte da família Herpesviridae, a qual inclui mais de 200 espécies, sendo que, dessas, nove são infecciosas para o homem (FORSGREN; KLAPPER, 2009). As doenças humanas de origem viral também constituem um grave problema à saúde pública. O Herpes Simplex Virus (HSV-1 e HSV-2), por exemplo, é responsável por diversas lesões orais e genitais, e ainda há estimativas que apontam que cerca de 60-95% da população adulta mundial seja portadora de HSV-1, HSV-2 ou ambos (KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014). Esse vírus apresenta um impacto que ultrapassa barreiras geográficas e sociais, atingindo amplamente todas as esferas,

entretanto, acredita-se que países subdesenvolvidos apresentam maiores taxas de transmissão de HSV. O grande problema do HSV é a sua ligação com infecções agudas recorrentes e com o aumento da transmissão de HIV, já que a ruptura da mucosa causada por úlceras genitais, as quais podem surgir em indivíduos infectados por HSV-2, favorece a infecção das células pelo HIV, o que aumenta significativamente a prevalência dessa coinfeção (GUPTA; WARREN; WALD, 2007).

A transmissão dos vírus herpéticos ocorre através do contato direto entre um hospedeiro ativo e uma pessoa suscetível ao vírus, podendo ocorrer pela mucosa ou por lesões na pele, ou ainda, por via sexual. Na maioria das vezes, trata-se de uma infecção primária assintomática, porém, podem ocorrer casos que apresentem sintomas locais ou até sistêmicos. Anteriormente, dividia-se a forma de transmissão, sendo HSV-1 predominantemente por via oral e HSV-2 por via sexual. Porém, estudos recentes vêm demonstrando que suas formas de transmissão e manifestação se tornaram intercambiáveis, portanto, não se pode fazer uma distinção anatômica tão rígida quanto a predominância dos dois tipos de vírus herpéticos. Sendo assim, o HSV-1 apresenta, de forma majoritária, lesões mucocutâneas orofaciais, por outro lado, a manifestação de lesões na região genital é associada normalmente ao HSV-2, sendo este transmitido, geralmente, por meio de relação sexual, ou ainda, de forma vertical (congênita) (BRADSHAW; VENKATESAN, 2016; DAMOUR et al., 2019).

De acordo com a OMS, estima-se que cerca de 3,7 bilhões de pessoas com menos de 50 anos estejam infectadas pelo HSV-1, isso compreende cerca de 67% da população mundial nesta faixa etária. Já os portadores de HSV-2 são cerca de 491 milhões, ou 13% da população mundial, entre 15 e 49 anos (WHO, 2020).

O aciclovir (ACV), que é o fármaco de primeira escolha para o tratamento da infecção causada por HSV-1 e HSV-2, e também para casos de co-infecção destes vírus, é monofosforilado pela enzima timidina quinase (TQ), a qual é expressa pelo próprio HSV. Após essa monofosforilação, o ACV é convertido então à sua forma ativa, o ACV trifosforilado, o qual, por meio da inibição competitiva pela DNA polimerase viral, inibe a síntese viral e, conseqüentemente, a replicação herpética (STRASFELD; CHOU, 2010). A grande sensibilidade apresentada pela DNA polimerase viral ao ACV trifosfato, e a ativação, preferencialmente, da TQ viral, são responsáveis pela elevada seletividade do

ACV, e a resistência a esse fármaco surge, predominantemente, a partir de alterações nas TQs virais e, minoritariamente, como resultado de mutações da DNA polimerase viral (WANG et al., 2021).

Atualmente, há infecções virais que não possuem tratamentos farmacológicos específicos como é o caso das infecções causadas pelo Zika e Chikungunya vírus por exemplo, ou ainda, há doenças humanas virais que, devido às elevadas taxas de mutações virais, tornam-se resistentes aos tratamentos disponíveis (BALTINA et al., 2021), como é o caso do HSV, que pode adquirir genes de resistência ao tratamento de primeira escolha dessa infecção (aciclovir) (BURREL et al., 2013; GUEUDRY et al., 2013; VAN VELZEN et al., 2013). Sendo assim, reforça-se a necessidade pela busca de novas terapias a essas infecções, sejam elas individuais ou em combinação às já existentes, com o objetivo de otimizar a eficácia do tratamento e também de evitar o surgimento de novas cepas virais resistentes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação citotóxica e anti-herpética de uma nova série de cardenolídeos semissintéticos derivados triazólicos O-glicosídicos da digitoxigenina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Realizar a triagem citotóxica dos compostos em linhagens de células tumorais humanas, como células tumorais de próstata (PC3) e células tumorais de pulmão (A549 e H460);
- II. Avaliar a citotoxicidade dos compostos em linhagem de células Vero (estabelecida a partir de células renais de macaco verde africano);
- III. Avaliar atividade antiviral *in vitro* dos compostos frente ao Herpes Simplex Virus (HSV-1), cepa KOS (sensível ao aciclovir);
- IV. Selecionar os compostos mais promissores, calculando seus valores de índices de seletividade, para avaliar, em outros projetos e estudos, seu mecanismo de ação.

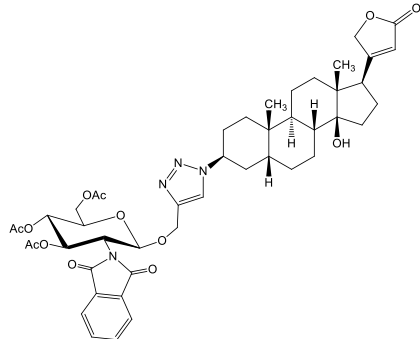
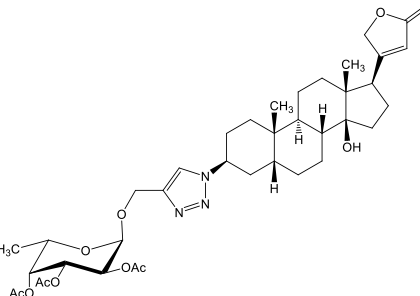
3 METODOLOGIA

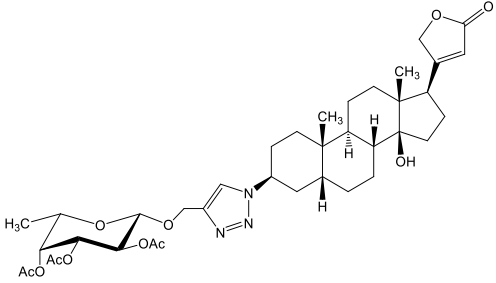
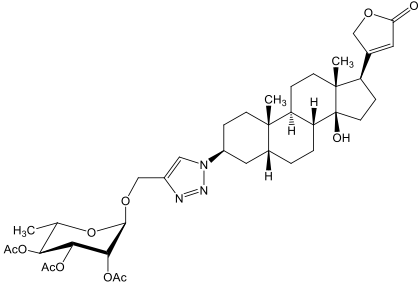
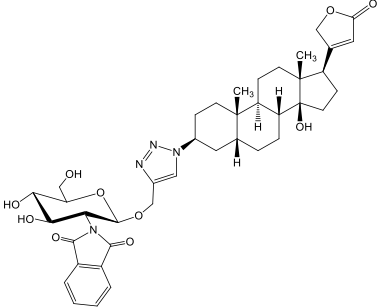
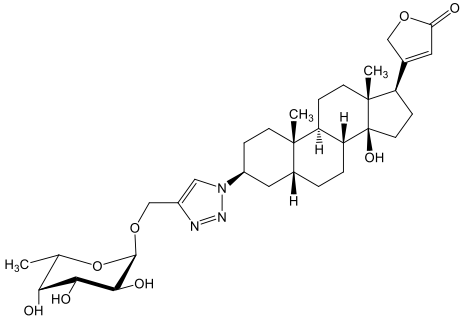
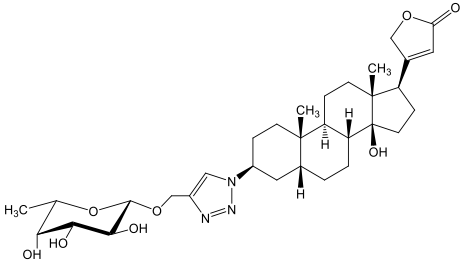
3.1 MATERIAIS DE ESTUDO

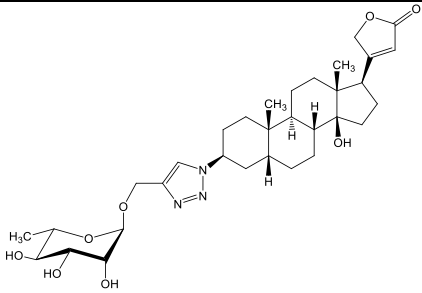
Foram testados oito cardenólídeos de origem semissintética, os quais foram sintetizados e fornecidos gentilmente pelos Profs. Drs. Rodrigo Maia de Pádua e Ricardo José Alves (ambos do Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da UFMG).

O preparo da solução estoque de cada composto será realizada em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma®), utilizando concentrações máximas de 1% deste solvente nos testes celulares, na concentração final de 10 mM.

Tabela 1. Estruturas químicas dos derivados triazólicos O-glicosídicos da digitoxigenina.

| Código | Peso molecular (g/mol) | Estrutura Química |
|---------|------------------------|--|
| APSO-21 | 872,96 |  |
| APSO-22 | 727,84 |  |

| | | |
|---------|--------|--|
| APSO-23 | 727,84 |  |
| APSO-24 | 727,84 |  |
| APSO-25 | 746,85 |  |
| APSO-26 | 601,73 |  |
| APSO-27 | 601,73 |  |

| | | |
|---------|--------|--|
| APSO-28 | 601,73 |  |
|---------|--------|--|

3.2 CULTURAS CELULARES

3.2.1 Células

Foram utilizadas linhagens celulares humanas de câncer de próstata insensíveis à terapia antiandrogênica, PC-3, adquiridas do DSMZ[®] (*German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*), e linhagens celulares humanas de câncer de pulmão, A549 e H460, adquiridas do ATCC[®] (*American Type Culture Collection*), para realizar os ensaios de citotoxicidade.

Para os ensaios antivirais, foram utilizadas células VERO (ATCC[®]), as quais também passaram pela etapa de triagem da citotoxicidade dos compostos. Essas células consistem em uma cultura de fibroblastos de rim de macaco verde da África (*Cercopithecus aethiops*), e é escolhida devido a sua alta permissividade à replicação *in vitro* do HSV-1, sendo possível a visualização e análise do seu efeito citopático.

3.2.2 Meios de cultura

A linhagem celular PC-3 foi cultivada em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) sem vermelho de fenol (Gibco[®]), as linhagens A549 e VERO foram cultivadas em meio MEM (*Minimal Essential Medium*, Gibco[®]) e a linhagem H460 em meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute-1640*, Gibco[®]). Todos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco[®]), e as células mantidas em frascos de cultivo, na estufa, a 37 °C, em atmosfera úmida e 5% de CO₂. Para expandir e obter subcultivos celulares para a realização de experimentos, foi utilizada uma enzima

proteolítica dissociante, a tripsina (Sigma[®]), que é responsável por catalisar reações de quebra de cadeias polipeptídicas, facilitando o manejo das células nos frascos de cultivo.

3.2.3 Origem da cepa viral

Os vírus utilizados foram o Herpes Simplex Virus tipo 1 (HSV-1), cepa KOS (sensível ao aciclovir), proveniente da Faculdade de Farmácia, Universidade de Rennes, França.

3.2.4 Preparo da suspensão-estoque viral

Para o preparo da suspensão-estoque viral, foi utilizado um frasco de cultura celular, já contendo células VERO, as quais foram semeadas 24 horas antes da realização desta etapa. Portanto, após essas 24 horas, o meio de cultura foi totalmente aspirado do frasco, utilizando a solução tampão fosfato (PBS) para lavar a monocamada celular, para que desta forma, todos os resquícios de células não aderidas e de soro fetal bovino pudessem ser removidos. Em seguida, foi realizada a infecção destas células, a qual foi feita a partir da adição de 1 mL de suspensão viral estoque de HSV-1 (cepa KOS). Após a infecção, o frasco foi incubado por 1 hora a 37 °C, e 5% de CO₂, ambiente propício para que ocorra a adsorção e penetração viral. Após esse período de incubação, o frasco foi retirado da estufa e a suspensão viral aspirada. Foram adicionados então 10mL apenas do meio de cultivo MEM, sem a suplementação com soro fetal bovino, no frasco de cultura contendo a monocamada celular infectada. O frasco foi, novamente, incubado em estufa a 37 °C, com atmosfera umedecida e, apresentando 5% de CO₂.

Foi realizado o monitoramento do efeito citopático, por meio da observação, em microscópio invertido, do frasco contendo a monocamada celular infectada, a cada ciclo de replicação viral, o qual tem duração de 18 horas no caso de HSV-1. Quando a monocamada celular apresentou 100% de efeito citopático, ou seja, quando o tapete celular foi totalmente destruído, este frasco foi congelado a -80 °C e, depois, descongelado a 37 °C e, assim, sucessivamente por três vezes, para que desta forma ocorra a destruição e rompimento celular total e, portanto, a liberação

das partículas virais. Essa suspensão viral obtida foi centrifugada por cinco minutos a 5000 RPM, em centrífuga refrigerada a 4 °C, para que pudesse ocorrer a separação dos restos celulares e das partículas virais. O sobrenadante, ou seja, a suspensão viral final, foi aliquoteada em tubos estéreis, titulada e congelada a -80°C (SIMÕES; AMOROS; GIRRE, 1999).

3.2.5 Determinação do título infeccioso viral

Após a produção dos inóculos virais, antes de realizar qualquer ensaio e avaliação da atividade antiviral, é necessário e importante se ter conhecimento sobre a infecciosidade destes inóculos. A infecciosidade foi determinada a partir da observação de Unidades Formadoras de Placas (UFP), e a partir desta observação, obteve-se a concentração viral por mL, o chamado título viral. O título viral dos estoques de HSV-1 foi determinado pelo método de contagem de placas de lise (BURLESON; CHAMBERS; WIEDBRAUK, 1992).

Para determinar o título viral, realizou-se um ensaio utilizando placas de 24 cavidades, sendo que estas foram previamente preparadas a partir de suspensões de células VERO, em meio MEM, com 10% de SFB, em uma densidade de $3,33 \times 10^5$ células/mL. Foram adicionados 750 µL destas suspensões em cada cavidade da placa, e então, esta foi incubada a 37 °C, 5% de CO₂, durante 24 horas, para se obter completa aderência e confluência das células em cada cavidade da placa. Após este período, o meio de cultura de cada cavidade foi completamente aspirado, e então adicionados 400 µL da suspensão-viral, diluída em série na razão 1:10, em cada cavidade, em meio MEM sem SFB (três réplicas para cada diluição). A placa foi incubada por uma hora e, para que se tivesse uma melhor distribuição da suspensão viral pelas cavidades, a cada 15 minutos a placa foi agitada cuidadosamente. Após esta hora, a suspensão viral foi completamente aspirada, e então foram adicionados 500 µL de uma solução, na proporção 1:1, de CMC (carboximetilcelulose) e MEM 2x. A placa foi novamente incubada, a 37°C e 5% CO₂, agora por um período de 48 horas. Após estas 48 horas, a placa foi retirada da estufa e todo o meio aspirado. As células foram fixadas e coradas após adição de 200 µL, por cavidade, da solução do corante preto de naftaleno, o qual

permaneceu em contato com as células por 20 minutos, à temperatura ambiente, em agitador mecânico horizontal. Após este período, o corante foi totalmente aspirado e então esperou-se a secagem total das placas, a temperatura ambiente. Utilizando microscópio estereoscópico, pode-se realizar a visualização das placas de lise, as quais foram possíveis quantificar. As áreas claras visualizadas são as áreas de lise celular, que são os chamados focos, e para calcular os títulos virais, foram contados os focos de infecção da última diluição.

O título viral foi calculado por meio da equação abaixo, o qual é expresso em Unidades Formadora de Placas por mililitro (UFP/mL):

$$\frac{\text{Número médio de placas de lise da última diluição que apresentou placa} \times \text{Recíproca da última diluição}}{\text{Volume do inóculo em mL}}$$

3.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

A avaliação da citotoxicidade foi realizada pelo ensaio colorimétrico de sulforrodamina B (SRB). O ensaio consiste em um método *in vitro*, o qual avalia a ligação do corante a componentes proteicos das células que permanecem viáveis após o tratamento com as amostras, desta forma, possibilita-se a quantificação proteica, devido a cor produzida pela ligação do corante a essas proteínas celulares, que são fixadas com ácido tricloroacético.

A distribuição de suspensões celulares, obtidas a partir do processo de tripsinização dos cultivos, foi realizada em placas de 96 cavidades, onde foram semeados 100 µL/cavidade de suspensão, totalizando 1×10^5 células/mL para células de linhagens tumorais, e para células VERO, $2,5 \times 10^5$ células/mL. Após a montagem da placa, estas foram incubadas em estufa, por 24 horas para aderência total das células no fundo da placa, a uma temperatura de 37 °C e 5% de CO₂.

Após 24 horas, foram adicionados 100 µL dos compostos a serem testados, já previamente diluídos em meio de cultura adequado para cada linhagem, em diferentes concentrações, a partir de uma diluição seriada na razão de 1:2. Na mesma placa,

obteve-se um controle celular, ou seja, células sem tratamento, as quais são consideradas 100% viáveis, além do controle positivo com paclitaxel, para células de linhagens tumoral, já que este é indicado para o tratamento de câncer de pulmão. A placa foi novamente incubada, nas mesmas condições de CO₂ e temperatura, por mais 48 horas.

Após este período, as placas foram retiradas da estufa e, sem remover o sobrenadante, as células foram fixadas por meio da adição de 100 µL de uma solução aquosa de ácido tricloroacético a 10% em cada cavidade, incubando-se a placa por mais uma hora a 4 °C. Após esse período, a placa foi cuidadosamente lavada com água destilada. Finalizado esse processo de fixação e, depois da secagem completa da placa, as células puderam ser coradas com 100 µL de uma solução ácida de sulforrodamina B (0,057% p/v), a qual permaneceu em contato com as células por 30 minutos. O corante que não se ligou às proteínas celulares foi então removido por lavagens sucessivas com uma solução aquosa de ácido acético a 1% (v/v) e, após a realização dessas etapas, esperou-se a secagem da placa.

A partir disso, foram adicionados 100 µL de uma solução de Tris Base a 10 mM (pH 10,5) em cada cavidade, para realizar a extração do corante ligado às proteínas. Posteriormente à dissolução do corante na solução Tris Base, foi realizada a leitura das absorbâncias em um espectrofotômetro (Spectra MD2, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) em um comprimento de onda de 510 nm.

Os valores de absorbância encontrados para cada amostra, nas diferentes concentrações, foram então transformados em porcentagem de viabilidade celular (X%), em relação ao controle celular, o qual é considerado 100% viável de acordo com a seguinte fórmula:

$$x\% = \frac{\text{densidade óptica do material teste} \times 100}{\text{densidade óptica do controle celular}}$$

Em seguida, os percentuais de viabilidade foram transferidos para o software de estatística GraphPad Prism 8 e, por meio da análise de regressão não linear, foi possível calcular os valores de CC₅₀, ou seja, a concentração de cada amostra que reduz em 50%

a viabilidade celular. Os valores de CC_{50} calculados representam a média de três experimentos independentes e são expressos com seus respectivos intervalos de confiança de 95%.

3.4 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIVIRAL

A avaliação da atividade antiviral das amostras foi realizada por meio do ensaio de redução da formação das placas de lise (BURLESON; CAMBERS; WIEDBRAUK, 1992).

As células VERO foram semeadas em placas de 24 cavidades, em uma concentração de $3,33 \times 10^5$ células/mL, e então foram incubadas em estufa a 37 °C e com 5% de CO_2 por 24 horas, para atingir a confluência da monocamada celular. Após as 24 horas, o meio foi aspirado e então foi realizada a infecção com aproximadamente 100 UFP (unidades formadoras de placa) do HSV-1 (cepa KOS), por meio da adição de 400 μ L de uma suspensão viral previamente titulada. A placa já infectada foi incubada por mais uma hora para permitir adsorção e penetração viral e, após esse período, a suspensão viral foi retirada e, foram adicionados 500 μ L de uma solução de CMC e meio MEM 2X contendo diferentes concentrações do material teste diluído, além do Aciclovir, o qual é utilizado como controle positivo do experimento. Além disso, para cada placa obteve-se controles virais, onde as células foram somente infectadas e não tratadas, e controles celulares, onde as células não foram tratadas nem infectadas.

Após receber o tratamento, as placas foram incubadas por 48 horas, a 37 °C e 5% CO_2 . Passado este período, o meio foi aspirado e as células coradas com 300 μ L de uma solução de preto de naftaleno, permanecendo com o corante em agitação, a temperatura ambiente, por 20 minutos. O corante foi aspirado e as placas formadas pela ação do vírus foram contadas por meio da visualização em microscópio estereoscópio. Após a contagem das placas, a porcentagem de inibição da replicação viral de cada amostra, com relação aos controles virais, pode ser calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ da inibição} = \left(1 - \frac{\text{número de placas das amostras}}{\text{número de placas do controle viral}} \right) \times 100$$

Em seguida, os percentuais calculados foram inseridos em um gráfico e, por meio da análise de regressão não linear, foi possível calcular os valores de CI_{50} , ou seja, a concentração de cada amostra que inibe 50% a infecção viral. Os valores de CI_{50} representam a média de três experimentos independentes e são expressos com seus respectivos intervalos de confiança de 95%.

Com posse dos valores de CC_{50} , obtidos nos ensaios de citotoxicidade com células VERO, e CI_{50} é possível calcular os valores de índice de seletividade (IS) de cada amostra através da seguinte fórmula:

$$IS = CC50/CI50$$

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

A avaliação da citotoxicidade, que é considerada como a capacidade de uma substância de induzir injúria ou morte celular, das amostras em relação às células saudáveis e permissivas ao vírus, é indispensável pois é esta avaliação que permite a determinação dos valores de CC50 de cada amostra testada. Este parâmetro garante uma segurança nas análises seguintes, no caso de uma análise antiviral, garantindo que a atividade seja determinada sem interferência da citotoxicidade, ou ainda, no caso das análises com células tumorais, que esta citotoxicidade seja mais específica para as células doentes e não afete as células saudáveis.

4.1.2 Avaliação da citotoxicidade em células de linhagens tumorais

Os resultados obtidos após a avaliação da citotoxicidade em células tumorais, podem ser visualizados na Tabela 2, os quais demonstram o potencial citotóxico de cada composto, ou seja, sua capacidade de induzir a morte de cada uma das linhagens tumorais (A549, H460 e PC3).

Tabela 2 - Resultados da avaliação citotóxica dos derivados triazólicos O-glicosídicos da digitoxigenina em diferentes linhagens tumorais.

| Compostos | A549 | | H460 | | PC3 | |
|------------|-----------------------|----------------|-----------------------|----------------|-----------------------|----------------|
| | CC ₅₀ (µM) | CI95% (µM) | CC ₅₀ (µM) | CI95% (µM) | CC ₅₀ (µM) | CI95% (µM) |
| APSO - 21 | 8,278 | 5,156 – 13,290 | 17,140 | 13,07 – 22,460 | 13,270 | 8,522 – 20,650 |
| APSO - 22 | 1,677 | 1,148 – 2,450 | 3,640 | 3,253 – 4,073 | 5,008 | 4,134 – 6,066 |
| APSO - 23 | 3,273 | 2,538 – 4,221 | 7,295 | 6,718 – 7,922 | 8,636 | 6,799 – 10,970 |
| APSO - 24 | 2,524 | 1,880 – 3,389 | 4,169 | 3,824 – 4,545 | 6,883 | 5,540 – 8,552 |
| APSO - 25 | 3,461 | 2,564 – 4,670 | 4,921 | 4,484 – 5,401 | 8,177 | 6,404 – 10,440 |
| APSO - 26 | 1,078 | 0,718 – 1,617 | 1,185 | 1,072 – 1,310 | 2,229 | 1,767 – 2,813 |
| APSO - 27 | 2,954 | 2,076 – 4,203 | 2,563 | 2,319 – 2,832 | 4,262 | 3,251 – 5,588 |
| APSO - 28 | 1,851 | 1,283 – 2,670 | 1,585 | 1,442 – 1,742 | 2,555 | 1,972 – 3,311 |
| Paclitaxel | <0,009 | - | <0,009 | - | 0,008840 | - |

CC₅₀: Concentração que reduz em 50 % a viabilidade celular. CI95%: Intervalo de confiança de 95%.

Além dos derivados de cardenolídeos, foi utilizado o paclitaxel como controle positivo, o qual demonstrou um valor de CC_{50} frente as células PC3 de 8,84nM. As células de câncer de pulmão (A549 e H460) demonstraram uma sensibilidade ainda maior ao paclitaxel uma vez que os valores de CC_{50} ficaram abaixo da menor concentração testada experimentalmente (<8nM).

As amostras que se mostraram mais ativas, para todas as linhagens testadas, foram APSO-26 e APSO-28, pois foram aquelas que apresentaram os menores valores de CC_{50} . A amostra APSO-26 apresentou um valor de CC_{50} de 1,078 μ M, 1,185 μ M e 2,229 μ M para as linhagens A549, H460 e PC3, respectivamente. Já a amostra APSO-28 apresentou valores de CC_{50} de 1,851 μ M, 1,585 μ M, e 2,555 μ M para as células A549, H460 e PC3, respectivamente. Com o intuito de avaliar a seletividade dos compostos mais citotóxicos, foram calculados os valores os índices de seletividade ($IS=CC_{50\text{vero}}/CC_{50\text{TUM}}$), levando em consideração a toxicidade em uma linhagem não tumoral (VERO). Os valores de IS obtidos para o composto APSO-26 foram de 15, 14 e 6 para as células A549, H460 e PC3, respectivamente. Já em relação ao composto APSO-28, foram encontrados os valores de IS de 19, 22 e 14 para as células A549, H460 e PC3, respectivamente, indicando uma seletividade dos compostos em relação às células tumorais.

4.1.2 Avaliação da citotoxicidade em células VERO

Os resultados obtidos na avaliação da citotoxicidade de cada amostra, por meio do ensaio de sulforrodamina B, em células VERO, estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados da avaliação citotóxica dos derivados triazólicos O-glicosídicos da digitoxigenina em células VERO.

| Composto | CC ₅₀ (µM) | CI95% (µM) |
|-----------|-----------------------|---------------|
| APSO - 21 | 141,5 | 108,8 - 184,0 |
| APSO - 22 | 40,68 | 30,48 - 54,29 |
| APSO - 23 | 62,74 | 50,33 - 78,22 |
| APSO - 24 | 66,58 | 52,04 - 85,18 |
| APSO - 25 | 58,64 | 44,97 - 76,46 |
| APSO - 26 | 16,38 | 11,57 - 23,19 |
| APSO - 27 | 21,90 | 16,86 - 28,43 |
| APSO - 28 | 35,61 | 24,00 - 52,83 |

CC₅₀: Concentração que reduz em 50 % a viabilidade celular. CI95%: Intervalo de confiança de 95%.

De acordo com os valores de CC₅₀, o composto APSO-21 foi a que demonstrou menores efeitos citotóxicos frente as células VERO (108,8 - 184,0 µM), enquanto os outros cardenolídeos apresentaram valores inferiores a 66,58 µM, sendo APSO-26 e APSO-27 as mais citotóxicas, apresentando valores de CC₅₀ de 16,38 e 21,90 µM, respectivamente.

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HERPÉTICA

Neste trabalho, foi realizada a triagem da ação anti-herpética dos oito derivados semissintéticos de cardenolídeos frente ao HSV-1, cepa KOS. Na triagem anti-herpética realizada, as amostras foram, inicialmente, testadas em duas concentrações sabidamente não citotóxicas de 2,0 e 1,0 µM, apontados pelo ensaio prévio de SRB, utilizando células VERO. Os resultados são expressos como porcentagem de inibição da infecção viral e, podem ser visualizados na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados da triagem anti-herpética (anti-HSV-1, cepa KOS) dos derivados triazólicos O-glicosídicos da digitoxigenina.

| Composto | % de inibição de replicação viral | |
|-----------|-----------------------------------|---------------|
| | [] 2 μ M | [] 1 μ M |
| APSO - 21 | 18,5 | 19,3 |
| APSO - 22 | 13,5 | 12,7 |
| APSO - 23 | 9,8 | 9,1 |
| APSO - 24 | 9,1 | 10,5 |
| APSO - 25 | 9,8 | 13,5 |
| APSO - 26 | 93,5 | 49,1 |
| APSO - 27 | 37,5 | 17,1 |
| APSO - 28 | 56,4 | 36 |

Portanto, foi observado a partir desta triagem que as amostras APSO-26 e APSO-28 demonstraram uma maior atividade anti-herpética, pois foram as amostras que apresentaram uma maior porcentagem de inibição da replicação viral, em concentrações não citotóxicas. Além de uma redução do número de UFP, esses dois compostos exerceram uma redução expressiva no tamanho dos focos virais, se comparados aos focos dos controles virais e das cavidades onde foram aplicadas as outras amostras, inferindo uma possível ação inibitória na propagação viral célula-célula.

Posterior à realização da citotoxicidade e da triagem antiviral inicial, as amostras APSO-26 e APSO-28 serão submetidas a uma nova avaliação da atividade anti-herpética, passando por diluições seriadas (1:2) com o intuito de determinar seus valores de CI_{50} , ou seja, a concentração do composto que inibirá 50% da replicação viral. De posse dos valores de CC_{50} e CI_{50} , será possível calcular o índice de seletividade ($IS = CC_{50}/CI_{50}$) destas amostras, indicando assim o quão seletivas elas são para o vírus testado.

5 DISCUSSÃO

Os compostos de origem natural foram e ainda continuam sendo amplamente utilizados como fonte de diversas e complexas estruturas, as quais deram e dão origem a inúmeros fármacos que apresentam atividade biológica e/ou farmacológica (BERTELLI et al., 2020b; KLUSKA; WOŹNIAK, 2021; NGUYEN et al., 2021; SEMWAL et al., 2021). Dentre eles estão os cardenolídeos, os quais fazem parte do grupo dos heterosídeos cardioativos, utilizados para o tratamento de doenças cardíacas devido sua específica e potente ação inotrópica positiva.

Recentemente, novas possibilidades foram apresentadas para utilização terapêutica dos cardenolídeos, os quais eram, tradicionalmente e quase que com exclusividade, utilizados para o tratamento de doenças cardíacas. Portanto, nos últimos anos, intensificou-se a investigação dos efeitos dessas substâncias em outras situações patológicas, como mostram estudos brasileiros que relatam a potencial atividade antiparasitária destas moléculas (FREITAS et al., 2021a, 2021b), além de efeitos antivirais, citotóxicos e antitumorais descritos na literatura (LI et al., 2021; MENESES-SAGRERO et al., 2021; MUNKERT et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2021).

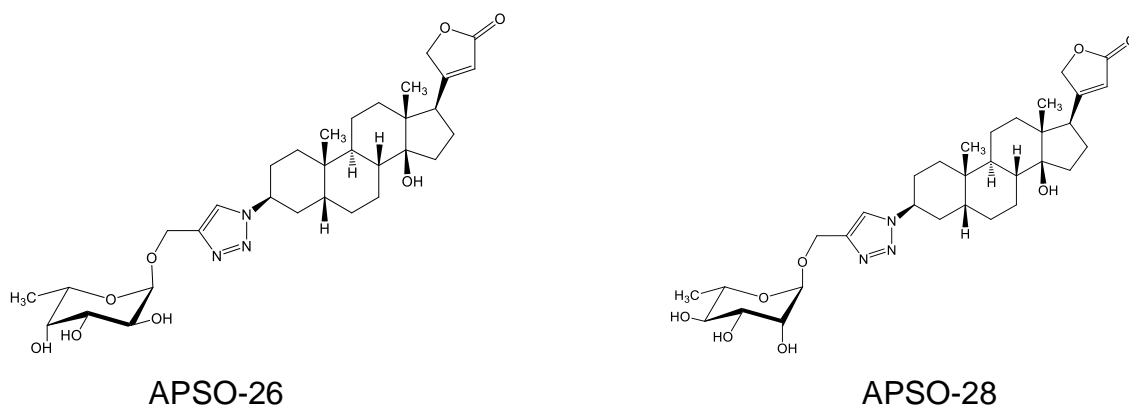
O Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) da UFSC, onde este trabalho foi realizado, tradicionalmente vem apresentando diversos estudos e publicações em relação a avaliação da atividade antiviral, frente diferentes vírus, e citotóxica, frente a diversas células humanas, tanto tumorais quanto saudáveis. Afim de contribuir para descoberta de moléculas bioativas, as quais podem ser potenciais candidatas a novos fármacos e diferentes utilizações, produtos naturais e seus derivados semissintéticos vem sendo analisados por meio de diferentes estratégias experimentais (BERTOL et al., 2011; BOFF et al., 2019, 2020a, 2020b; SCHNEIDER et al., 2017, 2018).

Um derivado semissintético da digitoxigenina, AMANTADIG, ganhou destaque na avaliação citotóxica realizada pelo grupo de pesquisa (SILVA et al., 2018), o qual suprimiu de forma expressiva o crescimento de linhagens de células tumorais de rim e próstata, além de ter seu mecanismo de ação de morte celular proposto. Essa molécula apresenta em sua estrutura um átomo de nitrogênio especificamente posicionado na cadeia lateral do núcleo esteroidal do cardenolídeo ($R-NH-CH_2-C=O-3\beta-NH-DG$; $R=$

amantadina). Estudos de relação estrutura/atividade apontaram a relevância da presença de um átomo de nitrogênio ligado estereosseletivamente na posição C-3 do núcleo esteroidal, apto a efetuar uma interação do tipo ligação de hidrogênio com o sítio ativo, assim como a relevância do anel lactônico na posição C-17 β e da hidroxila C-14 β presentes na porção farmacofórica do cardenólídeo, indispensável para a atividade desse derivado.

Portanto, a partir de uma parceria já estabelecida e consolidada, o principal objetivo de estudo deste trabalho foi a análise das amostras cedidas pelos Profs. Drs. Rodrigo Maia de Pádua e Ricardo José Alves (ambos do Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da UFMG). Então, dentro de uma série de oito novos derivados semissintéticos, dois se destacaram em relação a sua atividade citotóxica e antiviral (APSO-26 e APSO-28), podendo ser selecionados para, futuramente, elucidação do mecanismo de ação de morte celular e atividade anti-herpética.

Figura 3 – Estruturas químicas dos compostos APSO-26 e APSO-28.



As diferenças estruturais dos cardenólídeos estão nos diferentes ligantes que se encontram, neste caso, no anel triazólico, ligado a porção aglicona da molécula. Esses diferentes ligantes podem modificar, aumentando ou diminuindo, a atividade de uma substância, não de maneira crucial, porém, modulando a farmacodinâmica e a farmacocinética.

Essas duas amostras apresentam um mesmo peso molecular, mudando apenas a sua conformação. Em relação as outras substâncias, também testadas, estas são as que apresentam um menor peso molecular. Essa conformação pode facilitar a ligação estereoquímica destas moléculas com o alvo e, devido aos resultados semelhantes, primariamente, seja o mesmo para as duas amostras, a Na^+/K^+ -ATPase.

A Na^+/K^+ -ATPase, principal alvo dos cardenolídeos por meio da ligação destes a subunidade alfa enzimática, desempenha um importante papel na homeostase iônica celular (CORNELIUS; MAHMMOUD, 2009), pois é responsável pelo estabelecimento e manutenção do gradiente eletroquímico, essencial para a replicação celular e outros processos fisiológicos.

Além disso, os cardenolídeos também estão associados a criação de um ambiente desfavorável para a replicação viral, devido a essa ligação e inibição a Na^+/K^+ -ATPase (YANG et al., 2018). Novamente, as amostras mais ativas foram APSO-26 e APSO-28, o que corrobora essas colocações e, aponta certa afinidade de alvo molecular.

6 CONCLUSÕES

Os compostos APSO-26 e APSO-28 foram os que demonstraram a maior atividade citotóxica, já que apresentaram os menores valores de CC_{50} para as células de linhagens tumorais, sendo que as células de câncer de pulmão, A549 e H460, foram as que apresentaram maior sensibilidade. Para avaliar a seletividade dos compostos, em relação as células tumorais, os índices de seletividade foram calculados, levando em consideração os valores de CC_{50} obtidos no ensaio de citotoxicidade utilizando células não tumorais, VERO. Então, confirmou-se a seletividade destes compostos em relação às células tumorais.

Outra atividade observada, por meio do ensaio de inibição da formação de placas de lise, foi a atividade anti-herpética. Os compostos APSO-26 e APSO-28 demonstraram uma maior atividade anti-herpética, pois foram estes que apresentaram uma maior porcentagem de inibição da replicação viral nos testes de triagem. Os índices de seletividade serão calculados oportunamente após a determinação dos valores de CI_{50} .

Essa série inédita de cardenólídeos semissintéticos apresenta resultados promissores, destacando dois compostos que podem ser considerados moléculas bioativas com potencial para seguir a próximas etapas no processo de P&D de um novo fármaco, a fim de continuar contribuindo para o aumento do conhecimento nesta área e, surgindo como novas alternativas terapêuticas.

REFERÊNCIAS

- ASHBROOK, A. W. et al. Antagonism of the sodium-potassium ATPase impairs chikungunya virus infection. **mBio**, v. 7, n. 3, p. 1–14, 2016.
- AZAB, A.; NASSAR, A.; AZAB, A. N. Anti-inflammatory activity of natural products. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1–19, 2016.
- BALTINA, L. A. et al. Antiviral activity of glycyrrhizic acid conjugates with amino acid esters against Zika virus. **Virus Research**, v. 294, n. March 2020, p. 198290, 2021.
- BERTELLI, M. et al. Hydroxytyrosol: A natural compound with promising pharmacological activities. **Journal of Biotechnology**, v. 309, n. September 2019, p. 29–33, 2020a.
- BERTELLI, M. et al. Hydroxytyrosol: A natural compound with promising pharmacological activities. **Journal of Biotechnology**, v. 309, n. December 2019, p. 29–33, 2020b.
- BERTOL, J. W. et al. Antiherpes activity of glucoevatromonoside, a cardenolide isolated from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata*. **Antiviral Research**, 2011.
- BOFF, L. et al. Potential anti-herpes and cytotoxic action of novel semisynthetic digitoxigenin-derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2019.
- BOFF, L. et al. Semisynthetic cardenolides acting as antiviral inhibitors of influenza A virus replication by preventing polymerase complex formation. **Molecules**, v. 25, n. 20, 2020^a.
- BOFF, L. et al. Elucidation of the mechanism of anti-herpes action of two novel semisynthetic cardenolide derivatives. **Archives of Virology**, 2020b.
- BOFF, L. et al. Investigation of the cytotoxic activity of two novel digitoxigenin analogues on H460 lung cancer cells. **Anti-Cancer Drugs**, p. 452–462, 2020c.
- BRADSHAW, M. J.; VENKATESAN, A. Herpes Simplex Virus-1 Encephalitis in Adults: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. **Neurotherapeutics**, v. 13, n. 3, p. 493–508, 2016.
- BRASIL. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Ministério da Saúde. Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-decancer-no-brasil.pdf>. Acesso em 25 de fevereiro de 2022.
- BURLESON, F. G.; CHAMBERS, T. M.; WIEDBRAUK, D. L. **Virology: a laboratory**

manual. [s.l.] San Diego: Academic, 1992.

BURREL, S. et al. Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant corneal HSV-1 isolates from immunocompetent patients with recurrent herpetic keratitis. **Journal of Clinical Virology**, v. 58, n. 1, p. 321–324, 2013.

CAI, H. et al. Digitoxin analogues with improved anticytomegalovirus activity. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, n. 4, p. 395–399, 2014.

CAO, H. et al. Systematic Drug Repositioning By Integrating Transcriptome and Historical Clinical Data, Identification of Digoxin As a Novel Drug Reposition Candidate for High-Risk Myelodysplastic Syndromes. **Blood**, v. 126, n. 23, p. 4118–4118, 2015.

CAOHUY, H. et al. Common cardiac medications potently inhibit ACE2 binding to the SARS-CoV-2 Spike, and block virus penetration and infectivity in human lung cells. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2021.

CHANG, H. S. et al. Cytotoxic cardenolide glycosides from the root of *Reevesia formosana*. **Phytochemistry**, v. 87, p. 86–95, 2013.

CORNELIUS, F.; MAHMMOUD, Y. A. Interaction between cardiotonic steroids and Na,K-ATPase. Effects of pH and ouabain-induced changes in enzyme conformation. **Biochemistry**, v. 48, n. 42, p. 10056–10065, 2009.

CRAGG, G. M. et al. Natural products drug discovery and development. The United States national cancer institute role. In: **Phytochemicals in Human Health Protection, Nutrition, and Plant Defense**, Romeo, (ed.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. [s.l.: s.n.]. p. 1–29.

DAMOUR, A. et al. Eczema Herpeticum: Clinical and Pathophysiological Aspects. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, 2019.

DE MARTEL, C. et al. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. **The Lancet Global Health**, v. 8, n. 2, p. e180–e190, 2020.

DIEDERICH, M.; MULLER, F.; CERELLA, C. Cardiac glycosides: From molecular targets to immunogenic cell death. **Biochemical Pharmacology**, v. 125, p. 1–11, 2017.

EL-SEEDI, H. R. et al. Cardenolides: Insights from chemical structure and pharmacological utility. **Pharmacological Research**, v. 141, n. December 2018, p. 123–175, 2019.

ELBAZ, H. A. et al. Digitoxin and a synthetic monosaccharide analog inhibit cell viability in lung cancer cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 258, n. 1, p. 51–60, 2012.

FARAH, M. A. et al. Silver nanoparticles synthesized from *Adenium obesum* leaf extract induced DNA damage, apoptosis and autophagy via generation of reactive oxygen species. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 141, p. 158–169, 2016.

FELIPPE GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, C. et al. Na/K Pump and Beyond: Na/K-ATPase as a Modulator of Apoptosis and Autophagy. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 22, n. 4, p. 1–18, 2017.

FERLAY, J et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today>. Acesso em 25 de fevereiro de 2021.

FREITAS, C. S. et al. Digitoxigenin presents an effective and selective antileishmanial action against *Leishmania infantum* and is a potential therapeutic agent for visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 120, n. 1, p. 321–335, 2021a.

FREITAS, C. S. et al. In vitro and in vivo antileishmanial activity of β -acetyl-digitoxin, a cardenolide of *Digitalis lanata* potentially useful to treat visceral leishmaniasis. **Parasite**, v. 28, 2021b.

FUERSTENWERTH, H. On the differences between ouabain and digitalis glycosides. **American Journal of Therapeutics**, v. 21, n. 1, p. 35–42, 2014.

GAYED, B. A. et al. Digoxin Inhibits Blood Vessel Density and HIF-1 α Expression in Castration-Resistant C4-2 Xenograft Prostate Tumors. **Clinical and Translational Science**, v. 5, n. 1, p. 39–42, 2012.

GENG, X. et al. Cardiac glycosides inhibit cancer through Na/K-ATPase-dependent cell death induction. **Biochemical Pharmacology**, v. 182, n. July, p. 114226, 2020.

GROSSO, F. et al. Suppression of Adenovirus Replication by Cardiotonic Steroids. **Journal of Virology**, v. 91, n. 3, p. 1–16, 2017.

GUEUDRY, J. et al. Acyclovir-resistant varicella-zoster virus keratitis in an immunocompetent patient. **Journal of Clinical Virology**, v. 58, n. 1, p. 318–320, 2013.

GUPTA, R.; WARREN, T.; WALD, A. Genital herpes. **Lancet**, v. 370, n. 9605, p. 2127–2137, 2007.

JOURDAN, J. P. et al. Drug repositioning: a brief overview. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 72, n. 9, p. 1145–1151, 2020.

KIRTONIA, A. et al. Repurposing of drugs: An attractive pharmacological strategy for cancer therapeutics. **Seminars in Cancer Biology**, v. 68, n. April 2020, p. 258–278, 2021.

KLUSKA, M.; WOŹNIAK, K. Natural polyphenols as modulators of etoposide anti-cancer

activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, 2021.

KOLK, T. VAN DER et al. Topical ionic contra-viral therapy comprised of digoxin and furosemide as a potential novel treatment approach for common warts. p. 2088–2090, 2017.

KUKHANOVA, M. K.; KOROVINA, A. N.; KOCHETKOV, S. N. Human herpes simplex virus: Life cycle and development of inhibitors. **Biochemistry (Moscow)**, v. 79, n. 13, p. 1635–1652, 2014.

LI, X. et al. Oleandrin, a cardiac glycoside, induces immunogenic cell death via the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP pathway in breast cancer. **Cell Death and Disease**, v. 12, n. 4, 2021.

MENESES-SAGRERO, S. E. et al. Antiproliferative activity of cardenolides on cell line A549: structure–activity relationship analysis. **Molecular Diversity**, v. 25, n. 4, p. 2289–2305, 2021.

MENGER, L. et al. Trial watch: Cardiac glycosides and cancer therapy. **Oncolimmunology**, v. 2, n. 2, p. 37–41, 2013.

MUNKERT, J. et al. Production of the Cytotoxic Cardenolide Glucoevatromonoside by Semisynthesis and Biotransformation of Evatromonoside by a Digitalis lanata Cell Culture. **Planta Medica**, v. 83, n. 12–13, p. 1035–1043, 2017.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

NGUYEN, M. T. T. et al. Calosides A-F, Cardenolides from *Calotropis gigantea* and Their Cytotoxic Activity. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 2, p. 385–391, 2020.

NGUYEN, N. H. et al. Triterpenoids from the genus *Gynostemma*: Chemistry and pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 268, n. May 2020, p. 113574, 2021.

PATEL, S. ScienceDirect Plant-derived cardiac glycosides : Role in heart ailments and cancer management. v. 84, p. 1036–1041, 2016.

PECIO, L. et al. Cytotoxic Cardenolides from the Leaves of *Acokanthera oblongifolia* 1. **Planta Medica**, v. 85, n. 11–12, p. 965–972, 2019.

PILLAIYAR, T. et al. A medicinal chemistry perspective of drug repositioning: Recent advances and challenges in drug discovery. **European Journal of Medicinal**

Chemistry, v. 195, p. 112275, 2020.

PLANTE, K. et al. Prophylactic and Therapeutic Inhibition of In Vitro SARS-CoV-2 Replication by Oleandrin. **bioRxiv : the preprint server for biology**, 2020.

PLANTE, K. S. et al. Antiviral activity of oleandrin and a defined extract of Nerium oleander against SARS-CoV-2. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 138, n. February, p. 111457, 2021.

PRASSAS, I.; DIAMANDIS, E. P. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 11, p. 926–935, 2008.

PUSHPAKOM, S. et al. Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 1, p. 41–58, 2018.

REDDY, D. et al. Peruvoside targets apoptosis and autophagy through MAPK Wnt/ β -catenin and PI3K/AKT/mTOR signaling pathways in human cancers. **Life Sciences**, v. 241, p. 117147, 2020.

REN, Y. et al. Na⁺/K⁺-ATPase-Targeted Cytotoxicity of (+)-Digoxin and Several Semisynthetic Derivatives. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 638–648, 2020.

RIJSBERGEN, M. et al. A randomized controlled proof-of-concept trial of digoxin and furosemide in adults with cutaneous warts. **British Journal of Dermatology**, v. 180, n. 5, p. 1058–1068, 2019.

SCHNEIDER, N. F. Z. et al. Cytotoxic effects of the cardenolide convallatoxin and its Na,K-ATPase regulation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 428, n. 1–2, p. 23–39, 2017.

SCHNEIDER, N. F. Z. et al. Cytotoxic and cytostatic effects of digitoxigenin monodigitoxoside (DGX) in human lung cancer cells and its link to Na,K-ATPase. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 97, n. September 2017, p. 684–696, 2018.

SCHNEIDER, N. F. Z. et al. Cytotoxicity of glucoevatromonoside alone and in combination with chemotherapy drugs and their effects on Na⁺,K⁺-ATPase and ion channels on lung cancer cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 476, n. 4, p. 1825–1848, 2021.

SEMWAL, R. B. et al. Emodin - A natural anthraquinone derivative with diverse pharmacological activities. **Phytochemistry**, v. 190, n. June, p. 112854, 2021.

SILVA, I. T. et al. Cytotoxicity of AMANTADIG – a semisynthetic digitoxigenin derivative – alone and in combination with docetaxel in human hormone-refractory prostate cancer cells and its effect on Na⁺/K⁺-ATPase inhibition. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 107, n. August, p. 464–474, 2018.

SIMÕES, C. M. O.; AMOROS, M.; GIRRE, L. Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 4, p. 323–328, 1999.

ŠKUBNÍK, J. et al. Repurposing cardiac glycosides: Drugs for heart failure surmounting viruses. **Molecules**, v. 26, n. 18, 2021.

SONAYE, H. V.; SHEIKH, R. Y.; DOIFODE, C. A. Drug repurposing: Iron in the fire for older drugs. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 141, p. 111638, 2021.

SOUZA E SOUZA, K. F. C. et al. Na⁺/K⁺-ATPase as a Target of Cardiac Glycosides for the Treatment of SARS-CoV-2 Infection. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, n. April, p. 1–14, 2021.

STRASFELD, L.; CHOU, S. Antiviral drug resistance: Mechanisms and clinical implications. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 24, n. 3, p. 809–833, 2010.

SU, C. T. et al. Anti-HSV activity of digitoxin and its possible mechanisms. **Antiviral Research**, v. 79, n. 1, p. 62–70, 2008.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

TEIXEIRA, M. P. et al. In vitro antitumoral effects of the steroid ouabain on human thyroid papillary carcinoma cell lines. **Environmental Toxicology**, v. 36, n. 7, p. 1338–1348, 2021.

TURANLI, B. et al. Systems biology based drug repositioning for development of cancer therapy. **Seminars in Cancer Biology**, v. 68, n. July 2019, p. 47–58, 2021.

VAN VELZEN, M. et al. Acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 in intra-ocular fluid samples of herpetic uveitis patients. **Journal of Clinical Virology**, v. 57, n. 3, p. 215–221, 2013.

WANG, S. et al. Efficient establishment of reactivatable latency by an acyclovir-resistant herpes simplex virus 1 thymidine kinase substitution mutant with reduced neuronal replication. **Virology**, v. 556, n. January, p. 140–148, 2021.

WANG, Y. et al. Cardiac glycosides induce autophagy in human non-small cell lung cancer cells through regulation of dual signaling pathways. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 44, n. 11, p. 1813–1824, 2012.

WONG, R. W. et al. Digoxin Suppresses HIV-1 Replication by Altering Viral RNA Processing. v. 9, n. 3, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Cancer. Disponível em:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acesso em 25 de fevereiro de 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Herpes simplex virus. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>. Acesso em 25 de fevereiro de 2022.

XUE, H. et al. Review of drug repositioning approaches and resources. **International Journal of Biological Sciences**, v. 14, n. 10, p. 1232–1244, 2018.

YANG, C. W. et al. The cardenolide ouabain suppresses coronaviral replication via augmenting a Na⁺/K⁺-ATPase-dependent PI3K/PDK1 axis signaling. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 356, n. July, p. 90–97, 2018.

YANG, C. W. et al. Natural cardenolides suppress coronaviral replication by downregulating JAK1 via a Na⁺/K⁺-ATPase independent proteolysis. **Biochemical Pharmacology**, v. 180, n. April, p. 114122, 2020.

APÊNDICE

Capítulo de livro publicado

CADAMURO, R. D. ; ROGOVSKI, P. ; PRA, I. D. ; GUTERRES, I. Z. ; CAMARGO, A. F. ; BONATTO, C. ; SCAPINI, T. ; STEFANSKI, F. S. ; FONSECAC, T. G. ; MASS, A. P. ; MICHELON, WILLIAM ; VIANCELLI, A. ; CRUZ, A. C. C. ; TREICHEL, H. ; **SILVA, I.T.** ; FONGARO, GISLAINE . Chapter 14 - Trends in biofiltration applied to remove pharmaceuticals and personal care products from wastewater. In: Maulin Shah; Susana Rodriguez-Couto; Jayanta Biswas. (Org.). An Innovative Role of Biofiltration in Wastewater Treatment Plants (WWTPs). 1ed.: Elsevier, 2022, v., p. 267-284.

Resumos publicados em anais de congressos

GUTERRES, I. Z. ; OTTONI, F. M. ; ALVES, R. J. ; PÁDUA, R.M ; **SILVA, I.T.** . Cytotoxic evaluation of new triazole glycosides of digitoxigenin against lung cancer. In: IV Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Farmácia, 2019, Florianópolis. IV Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Farmácia, 2019.

SILVA, R. ; PAVI, C. P. ; PRA, I. D. ; SAVI, B. P. ; SOUZA, E. B. ; CADAMURO, R. D. ; ROGOVSKI, P. ; GUTERRES, I. Z. ; REIS, J. G. ; SILVA, V. C. ; SILVA, S. S. F. ; SOUZA, D. S. M. ; CRUZ, A. C. C. ; SILVA, I.T. ; FONGARO, G. . Virall brazil: brazilian virology network focused on one health approach. In: XXXI Congresso Brasileiro de Virologia & XV Encontro de Virologia do Mercosul, 2020, Online. XXXI Congresso Brasileiro de Virologia & XV Encontro de Virologia do Mercosul, 2020.

TOMASI, M. L. M. ; GUTERRES, I. Z. ; PRA, I. D. ; BATTISTI, M. A. ; DE CAMPOS, A. M. ; SILVA, I. T. . Antiherpes activity of standardized extract of Ilex paraguariensis A. ST. Hil.. In: XXXI Congresso Brasileiro de Virologia & XV Encontro de Virologia do Mercosul, 2020, Online. XXXI Congresso Brasileiro de Virologia & XV Encontro de Virologia do Mercosul, 2020.