

CAROLINA FILGUEIRAS SANCHEZ

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DA LECTINA CYANOVIRIN-N CONTRA O
VÍRUS HERPES SIMPLEX TIPO 2 *IN VITRO*.



**Monografia apresentada ao
Instituto de Microbiologia Paulo
de Góes, da Universidade Federal
do Rio de Janeiro, como pré-
requisito para a obtenção do grau
de Bacharel em Ciências
Biológicas: Microbiologia e
Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO/2025

Trabalho realizado no Instituto de
Biologia, UFRJ, sob a orientação do
Professor Amilcar Tanuri e da Professora
Luiza Higa e coorientação do Dr. Fábio
Luís Lima Monteiro.

CIP - Catalogação na Publicação

S211a Sanchez, Carolina Filgueiras
Análise da atividade antiviral da lectina
Cyanovirin-N contra o vírus Herpes simplex tipo 2 in
vitro. / Carolina Filgueiras Sanchez. -- Rio de
Janeiro, 2025.
80 f.
Orientador: Amílcar Tanuri.
Coorientador: Fábio Luis Lima Monteiro.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2025.
1. Antiviral. 2. Lectina. 3. HSV-2. 4.
Cianovirina. 5. Aciclovir. I. Tanuri, Amílcar,
orient. II. Monteiro, Fábio Luis Lima, coorient.
III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

ALUNO(A): CAROLINA FILGUEIRAS SANCHEZ

DRE: 122057676

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Maria Teresa Villela Romanos (Presidente)
Prof. Rômulo Neris
Prof. Suelen Dias
Prof. Luciana Jesus da Costa (Suplente)

Título da Monografia: "Análise da atividade antiviral da lectina Cyanovirin-N contra o vírus herpes simplex tipo 2 *in vitro*."

Local: Anfiteatro Celuta Sales Alviano, IMPG-CCS-UFRJ

Data e hora de início: 09 de DEZEMBRO de 2025 às 13:30 horas.

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 9,2 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 9 de dezembro de 2025.

NOTA:

9,0

Banca Examinadora:

Maria Teresa Villela Romanos

Prof. Maria Teresa Villela Romanos (Presidente)

9,0

Rômulo Neris Silva Neris

Prof. Rômulo Neris

9,5

Suelen da Silva Gomes Dias

Prof. Suelen Dias

Prof. Luciana Jesus da Costa (Suplente)

Carolina Filgueiras Sanchez

Aluno(a):

Carolina Filgueiras Sanchez

**Orientador(a)
(e coorientador):**

Luiza Mendonça Higa

Prof. Luiza Higa e Fábio Monteiro

**Coordenadora de
TCC:**

Marinella Silva Laport

Profa. Marinella Silva Laport

Dedico esta monografia, resultado de intensa pesquisa científica, aos meus pais, que sempre lutaram para que eu chegasse aonde estou e continuam me apoiando para que eu alcance patamares ainda mais elevados.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus **pais** por tudo o que sou e por cada conquista alcançada até aqui. Pode parecer um clichê, e talvez realmente seja, mas sem eles eu não seria nada. Com eles aprendi o verdadeiro sentido das coisas, a encontrar motivos para seguir em frente e a enxergar direção mesmo quando o caminho parecia mais tortuoso e íngreme. Foram eles que, com amor e dedicação, colocaram flores ao longo da minha trajetória. Desde sempre trabalharam incansavelmente para me sustentar e cuidar de mim, lembro que, com apenas 16 dias de vida, descobriram minha alergia à lactose, e cada lata de leite especial custava mais de 300 reais. Até hoje, continuam trabalhando arduamente para me ajudar a conquistar meus sonhos, mas acredito que o maior desejo deles já se realizou: ver a filha formada pela Minerva, a melhor do Brasil. Meu pai deveria estar ao meu lado na minha colação de grau, pois parte deste diploma é dele. Durante quatro anos, ele acordou às 5h para me levar até meus pontos de carona e sempre esteve à disposição para me buscar, independentemente de onde eu estivesse na volta, aguardando-me “pacientemente” no local combinado. E a outra metade deste diploma é dedicada à minha mãe, que sempre se esforçou para me sustentar durante a faculdade, garantindo que eu nunca ficasse sem almoço, lanche ou o valor da carona. Isso aqui é unicamente para vocês! Independentemente do meu dia e do meu humor (variável), vocês sempre querem saber sobre meu trabalho, se o experimento deu certo ou errado, se trabalhei muito. Esses quatro anos foram graças a vocês e por vocês. Um dia irei retribuir tudo que fizeram por mim, e saibam que vocês são motivo do meu orgulho, assim como eu sou motivo do orgulho de vocês. Vocês são o motivo do meu sucesso.

À minha **avó materna**, Cici, deixo meu mais sincero agradecimento por estar sempre ao meu lado nessa caminhada, demonstrando interesse pelo meu dia a dia e compartilhando com orgulho cada conquista minha com toda a família. Admiro nossas conversas, até mesmo quando debatemos sobre Deus e evolução, e, ainda que a senhora não compartilhe das mesmas bases em que acredito, nunca deixou de se interessar pelos meus estudos e conhecimentos. Aos meus **avós paternos**, deixo meu profundo agradecimento. Ao meu avô, pelo carinho e interesse constantes - mesmo aos 91 anos, sempre me pergunta sobre meu trabalho e me parabeniza pelos estudos e dedicação. À minha avó Grécia, minha admiração eterna: mesmo enfrentando o Alzheimer, a senhora sempre tenta se lembrar de mim e dos meus estudos, deixando claro, todas as vezes, que o seu maior sonho é me ver formada e a senhora na primeira fileira.

Ao meu namorado, **Daniel**, agradeço imensamente pela paciência em me acompanhar nesses meses em que tudo o que eu sabia fazer era surtar com o pré-TCC e com o TCC. Obrigada

por me chamar, com tanto carinho, de “dona do SUS” e por tentar compreender, mesmo que sem muito sucesso, os meus experimentos e explicações confusas. Até hoje ainda sou surpreendida por pessoas que vêm me perguntar sobre meus estudos, porque meu namorado contou que eu estava descobrindo a cura da herpes (quem me dera!), agradeço pela confiança no meu potencial.

Agradeço à minha segunda família do **LVM**, pessoas em quem sempre pude confiar diante de qualquer imprevisto. Passamos nossas tardes discutindo os assuntos mais científicos possíveis, mas também conseguíamos falar sobre coisas que até crianças de cinco anos achariam imaturas.

Fábio, meu coorientador, muito obrigada por me ensinar desde os experimentos mais básicos até os mais complexos, e por fazê-lo de maneira que eu pudesse aprender sua organização e rigor em biossegurança, tornando-me, de certa forma, sua “cópia” nesse sentido. Você fez toda a diferença na minha formação como pesquisadora, guiando meus passos, ajudando a planejar experimentos e, claro, compartilhando as fofquinhas do dia a dia.

Luiza, minha atual orientadora, quero expressar minha gratidão por ter se responsabilizado por mim e pelo meu projeto mesmo em um momento tão crítico, precisando se atualizar sobre tudo no último minuto do segundo tempo. Estou especialmente feliz por poder ser orientada por você nesta nova fase, já que desde sempre fui considerada 'filha de Luiza' pela minha forma de agir.

E, por fim, meu mais sincero agradecimento ao meu orientador, **Amílcar Tanuri**, por ter me aceitado há três anos, mesmo sendo um pesquisador extremamente renomado e requisitado. Lembro-me de um dos meus primeiros dias no laboratório: no meu primeiro experimento, você começou a me explicar como descolorir um gel de poliacrilamida, como se fosse algo simples, enquanto para mim parecia a tarefa mais “difícil” do mundo. Naquele momento pensei: “meu Deus, esse homem está falando grego, nunca vou alcançar o nível de conhecimento dele”. Mas você colocou a mão na massa, me mostrou o passo a passo - colocar álcool etílico e levar ao micro-ondas por 30 segundos - e, com isso, me deu meu primeiro aprendizado prático.

Depois vinham as nossas reuniões de cinco minutos, das quais eu saía pensando: “nunca vou me adaptar ao raciocínio acelerado dele”. Porém, ao longo desses três anos, aprendi não apenas a descolorir um gel, mas também a acompanhar, à minha maneira, o raciocínio de um verdadeiro gênio. Tive o privilégio de conviver com o mais incrível pesquisador que já conheci e, mais do que isso, tive a honra de ser alguém em quem você acreditou. Você planejou

caminhos para mim, acreditou no meu futuro e me incentivou a desenvolver meus conhecimentos em biologia molecular, microbiologia e imunologia.

Obrigada por confiar em mim, por apostar em mim até o fim e por mostrar que a grandeza de um pesquisador não está apenas no conhecimento, mas também na generosidade em compartilhá-lo.

EPÍGRAFE

"Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico: é, também, uma criança colocada à frente de fenômenos naturais que impressionam como se fossem um conto de fadas."

- Marie Curie

RESUMO

Carolina Filgueiras Sanchez

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DA LECTINA CYANOVIRIN-N CONTRA O VÍRUS HERPES SIMPLEX TIPO 2 *IN VITRO*.

Orientadores: Amilcar Tanuri e Luiza Higa

Coorientador: Fábio Monteiro

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

A Cyanovirin-N (CV-N) foi a primeira lectina antiviral descrita a ser isolada de uma cianobactéria, especificamente da espécie *Nostoc ellipsosporum*, durante um programa de busca por compostos naturais com atividade anti-HIV. A CV-N demonstrou ampla atividade antiviral contra vírus envelopados, como HIV-1/SIV, vírus Ebola (EBOV), e os vírus Influenza A e B, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Nesse contexto, a CV-N emergiu como uma ferramenta terapêutica inovadora durante a pandemia de COVID-19. Nosso grupo descreveu a atividade da CV-N contra o SARS-CoV-2, tanto em modelos *in vitro* quanto em ensaio de infecção em hamsters, com resultados promissores: observou-se uma redução significativa da carga viral nos pulmões dos animais tratados e uma redução do processo inflamatório em comparação com os animais não-tratados. Com base nesses dados, o presente projeto teve como objetivo ampliar o espectro antiviral da CV-N, com foco na avaliação de sua eficácia contra o vírus herpes simplex tipo 2 (HSV-2). Até o momento, a atividade contra HSV-2 não havia sido explorada, o que torna essa abordagem relevante, especialmente considerando sua alta prevalência na população global e o aumento de relatos clínicos de resistência ao aciclovir, terapia de primeira linha. Para isso, os efeitos antivirais e citotóxicos da CV-N são investigados utilizando ensaios de viabilidade celular e neutralização viral, nos quais o CC₅₀ corresponde à concentração que reduz em 50% a viabilidade celular, enquanto o IC₅₀ indica a concentração capaz de inibir 50% da infecção viral. Como resultado, a CV-N apresentou valores de CC₅₀ de 52.75 nM e IC₅₀ de 1,586 nM em VERO CCL-81, resultando em um índice de seletividade (SI) elevado- 33.25. A atividade significativa contra HSV-2 destaca o potencial da CV-N como uma candidata promissora para o desenvolvimento de novos antivirais direcionados a herpesvírus, mostrando-se ainda mais eficaz contra HSV-2 em comparação ao HSV-1 (SI de 33,25 e 17,07, respectivamente), sendo importante destacar a necessidade de estudos futuros incluindo modelos animais e o uso de células humanas pelas quais o vírus apresenta tropismo, a fim de fortalecer o desenvolvimento de aplicações clínicas.

Palavras-chave: Cianovirina; Antiviral; lectina antiviral; HSV-2; Aciclovir.

ABSTRACT

Carolina Filgueiras Sanchez

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DA LECTINA CYANOVIRIN-N CONTRA O VÍRUS HERPES SIMPLEX TIPO 2 *IN VITRO*.

Orientadores: Amilcar Tanuri e Luiza Higa

Coorientador: Fábio Monteiro

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Cyanovirin (Cyanovirin-N – CV-N) was the first antiviral protein described to be isolated from a cyanobacterium, specifically *Nostoc ellipsosporum*, during a screening program for natural compounds with anti-HIV activity. This study aimed not only to identify new antiviral substances but also to broaden the understanding of the mechanisms of action against HIV, which, until then, remained poorly elucidated. CV-N demonstrated broad-spectrum antiviral activity, with proven efficacy against HIV-1/SIV, Ebola virus (EBOV), and Influenza A and B viruses, both *in vitro* and *in vivo*. In this context, CV-N emerged as a valuable research tool during the SARS-CoV-2 pandemic. Our group described CV-N activity against SARS-CoV-2, both in *in vitro* models and in hamster infection assays, yielding promising results: a significant reduction in viral load was observed in the lungs of treated animals. Based on these data, the present project aimed to expand the antiviral scope of CV-N, with a particular focus on evaluating its efficacy against herpes simplex virus type 2 (HSV-2). Until now, its activity against HSV-2 had not been explored, which makes this approach relevant, especially considering the high global prevalence of HSV-2 and the increasing clinical reports of acyclovir resistance. To this end, we investigated the antiviral and cytotoxic effects of CV-N using cell viability and viral neutralization assays. As a result, CV-N exhibited CC₅₀ values of 52.75 nM and IC₅₀ of 1.586 nM, yielding a high selectivity index (SI). This outcome indicates that the lectin exerts potent antiviral activity at concentrations far below those that cause cytotoxicity, highlighting a broad therapeutic window. The significant activity against HSV-2 underscores the potential of CV-N as a promising candidate for the development of novel antivirals targeting herpesviruses.

Key-words: Cyanovirin-N; antiviral; antiviral lectin; HSV-2; Acyclovir.

RESUMO PARA LEIGOS

Carolina Filgueiras Sanchez

UMA SUPERMOLÉCULA QUE PODE BARRAR AS FERIDAS GENITAIS.

Orientadores: Amilcar Tanuri e Luiza Higa

Coorientador: Fábio Monteiro

Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

A cianovirina (CV-N) é uma proteína encontrada em uma bactéria aquática com capacidade de impedir que diversos vírus ataquem as células do corpo humano e provoquem as famosas viroses. A investigação inicial por cientistas sobre sua função contra o HIV, vírus causador da aids, descobriu que ela também pode combater outros vírus, como o vírus da gripe (Influenza), Ebola e o coronavírus da pandemia de COVID-19. Nesse sentido, com a chegada da pandemia em 2020, essa molécula tornou-se poderosa para os cientistas, para ajudar a encontrar novas formas de acabar a COVID-19, diminuindo as mortes e desemprego. Em experimentos feitos em laboratório e em hamsters, ela conseguiu reduzir bastante a quantidade do coronavírus nos pulmões, mostrando que pode ser uma grande aliada no combate a novas viroses. Agora, nós cientistas, decidimos testar se a cianovirina também funciona contra um vírus muito comum que causa incomodo para grande parte das pessoas: o herpes tipo 2, responsável por causar feridas dolorosas na região íntima. Esse vírus atinge milhões de pessoas em todo o mundo, e muitos tratamentos atuais já não funcionam mais, fazendo com que as pessoas continuem com essas feridas que doem. Após muita pesquisa os resultados foram animadores: a cianovirina conseguiu matar o vírus em laboratório, e fez isso em quantidades muito baixas — sem causar danos para as células. Isso mostra que ela tem tudo para virar um remédio forte contra essas

feridas genitais, principalmente aquelas infecções passadas pelo sexo que, até hoje, não têm cura.

LISTA DE ABREVIACÕES

AFP – Alfa-fetoproteína

AFP-L3 – Isoforma glicosilada da alfa-fetoproteína

AJ – *Adherens Junction* (Junção Aderente)

$\alpha\beta 5$, $\alpha\beta 6$, $\alpha\beta 8$ – Integrinas envolvidas na entrada do EBV em células epiteliais

AS – *Apical Surface* (Superfície Apical)

Asn – Asparagina

BMRF2 – Glicoproteína viral do EBV associada à interação com integrinas

CD21 – *Cluster of Differentiation* 21 (Receptor de Complemento Tipo 2 – CR2)

CD4 – *Cluster of Differentiation* 4

CD8 – *Cluster of Differentiation* 8

CFU – *Colony Forming Unit* (Unidade Formadora de Colônia)

ConA – Concavalina A

CR2 – *Complement Receptor Type 2* (Receptor de Complemento Tipo 2)

CRD – *Carbohydrate Recognition Domain* (Domínio de Reconhecimento de Carboidrato)

CV-N – *Cyanovirin-N*

CVNH – *Cyanovirin-N Homolog*

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol

DC-SIGN – *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA – Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

dsDNA – *Double-Stranded DNA* (DNA de Fita Dupla)

EBV – Epstein–Barr Virus (Vírus Epstein–Barr)

ED – Envelope Domain (Domínio do Envelope)

ED I, II, III – Domínios estruturais I, II e III da proteína E de flavivírus

EDTA – Ethylenediaminetetraacetic Acid (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético)

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ER – *Endoplasmic Reticulum* (Retículo Endoplasmático)

FBS – *Fetal Bovine Serum* (Soro Fetal Bovino)

FR2 / FR3 – *Functional Region 2 / 3* (Regiões funcionais da gB reconhecidas por anticorpos neutralizantes)

GalNAc – N-acetilgalactosamina

gB – Glicoproteína B
 gC – Glicoproteína C
 gD – Glicoproteína D
 gE – Glicoproteína E
 gG – Glicoproteína G
 gH – Glicoproteína H
 gI – Glicoproteína I
 gJ – Glicoproteína J
 gK – Glicoproteína K
 gL – Glicoproteína L
 gM – Glicoproteína M
 gN – Glicoproteína N
 GP – Glicoproteína
 GP64 – Glicoproteína 64 (Baculovírus)
 GPC – *Glycoprotein Complex* (Complexo de Glicoproteínas – Vírus de Lassa)
 gp42 – Glicoproteína 42 do EBV
 gp120 – Glicoproteína 120 do HIV
 gp350/220 – Principal glicoproteína de superfície do EBV
 gRNA – Guide RNA (RNA Guia)
 HA – Hemaglutinina
 HEK – *Human Embryonic Kidney* (Rim Embrionário Humano)
 HIV – *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)
 HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
 HSPG – *Heparan Sulfate Proteoglycan* (Proteoglicano de Sulfato de Heparana)
 HSV – *Herpes Simplex Virus* (Vírus Herpes Simples)
 HSV-1 – *Herpes Simplex Virus Type 1* (Vírus Herpes Simples Tipo 1)
 HSV-2 – *Herpes Simplex Virus Type 2* (Vírus Herpes Simples Tipo 2)
 HVEM – *Herpesvirus Entry Mediator* (Mediador de Entrada do Herpesvírus)
 IgG – Imunoglobulina G
 IgM – Imunoglobulina M
 LBA – *Lectin Binding Assay* (Ensaio de Ligação de Lectina)
 LPS – Lipopolissacarídeo

LS – *Lateral Surface* (Superfície Lateral)

MAC – *Membrane Attack Complex* (Complexo de Ataque à Membrana)

MBL – *Mannose-Binding Lectin* (Lectina Ligante de Manose)

MHC-II – *Major Histocompatibility Complex Class II* (Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II)

MERs-CoV – *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*

MHV – *Murine Hepatitis Virus*

MOI – *Multiplicity of Infection* (Multiplicidade de Infecção)

mRNA – *Messenger RNA* (RNA Mensageiro)

NaCl – Cloreto de Sódio

N-glicanas – Cadeias de glicanos ligadas a resíduos de asparagina por ligação N-glicosídica

NTD – *N-Terminal Domain* (Domínio N-terminal)

PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Solução Salina Tamponada com Fosfato)

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PmCTL-1 – *Pinctada maxima C-type lectin 1*

RNA – *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

RT-qPCR – *Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa com Transcrição Reversa)

SARS-CoV – *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*

SARS-CoV-2 – *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*

SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio)

TGN – *Trans-Golgi Network* (Rede Trans-Golgi)

TJD – *Tight Junction* (Junção Estreita) (*Obs.: sigla original TJ*)

TMD – *Transmembrane Domain* (Domínio Transmembranar)

TNF- α – *Tumor Necrosis Factor Alpha* (Fator de Necrose Tumoral Alfa)

VEA – *Vicia ervilia agglutinin*

Vero – *Verda Reno* (Células derivadas de rim de macaco verde africano)

VSV – *Vesicular Stomatitis Virus* (Vírus da Estomatite Vesicular)

WT – *Wild Type* (Tipo Selvagem)

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Características estruturais dos vírus envelopados e não envelopados.....	1
1.2.	Glicosilação das proteínas virais de superfície.....	2
1.3.	Proteínas de fusão viral.....	5
1.4.	Lectinas.....	9
1.4.1.	Lectinas com aplicações biotecnológicas	11
1.4.2.	Lectinas antivirais.....	13
1.5.	Cyanovirin-N.....	16
1.5.1.	Descoberta, isolamento e estrutura	16
1.5.2.	Atividade neutralizante da Cyanovirin-N e testes pré-clínicos	17
1.5.3.	Melhoramento de lectinas antivirais	19
1.5.4.	Lectinas homólogas a CV-N	21
1.6.	Família <i>Herpesviridae</i>	23
1.6.1.	Subfamília <i>Alphaherpesvirinae</i>	26
1.7.	Glicanas de HSV-1 e HSV-2	28
1.8.	Terapia vigente contra HSV-2 e emergência de resistência	30
2.	JUSTIFICATIVA.....	32
3.	OBJETIVOS	34
3.1.	Objetivo geral.....	34
3.2.	Objetivos específicos.....	34
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1.	Linhagens celulares	35
4.2.	Análise da citotoxicidade da CV-N <i>in vitro</i>	35
4.3.	Ensaio de propagação viral.....	36
4.4.	Titulação por ensaio de placa de lise.....	37
4.5.	Back Titration	38
4.6.	Ensaio de neutralização viral por redução de placa de lise.....	39
4.7.	Imunofluorescência.....	40

4.8.	Citometria.....	41
5.	RESULTADOS.....	42
5.1.	HSV-2 foi efetivamente propagado em cultura de células Vero CCL-81.....	42
5.2.	As linhagens celulares humanas HeLa e RPMI apresentam maior tolerância à CV-N que as células Vero	43
5.3.	A CV-N foi capaz de neutralizar a infecção por HSV-2 na linhagem Vero CCL-81	45
5.4.	CV-N reduz a porcentagem de células infectadas por HSV-2.....	48
6.	DISCUSSÃO	49
7.	CONCLUSÃO.....	54
8.	REFERÊNCIAS.....	56

1. INTRODUÇÃO

1.1. Características estruturais dos vírus envelopados e não envelopados

A organização estrutural dos vírus, embora relativamente simples, é altamente eficiente (Knipe; Howley, 2023). O capsídeo é formado por um ou mais tipos de proteínas estruturais que se repetem de maneira regular, compondo uma cápsula protetora (Figura 1). Em associação ao ácido nucleico, essa estrutura recebe o nome de nucleocapsídeo. Em contraste, vírus que possuem apenas o capsídeo, como adenovírus e enterovírus, apresentam maior resistência a variações ambientais e a desinfetantes comuns, favorecendo sua transmissão em condições adversas (Knipe; Howley, 2013; Flint et al., 2015).”

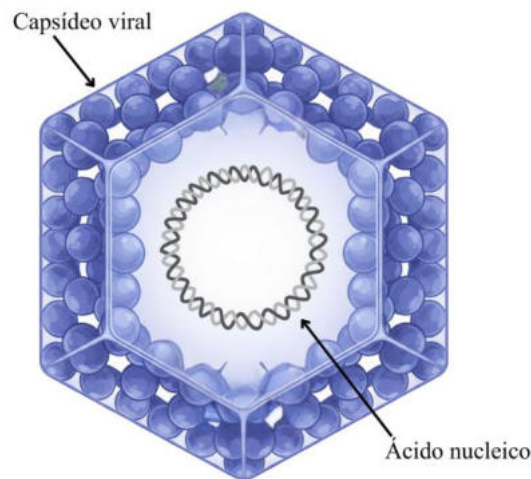


Figura 1. Ilustração de uma partícula viral não-envelopada. Representação esquemática mostrando o capsídeo viral, formado por proteínas estruturais que protegem o ácido nucleico do vírus. Imagem gerada com inteligência artificial Gemini.

Além disso, alguns vírus apresentam um envelope lipídico, derivado de membranas celulares, mais frequentemente da membrana plasmática, mas também do retículo endoplasmático, do complexo de Golgi ou, em certos casos, da membrana nuclear (Flint et al., 2015). Essa camada adicional desempenha papel crucial na entrada e liberação viral e facilita interações com receptores específicos na superfície da célula hospedeira (Flint et al., 2015). Os vírus envelopados, como HIV e herpesvírus, possuem um envoltório externo que contém glicoproteínas (Figura 2) que desempenham funções essenciais no processo infeccioso, atuando no reconhecimento de receptores celulares, na entrada do vírus e na evasão da resposta imune do hospedeiro (Flint et al., 2015). Embora esse envoltório favoreça interações específicas com células-alvo, também os torna mais sensíveis a agentes físicos e químicos, como detergentes e solventes lipídicos. Em contraste, os vírus não envelopados, como adenovírus e enterovírus,

são constituídos apenas pelo capsídeo, o que lhes confere maior resistência a variações ambientais e a desinfetantes comuns, favorecendo sua transmissão em condições adversas (Knipe; Howley, 2013; Flint et al., 2015).

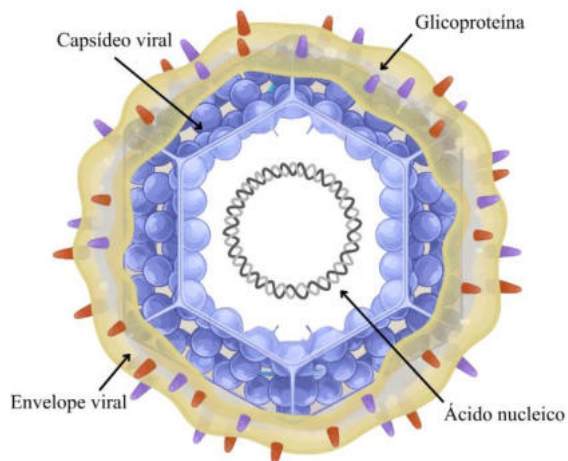


Figura 2. Ilustração de um vírus envelopado. Representação esquemática mostrando os principais componentes de um vírus envelopado: ácido nucleico, capsídeo proteico que o envolve, o envelope viral de origem da célula hospedeira e as glicoproteínas de superfície, responsáveis pelo reconhecimento e ligação a receptores celulares. Imagem gerada com inteligência artificial Gemini.

A composição lipídica e proteica do envelope varia conforme o local de brotamento. Esse processo, exclusivo de vírus envelopados, pode ocorrer em diferentes compartimentos celulares (Knipe; Howley, 2023). Embora frequentemente associado à membrana plasmática, o brotamento também pode ocorrer em organelas, como retículo endoplasmático, complexo de Golgi, endossomos ou vesículas tipo exossomos, determinando a composição final do envelope e influenciando a estabilidade do vírus, seu tropismo celular e até sua sensibilidade a fatores ambientais e a agentes antivirais (Flint et al., 2020; Knipe & Howley, 2023). Já os vírus não envelopados, embora mais resistentes, dependem de interações diretas entre o capsídeo e receptores celulares ou de mecanismos alternativos, como a formação de poros na membrana, para viabilizar a infecção (Knipe; Howley, 2023). Dessa forma, a presença ou ausência do envelope não apenas define aspectos estruturais fundamentais, mas também molda as estratégias de disseminação, persistência e transmissão viral no hospedeiro.

1.2. Glicosilação das proteínas virais de superfície

A glicosilação é um processo celular essencial para a maturação de proteínas, e os vírus envelopados se valem dessa maquinaria do hospedeiro para modificar as glicoproteínas incorporadas ao seu envelope. Essas modificações são fundamentais para o correto dobramento, estabilidade e funcionalidade das proteínas virais durante a infecção (Sanda et al. 2021). Essa etapa consiste na adição de resíduos de açúcares em regiões específicas de uma proteína (Gong

et al., 2021; Zhang; Wang 2016). Existem diferentes maneiras de classificar os tipos de glicosilação: pelo aminoácido que está sendo modificado na glicoproteína e por quais oligossacarídeos que foram adicionados (Gong et al., 2021).

Deste modo, a ligação dos açúcares pode ocorrer no átomo de nitrogênio do grupo amida em resíduos de asparagina (Asp), na sequência específica de aminoácidos Asp-X-Serina/Treonina/Cisteína (X pode ser qualquer aminoácido, com exceção da prolina), caracterizando uma N-glicosilação. Outro alvo da ligação pode ser o átomo de oxigênio em resíduos de Serina ou Treonina, caracterizando a O-glicosilação, para a qual não existe um motivo de aminoácidos conhecido (Gong et al., 2021).

Ademais, os tipos de açúcares adicionados são distintos para a N- e O-glicosilação (Figura 3). No caso da N-glicosilação, os açúcares ligados nesses sítios podem ter três tipos de composição diferentes: Oligomanose (possui um core formado por N-acetil glicosamina e nos terminais há manose de forma ramificada), híbridos (core formado por N-acetil glicosamina e nos terminais apresenta outros açúcares além da manose) e complexo (estrutura mais variada e complexa com vários tipos de açúcares diferentes). Já na O-glicosilação geralmente o açúcar inicial é a N-acetilgalactosamina, podendo ser adicionados outros tipos de açúcares a tornando mais complexa (Cipollo; Parsons 2020).

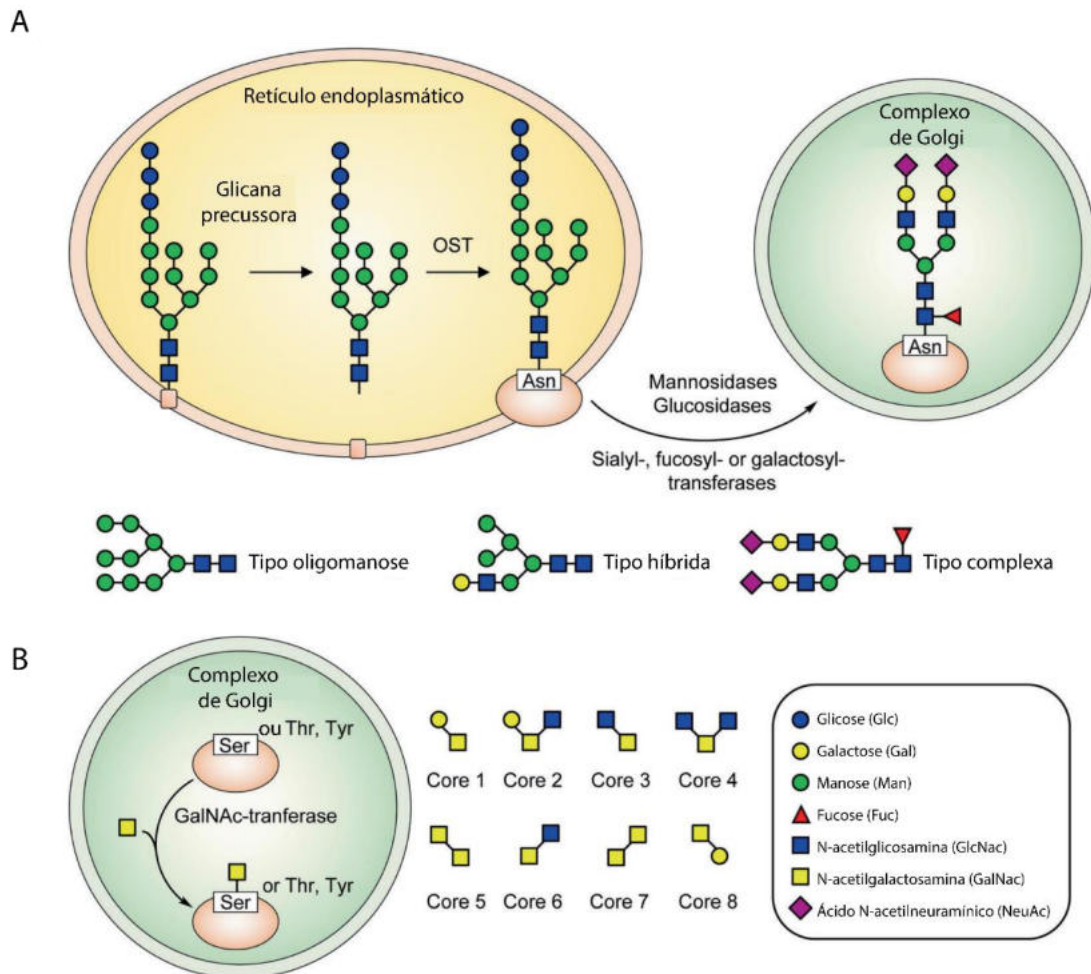


Figura 3. Representação esquemática da biossíntese de glicanas N-ligadas (A) e O-ligadas (B) em células eucariotas. (A) No retículo endoplasmático, uma glicana precursora é transferida para resíduos de asparagina (Asn) por meio da enzima oligosacariltransferase (OST). As glicanas do tipo oligomanose podem ser modificadas no complexo de Golgi por mannosidases e glicosidases, originando glicanas do tipo híbrida ou complexa, conforme a adição de resíduos como ácido siálico, fucose ou galactose. **(B)** No caso das glicanas O-ligadas, a adição ocorre no complexo de Golgi diretamente sobre resíduos de serina (Ser), treonina (Thr) ou tirosina (Tyr), por ação de GalNAc-transferases. O resultado são diferentes estruturas centrais ("cores") que definem a diversidade das glicanas O-ligadas. Adaptado de (GONG et al., 2021).

As glicanas virais, cadeias de carboidratos (açúcares) adicionadas a proteínas virais, apresentam uma ampla gama de funções descritas, como facilitar a ligação ao receptor celular de entrada ou de adesão, evasão do sistema imune por um processo denominado *Antibody-shielding*, no qual estas estruturas funcionam como um impedimento estérico para a ligação de anticorpos a determinados epítomos das proteínas de superfície viral, dentre eles, os epítomos neutralizantes. Por se tratar de estruturas semelhantes às glicanas de proteínas celulares, essas cadeias de açúcares são, em grande parte, toleradas pelo sistema imune, funcionando como um disfarce eficiente para regiões antigênicas cruciais (Watanabe, Y. et al. 2020).

Além de sua função protetora, as glicanas virais são determinantes para o correto dobramento e estabilidade das proteínas virais. Elas atuam como marcadores para o controle de qualidade no retículo endoplasmático e complexo de Golgi, garantindo que as proteínas de envelope sejam funcionalmente ativas e corretamente conformadas. A ausência ou modificação de sítios de glicosilação pode comprometer a infectividade viral (Walls et al. 2020).

Adicionalmente, em muitos vírus, as glicanas participam diretamente da entrada viral, seja facilitando a ligação ao receptor celular primário, seja interagindo com co-receptores ou lectinas do hospedeiro. Um exemplo disso é observado no HIV, cuja proteína de envelope gp120 altamente glicosilada utiliza essas modificações tanto para evasão imune quanto para facilitar a infecção via DC-SIGN, uma lectina expressa em células dendríticas (Doores, K. J. 2015).

A glicosilação também contribui para a variabilidade antigênica entre diferentes cepas ou variantes virais, uma vez que pequenas alterações nos sítios de adição de açúcares podem modificar a exposição de epítomos e afetar a eficácia da resposta imune. Isso tem implicações diretas no desenvolvimento de vacinas, já que variantes com diferentes padrões de glicosilação podem escapar da neutralização por anticorpos previamente gerados (Peng et al. 2018; Tate et al. 2014). Um exemplo claro disso é observado no vírus Influenza H9N2 mutações pontuais na proteína hemaglutinina (HA) resultam na adição ou remoção de sítios de N-glicosilação, alterando o perfil antigênico do vírus (Peng et al. 2018).

1.3. Proteínas de fusão viral

Proteínas de fusão virais são glicoproteínas presentes na superfície de vírus envelopados que medeiam a fusão da membrana do envelope viral com membranas celulares, como membrana plasmática e de vesículas (Knipe; Howley, 2013). Após serem ativadas por estímulos como redução de pH, clivagem proteolítica ou pelo contato direto com o receptor celular, essas glicoproteínas de superfície passam por modificações conformacionais que permitem a exposição do peptídeo de fusão, uma região hidrofóbica que anteriormente estava inacessível pela conformação inativa da glicoproteína.

Essas proteínas de fusão podem ser classificadas em diferentes classes de acordo com a sua estrutura, mecanismo de ativação e de fusão à membrana celular: Classe I, Classe II e Classe III (Knipe; Howley, 2013).

As glicoproteínas virais de classe I caracterizam-se por apresentarem uma arquitetura predominantemente alfa-helicoidal e por formarem trímeros estáveis em seu estado pré-fusional. A ativação dessas proteínas ocorre por meio de clivagem proteolítica específica, que expõe o peptídeo de fusão situado na extremidade N-terminal da cadeia polipeptídica. Uma vez

ativada, a glicoproteína sofre uma profunda mudança conformacional, reorganizando-se em uma estrutura em forma de "hairpin" ou grampo. Essa conformação final aproxima a membrana do vírus da membrana da célula hospedeira, facilitando a fusão das bicamadas lipídicas e permitindo a entrada do material genético viral ou do capsídeo no interior da célula. Dentre os vírus que possuem suas glicoproteínas de classe I (figura 4), temos os seguintes exemplos: HA da Influenza, gp41 do HIV, Spike do SARS-CoV-2 e GP do Ebola (Watanabe et al. 2020; Howley; Knipe 2021).

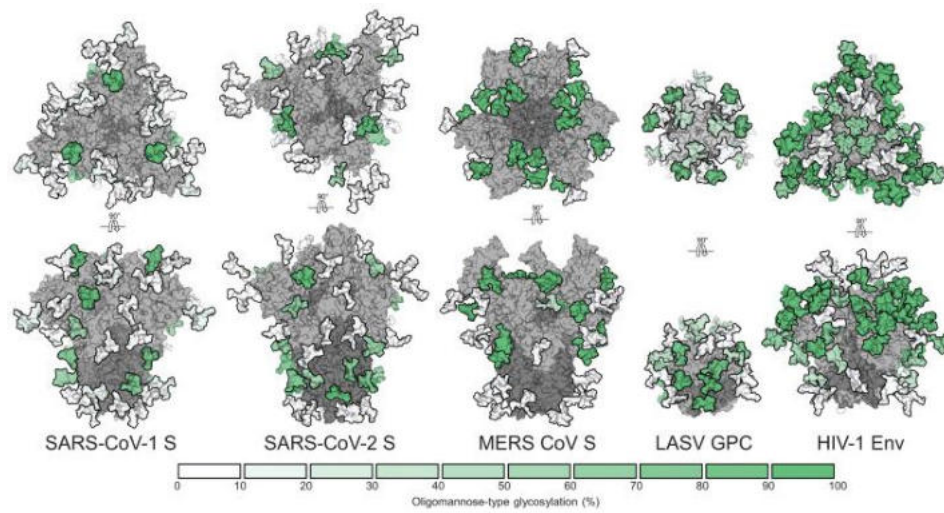


Figura 4. Representações tridimensionais da distribuição de sítios de glicosilação do tipo oligomannose em diferentes glicoproteínas virais. A imagem destaca as proteínas Spike dos coronavírus (SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 e MERS-CoV), a glicoproteína GPC do vírus da febre de Lassa (LASV) e a Env do HIV-1. As cores indicam a proporção de glicosilação do tipo oligomannose em cada sítio (escala de branco a verde). Adaptado (Watanabe et al., 2020).

Em contraste, as glicoproteínas virais de classe II apresentam, em sua forma pré-fusão, uma estrutura dimérica composta predominantemente por folhas β pregueadas (Figura 5) (Zhang et al., 2021). A glicoproteína E do vírus da Dengue e a glicoproteína E2 do vírus Chikungunya são exemplos de proteínas de fusão de classe II (Zhang et al., 2021).

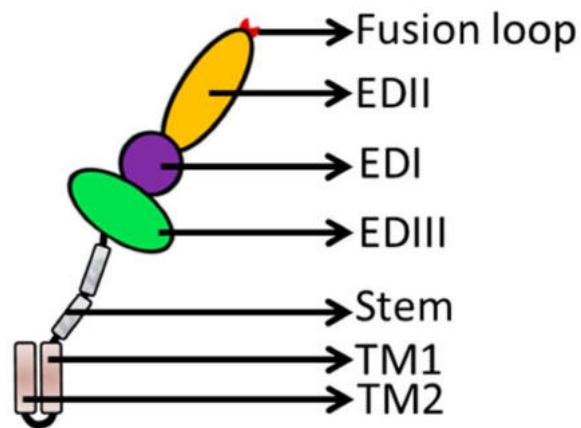


Figura 5. Estrutura da proteína E de *Flavivírus*. A proteína E, um exemplo de proteína de fusão classe II, apresenta três domínios estruturais distintos: EDI (roxo), EDII (laranja) e EDIII (verde), além de domínios transmembranares em hélice (TMDs, marrom), os quais são conectados pela região de haste (cinza). Adaptado (Zhang, 2021).

A ativação dessas glicoproteínas é induzida, principalmente, pelo pH ácido presente nas vesículas endossomais, o que resulta na exposição do peptídeo de fusão, localizado no *loop* interno da proteína. Após essa ativação, a glicoproteína sofre uma reorganização conformacional, transformando os dímeros iniciais em trímeros compostos por folhas β (Knipe; Howley, 2013), o que facilita a fusão da membrana do envelope viral à membrana endossomal (figura 6).

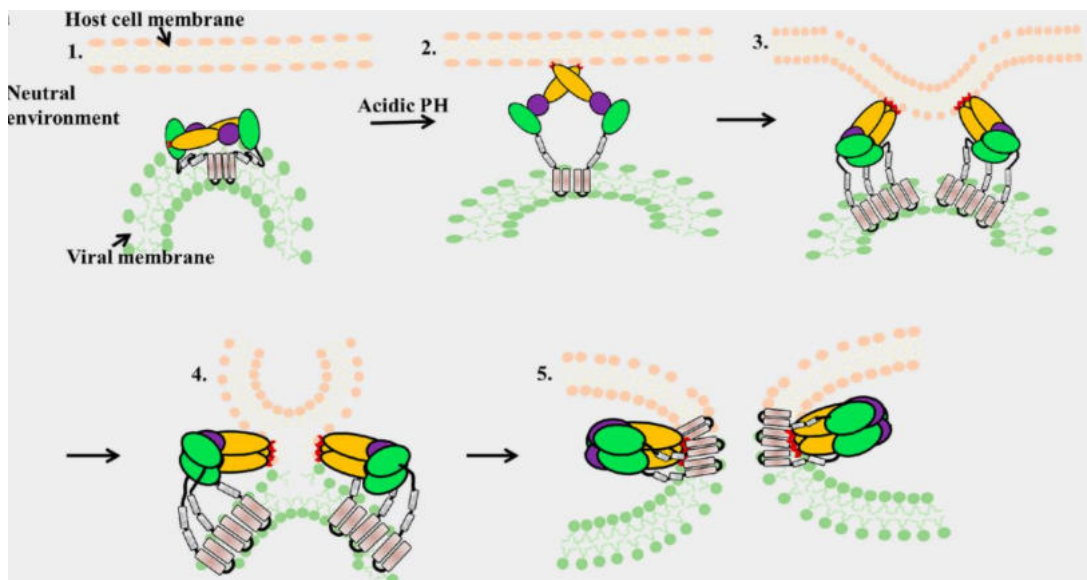


Figura 6. Mecanismo de fusão mediado pela proteína E de flavivírus. Esquema representando as etapas da fusão viral mediada pela proteína E de classe II em flavivírus. (1) Em ambiente neutro, a proteína E se apresenta como um dímero associado à membrana viral. (2) Após endocitose e exposição ao pH ácido no endossomo, a proteína sofre reconfiguração conformacional e o peptídeo de fusão (em vermelho) é exposto. (3) A proteína E se rearranja em trímeros, aproximando as membranas viral e da célula hospedeira. (4) O processo de fusão é iniciado com a aproximação das bicamadas lipídicas. (5) A fusão é concluída com a formação de uma estrutura pós-fusional estável que permite a liberação do genoma viral no citoplasma. Adaptado (Zhang, 2021).

As glicoproteínas de fusão de classe III, como a gB dos herpesvírus, a G do vírus da estomatite vesicular e a G do vírus da raiva, apresentam uma combinação estrutural de hélices α e folhas β pregueadas (Baquero, E., Albertini, A.A.V.; Gaudin, Y., 2015). Diferentemente das classes I e II, as proteínas de fusão da classe III exibem uma estrutura pré-fusão mais híbrida, apresentando sua organização composta por um trímero com α -hélices e folhas β (Figura 7). A ativação dessas glicoproteínas pode ocorrer tanto pela exposição ao pH ácido de compartimentos endossomais quanto pela interação direta com receptores da superfície celular do hospedeiro. Uma vez ativadas, ocorre a exposição do peptídeo de fusão, localizado em um *loop* interno da proteína, o que desencadeia uma significativa mudança conformacional. Essa transição leva à reorganização da glicoproteína em uma estrutura trimérica com domínios centrais helicoidais, essencial para promover a aproximação e subsequente fusão entre as membranas viral e celular (Knipe; Howley, 2013).

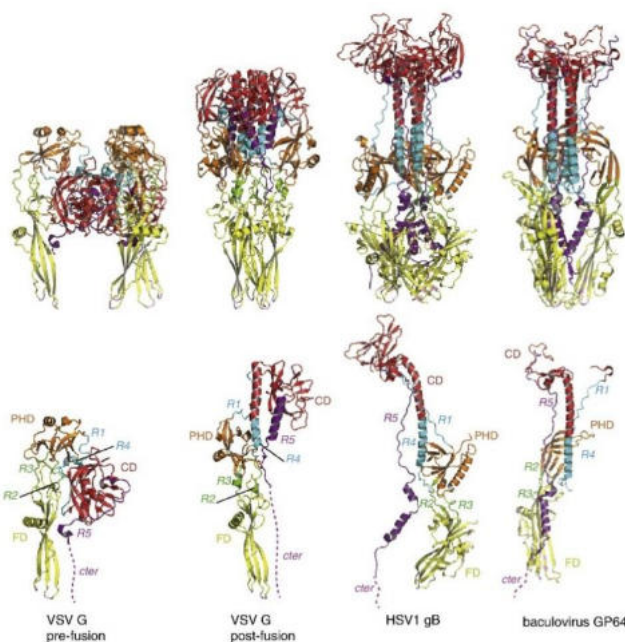


Figura 7. Estruturas de glicoproteínas de fusão classe III. Modelos estruturais das proteínas G (VSV), gB (HSV-1) e GP64 (baculovírus), mostrando as formas trimerizadas e monoméricas nos estados pré e pós-fusão. A transição conformacional revela o domínio de fusão (FD), reorganiza hélices internas (R1–R5) e permite a inserção na membrana-alvo, mecanismo típico das proteínas de fusão classe III. Adaptado (Baquero, E., Albertini, A.A.V. & Gaudin, Y, 2015).

Diversas famílias virais compartilham a dependência de proteínas de fusão para mediar a entrada na célula hospedeira, as quais pertencem a classes estruturais distintas (classe I, II ou III), refletindo diferentes mecanismos de fusão e tropismo celular. Essas proteínas são, em sua maioria, fortemente glicosiladas, apresentando glicanas do tipo N-ligadas e, em alguns casos, O-ligadas, que formam um denso escudo glicídico sobre sua superfície. A densidade, o padrão

e a composição dessas glicosilações variam significativamente entre famílias virais — como retrovírus, coronavírus, flavivírus e herpesvírus. O padrão de glicosilação está intimamente ligada à classe de proteína de fusão utilizada pelo vírus: o arranjo e o tipo de glicanas tendem a variar mais entre as diferentes classes de proteínas de fusão do que entre famílias virais (Backovic; Jardetzky, 2009). Assim, mesmo vírus filogeneticamente distantes podem exibir perfis de glicosilação semelhantes quando compartilham a mesma classe estrutural de proteína de fusão, o que também influencia diretamente a suscetibilidade à neutralização por lectinas antivirais, como a CV-N e seus derivados. Dessa forma, compreender essas diferenças é essencial para o desenho de estratégias antivirais de amplo espectro (Backovic; Jardetzky, 2009).

1.4. Lectinas

Lectinas constituem uma classe de proteínas com a capacidade de reconhecer e interagir de maneira específica com carboidratos, estabelecendo ligações não covalentes com essas moléculas. Essas proteínas estão amplamente distribuídas em diversos organismos e atuam em múltiplos processos biológicos (Mitchell; Ramessar; O’keefe, 2017; Nabi-afjadi et al., 2022). Sua estrutura tridimensional é altamente variável, permitindo o reconhecimento de distintas configurações de carboidratos, desde monossacarídeos específicos até oligossacarídeos com ramificações lineares ou complexas. Além disso, as lectinas possuem a capacidade de interagir com glicanos ampliando assim seu espectro de funções biológicas (Dam; Brewer, 2007; Mitchell; Ramessar; O’keefe, 2017).

Historicamente, a primeira lectina isolada e caracterizada foi a concanavalina A (ConA), extraída das sementes de *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco). Pesquisadores da época observaram que um extrato dessas sementes apresentava capacidade de aglutinar eritrócitos (hemaglutinação) (Sumner, J. B.; Howell, S. F. 1936). Com o objetivo de identificar o componente responsável por essa atividade, foram conduzidos ensaios de precipitação com glicoproteínas, nos quais se verificou que a interação ocorria de maneira dependente da presença de carboidratos. Posteriormente, a substância isolada foi identificada como uma proteína cristalizável, sugerindo tratar-se de uma nova classe de proteínas com propriedades específicas de reconhecimento de açúcares. Esse estudo pioneiro foi o primeiro a descrever uma proteína capaz de interagir seletivamente com carboidratos sem apresentar atividade enzimática, estabelecendo, assim, os fundamentos para o conceito moderno de lectinas (Sumner; J. B.; Howell; S. F, 1936).

Em 1954, William C. Boyd formalizou o termo “lectina” ao caracterizar aglutininas vegetais dotadas de marcada especificidade por determinados carboidratos. Seus estudos demonstraram que essas proteínas realizavam um reconhecimento seletivo de estruturas sacarídicas, o que motivou a adoção do termo derivado do latim *legere* (“selecionar”) (Boyd; Shapleigh, 1954).

Nesse contexto, as lectinas, amplamente distribuídas entre os mais variados organismos, desde microrganismos até primatas, destacam-se por sua notável capacidade de reconhecimento seletivo de carboidratos. Essa propriedade permite que desempenhem múltiplas funções celulares, incluindo a modulação de vias de sinalização intracelular, regulação da migração celular, participação no enovelamento adequado de proteínas e mediação de interações entre hospedeiro e patógenos (Lis; Sharon, 1998).

Um exemplo notável é a ativação da via das lectinas no sistema complemento, uma resposta imunológica inata essencial para a defesa contra patógenos. Essa via é iniciada quando lectinas séricas reconhecem padrões de carboidratos específicos na superfície de microrganismos. Esse reconhecimento leva à ativação das proteases associadas à lectina ligante de manose (MBL, do inglês *Manose binding lectin*) que por sua vez, clivam componentes do complemento, como C4 e C2, resultando na formação da C3 convertase. Esse complexo enzimático desencadeia uma cascata de reações que culmina na opsonização dos patógenos, recrutamento de células imunes e, em última instância, na lise celular mediada pelo complexo de ataque à membrana (MAC, do inglês *Membrane Attack Complex*). Inclusive, alguns estudos avaliam a atividade sinérgica de algumas lectinas administradas em conjunto com antimicrobianos convencionais, numa tentativa de mitigar ou contornar a emergência de cepas bacterianas multirresistentes (Santos et al. 2021), como título de ilustração, uma lectina isolada de uma ostra, descrita por Dunker em 1880, PmCTL-1, foi capaz de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas, como *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, e a lectina PeRol, obtida da planta *Portulaca elatior*, com atividade fungicida contra diferentes espécies de cândida (da Silva et al. 2019).

Por outro viés, as lectinas podem, em algumas circunstâncias, facilitar processos infecciosos, como exemplificado em diferentes estudos. Exemplo de tal fato é a lectina viral, descrita no domínio NTD da proteína S de espécies de coronavírus, como o HCoV-OC43 e o MHV, que é capaz de ligar-se a carboidratos na superfície celular, funcionando como um domínio de adesão (Künkel; Herrler 1993; Yang; Rao 2021)

Adicionalmente, o papel das lectinas no sistema imunológico tem sido cada vez mais evidenciado. Algumas lectinas atuam diretamente na ativação da via das lectinas do sistema

complemento, contribuindo para a resposta inflamatória inicial. Contudo, por outro lado, estudos recentes também apontam para sua atuação imunomoduladora, evidenciando uma natureza funcional dupla — com potenciais efeitos pró-inflamatórios e regulatórios no contexto da imunidade inata, como demonstrado em trabalhos que descrevem lectinas capazes de simultaneamente estimular a produção de citocinas e, em outras condições, atenuar respostas inflamatórias excessivas (Konozy; Osman, 2024).

Dessa forma, as lectinas podem desempenhar papéis distintos nos organismos. Por um lado, atuam como componentes essenciais da defesa inata do sistema imunológico, contribuindo para o reconhecimento e eliminação de patógenos. Entretanto, em certos contextos, podem favorecer processos infecciosos, auxiliando microrganismos na adesão, invasão celular ou modulação da resposta imune do hospedeiro (Mason; Tarr, 2015).

1.4.1. Lectinas com aplicações biotecnológicas

Devido à sua elevada especificidade no reconhecimento de carboidratos, as lectinas passaram a atrair considerável atenção da comunidade científica, consolidando-se como ferramentas multifuncionais em distintos campos da pesquisa biomédica. Entre suas aplicações mais relevantes, destaca-se o uso em ensaios de cromatografia de afinidade, como a HPLC, nos quais essas proteínas são utilizadas para promover a separação seletiva de glicoproteínas e glicolipídios presentes em matrizes biológicas complexas, como o soro humano. Essa abordagem tem sido fundamental para o mapeamento de glicoconjugados em superfícies celulares, fornecendo informações estruturais e funcionais importantes sobre diferentes tipos celulares (Kullolli et al., 2008).

O uso mais antigo das lectinas se deu na caracterização dos antígenos sanguíneos (Khan, Fauzia et al., 2002; Zatta; Cummings, 1992). Notou-se que extratos originários de diferentes plantas eram capazes de reagir especificamente com hemácias de diferentes grupos de doadores.

Atualmente, diferentes lectinas originárias de variados organismos além de plantas são utilizadas na prática clínica para definir os grupos sanguíneos ABO, MN e P (Quadro 1).

Quadro 1. Lectinas específicas para grupos sanguíneos e suas respectivas origens biológicas.

Grupo Sanguíneo	Origem da Lectina (Organismo)
A	<i>Phaseolus limensis</i>
	<i>Otola lactea</i>
	<i>Helix hortensis</i>
	<i>Salmo salar</i>
B	<i>Ptilota plumosa</i>
	<i>Griffonia simplicifolia</i>
	<i>Escherichia coli</i> (não-fimbrial)
M	<i>Iberis amara</i>
	<i>Iberis umbellata</i>

Adaptado de (Gorakshakar; Ghosh, 2016).

Além disso, as lectinas, especialmente aquelas de origem vegetal, têm demonstrado amplo potencial farmacológico, sobretudo no contexto oncológico. Evidências crescentes indicam que determinadas lectinas são capazes de induzir apoptose em uma variedade de linhagens celulares tumorais, atuando por diferentes vias moleculares, o que resulta na inibição da proliferação celular e na interrupção do ciclo celular de células cancerígenas (Bhutia *et al.*, 2019).

Outro campo de aplicação relevante é o uso das lectinas como biomarcadores para diagnóstico e prognóstico de neoplasias. Sua capacidade de reconhecer padrões glicídicos específicos em células tumorais as torna ferramentas valiosas na identificação e monitoramento de alterações malignas (Hashim *et al.* 2017; Poiroux *et al.* 2017). No contexto do carcinoma hepatocelular, destaca-se o uso da lectina *Lens culinaris* agglutinin (LCA), como uma ferramenta promissora no reconhecimento diferencial de glicoproteínas tumorais. Um caso exemplar é o da isoforma AFP-L3, uma variante glicosilada da alfa-fetoproteína (AFP), cuja expressão é frequentemente associada à presença de neoplasias hepáticas. Este determinante glicídico é precisamente reconhecido pela LCA, conferindo especificidade à interação lectina-glicoproteína (Leerapun *et al.*, 2007). A aplicação dessa interação molecular permitiu o desenvolvimento de ensaios diagnósticos baseados em lectinas, voltados para a detecção da AFP-L3 em amostras clínicas. Tais métodos têm se mostrado eficazes na triagem e monitoramento do carcinoma hepatocelular, mais acessível em comparação com técnicas de imagem de alta complexidade, como a ressonância magnética e a tomografia computadorizada (C. Youan *et al.* 2017). Essa abordagem também demonstra como a especificidade das lectinas

pode ser estrategicamente explorada para fins clínicos, consolidando-se como uma via biomarcadora promissora (Bialecki; Di Bisceglie 2005).

O potencial antimicrobiano das lectinas tem sido intensamente explorado, sobretudo pela sua capacidade de reconhecer carboidratos expostos na superfície de microrganismos. Um exemplo notável é sua interação com lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana externa de bactérias Gram-negativas. Esse reconhecimento molecular pode desencadear uma série de efeitos biológicos, como a formação de poros na membrana externa de biofilmes, uma barreira estrutural que dificulta significativamente o acesso de fármacos antimicrobianos, uma vez que esses biofilmes são envolvidos por uma matriz extracelular rica em polissacarídeos. Deste modo, já existem estudos sobre o desenvolvimento de superfícies a base de lectinas para dispositivos intravenosos, cateteres ou outros utensílios hospitalares, a fim de reduzir casos de infecção hospitalar (Ferreira et al. 2018). Pesquisadores comprovaram a eficácia da ConA na inibição da formação de biofilmes por *Escherichia coli* entero-hemorrágica e *Listeria monocytogenes*, destacando seu potencial como agente antibiofilme (Ferreira et al. 2018; Jin et al. 2019). Pesquisadores comprovaram a eficácia da ConA na inibição da formação de biofilmes por *Escherichia coli* entero-hemorrágica e *Listeria monocytogenes*, destacando seu potencial como agente antibiofilme (Ferreira et al. 2018; Jin et al. 2019).

Adicionalmente, estudos recentes evidenciam o potencial de lectinas como agentes antimicrobianos com ampla atuação. A lectina VEA, isolada das sementes de *Vicia ervilia*, demonstrou notável eficácia na inibição da formação de biofilmes por diferentes espécies bacterianas, abrangendo tanto exemplares gram-positivos quanto gram-negativos (Belfiori et al. 2024). Também foi demonstrado que o pré-tratamento de cateteres venosos com lectinas obtidas de soro humano foi capaz de inibir a adesão de células de *Pseudomonas aeruginosa*, conhecida por ser uma das principais causadoras de infecções hospitalares, enfatizando o amplo potencial biotecnológico das lectinas no controle de infecções bacterianas (Gu et al. 2001).

Nesse contexto, a versatilidade funcional das lectinas, evidenciada por sua aplicação em diferentes frentes da biomedicina, também abriu caminho para investigações sobre seus potenciais terapêuticos.

1.4.2. Lectinas antivirais

Dentre o amplo espectro de funcionalidades já identificadas e exploradas para as lectinas, destaca-se uma aplicação de relevância significativa: sua atividade antiviral, que vem ganhando crescente atenção nas últimas décadas em virtude de seu potencial terapêutico e preventivo frente a diversos patógenos virais. As lectinas com atividade antiviral já foram isoladas a partir

de uma diversidade de organismos vivos, incluindo plantas, algas, fungos, bactérias e eucariotos unicelulares. Essa diversidade de origens resulta tanto na variedade estrutural dessas proteínas quanto na especificidade por diferentes resíduos sacarídicos, o que permite uma interação com diversas glicanas virais (Mitchell et al. 2017).

Uma característica estrutural dessas lectinas é a presença de domínios de reconhecimento de carboidratos (CRD, do inglês, *carbohydrate recognition domain*), esses CRDs apresentam homologia entre eles e geralmente são duplicados, o que culmina no aumento da avidéz de reconhecimento e interação oligossacarídeos e predominantemente por glicanas ricas em manose que são adicionadas nos processamentos pós-traducionais (Taylor et al. 1992).

A conservação de sequência entre lectinas é altamente variável, oscilando entre cerca de 10% a 100% dependendo do gênero analisado. Essa diversidade é especialmente pronunciada nas regiões de alça que compõem ou influenciam os domínios de reconhecimento de carboidratos (CRDs), sugerindo que essas áreas são determinantes para a especificidade funcional de algumas classes, as diferenciando na sua capacidade de reconhecimento. Em contraste, observa-se uma homologia mais consistente nos elementos estruturais centrais da molécula, especialmente quanto à conservação da posição de aminoácidos, o que garante a estabilidade do arcabouço proteico. Outro aspecto estrutural relevante é a capacidade de oligomerização: diversas lectinas são encontradas em formas dímeras, trímeras ou tetrâmeras em solução, embora algumas se mantenham funcionalmente ativas como monômeros, demonstrando que a oligomerização, apesar de comum entre elas, não é uma característica ubíqua (Mitchell et al. 2017)

Apesar de apresentarem especificidade distinta na interação com diferentes padrões de carboidratos, as lectinas antivirais compartilham mecanismos de ação. Em geral, sua atividade antiviral baseia-se na capacidade de se ligarem a glicoproteínas presentes na superfície de vírus envelopados, bloqueando de maneira eficaz a interação entre o vírus e seus receptores celulares. Essa interferência pode ocorrer tanto na etapa de adsorção quanto na de penetração do vírus na célula hospedeira, uma vez que estudos já demonstraram que em alguns casos que, mesmo quando a lectina se liga à glicoproteína viral, a interação com o receptor celular pode ainda acontecer. Nessas situações, embora a adsorção inicial não seja completamente inibida, a subsequente fusão do envelope viral é comprometida, bloqueando a liberação do genoma viral na célula alvo (Mitchell et al. 2017).

Estudos sobre a atividade antiviral das lectinas e seus mecanismos de ação teve início, principalmente, a partir das investigações voltadas à inibição do HIV-1. Nesses ensaios,

observou-se que determinadas lectinas apresentam como alvo a gp120 e a gp41 do HIV (Chang; Bewley, 2002). Nessa perspectiva, novas lectinas antivirais foram obtidas de diversos organismos, como a BanLec, uma lectina extraída da banana (*Musa acuminata*), apresentando eficácia contra HIV-1 (Swanson et al. 2010). Além do HIV-1, a BanLec também demonstrou atividade inibitória contra diferentes cepas do vírus da Influenza, incluindo a cepa pandêmica H1N1 de 1918 (Covés-Datson et al., 2020)

Apesar dos avanços significativos nas pesquisas pré-clínicas envolvendo lectinas com atividade antiviral, a transição dessas moléculas para aplicações terapêuticas ainda encontra obstáculos relevantes. Embora diversos estudos *in vitro* tenham demonstrado eficácia antiviral promissora, os ensaios *in vivo* revelaram que algumas lectinas podem desencadear efeitos adversos, como respostas imunes exacerbadas, citotoxicidade e atividades mitogênicas indesejadas. Como já citado anteriormente, a BanLec demonstrou forte atividade antiviral, especialmente contra o HIV-1 (Swanson et al. 2010). Contudo observou-se que apresentava atividade mitogênica significativa, ou seja, era capaz de estimular excessivamente a proliferação de linfócitos T. Isso representava um risco sério, pois tal ativação exacerbada do sistema imune poderia causar inflamação indesejada, reações adversas e até danos teciduais, inviabilizando seu uso terapêutico (Gavrovic-Jankulovic et al. 2008; Swanson et al. 2010).

Com o avanço das pesquisas sobre lectinas antivirais e a identificação de uma diversidade de organismos como fontes potenciais para o isolamento de lectinas, as cianobactérias começaram a se destacar como organismo de prospecção destas moléculas (Singh et al., 2017). O crescente interesse sobre lectinas de cianobactérias se deu por estas apresentarem baixo peso molecular, variando de 9 a 14 kDa e que geralmente possui uma preferência de reconhecimento por glicoproteínas do que monossacarídeos, além de serem estáveis em extensas faixas de pH, como é o caso da lectina obtida de *Oscillatoria agardhii*, que é estável em pH de 4 – 11 (Sato et al., 2000; Singh et al., 2017). Outra característica importante destas lectinas é que elas não precisam de íons metálicos como cofatores para ligarem-se a carboidratos, o que é comum em lectinas de plantas (Singh et al., 2017).

1.5. Cyanovirin-N

1.5.1. Descoberta, isolamento e estrutura

Durante as décadas de 1980 e 1990, o avanço da epidemia global de HIV e as dificuldades associadas ao desenvolvimento de vacinas eficazes — em razão da alta variabilidade genética do vírus — evidenciaram a necessidade de estratégias preventivas complementares. Nesse

cenário, a busca por agentes antivirais de aplicação tópica tornou-se uma prioridade internacional, especialmente para inibir a transmissão sexual do HIV. Foi nesse contexto que a Cianovirina-N (*Cyanovirin-N*; CV-N) foi descoberta, a partir de programas de triagem de compostos naturais com potencial atividade anti-HIV. A CV-N, isolada da cianobactéria *Nostoc ellipsosporum*, destacou-se como uma das primeiras lectinas com atividade antiviral identificadas, sendo capaz de se ligar especificamente a glicanas ricas em manose presentes na glicoproteína gp120 do HIV, bloqueando a entrada viral em células hospedeiras (Boyd et al., 1997).

Desde sua descoberta, a CV-N tem sido uma das lectinas antivirais mais extensivamente estudadas, tanto em relação às suas propriedades estruturais quanto aos seus mecanismos de ação. Estudos demonstraram que a CV-N possui ampla atividade antiviral, atuando contra diversos vírus envelopados, incluindo HIV-1 e SIV (vírus da imunodeficiência símia), além de vírus respiratórios como Influenza A e B, o vírus Ebola (EBOV) (Barrientos et al. 2003) e o vírus da hepatite C (HCV) (Helle et al. 2006).

A CV-N é uma lectina composta por 101 aminoácidos (Botos et al. 2002). Estruturalmente, a CV-N apresenta dois CRDs homólogos — domínio A (resíduos 1–50) e domínio B (resíduos 51–101) — que apresentam mais de 60% de identidade na sequência primária e compartilham uma conformação majoritariamente composta por fitas β e alças (Figura 8). Esses domínios são estabilizados por duas ligações dissulfeto intramoleculares (C8–C22 e C58–C73), que são essenciais para a integridade estrutural. A CV-N pode existir em solução tanto como um monômero compacto quanto como um dímero formado por troca de domínios. Esse tipo de oligomerização estrutural, conhecido como “troca tridimensional de domínios”, ocorre quando duas cadeias proteicas idênticas trocam entre si segmentos equivalentes, formando estruturas híbridas nas quais o domínio A de uma cadeia interage com o domínio B da outra (AB' e A'B), formando suas cadeias entrelaçadas (Figura 8.B). Além disso, cada uma dessas estruturas híbridas são conhecidas como pseudomonômeros - uma unidade funcional que parece e se comporta como um monômero, mas que é formada por partes de duas cadeias polipeptídicas diferentes, devido à troca tridimensional de domínios entre elas.

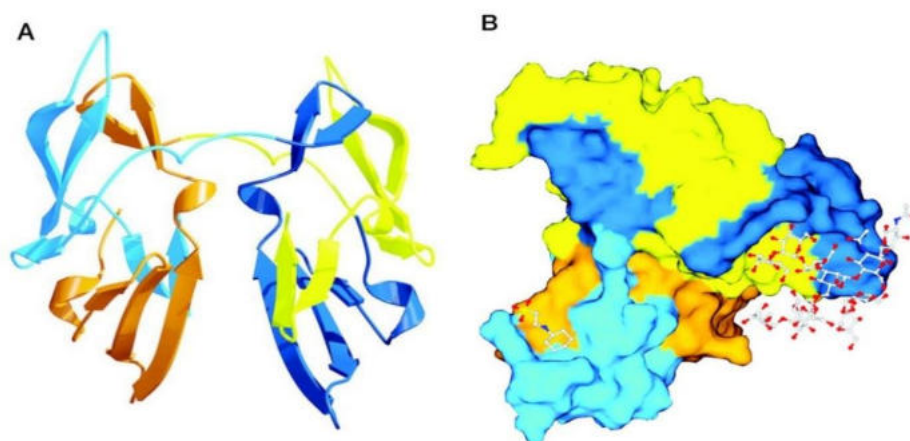


Figura 8. Estrutura tridimensional da CV-N. (A) Modelo estrutural obtido por cristalografia do dímero de CV-N, com os CRDs definidos pela sequência A (azul escuro) e B (azul claro) da primeira molécula e os domínios A' (laranja) e B' (amarelo) da segunda molécula de CV-N. AB' e A'B são pseudomonômeros. (B) Estrutura tridimensional com o sítio de ligação de oligossacarídeos primário ligados a CHES e sítio de ligação de oligossacarídeos secundários ligado a Man-9. Ambas as partes dessa figura foram geradas com os programas Bobscript, Rster3D e SPOCK. Adaptado Botos et al. 2002.

Embora CV-N possa existir como monômero em solução, todas as estruturas cristalográficas descritas até o momento revelam a proteína exclusivamente na forma de dímeros com domínios trocados (*domain swap*), sugerindo uma preferência conformacional sob condições de cristalização (Botos et al., 2002). Essa versatilidade estrutural sugere estar relacionada à sua capacidade de reconhecimento de oligossacarídeos de alta complexidade presentes em glicoproteínas virais, sendo um fator determinante para sua potente atividade antiviral.

A CV-N é capaz de reconhecer N-glicanas pouco processadas com alta densidade de manose, reconhecendo sobretudo motivos lineares de α -(1-2)-manose (Fujimoto and Green 2012). Apesar da homologia entre os CRDs, o domínio A (resíduos 1 – 50) apresenta menor afinidade à manose que o domínio B (resíduos 51 – 101) (Botos et al., 2002).

1.5.2. Atividade neutralizante da Cyanovirin-N e testes pré-clínicos

Com base nas descobertas estruturais da CV-N, especialmente sua alta afinidade e especificidade por oligossacarídeos ricos em manose, essa lectina passou a ser amplamente reconhecida como uma ferramenta valiosa em estudos *in vitro* e *in vivo* (Botos et al. 2002).

No contexto biotecnológico, a partir da sequência gênica da CV-N, tornou-se possível expressá-la em *Escherichia coli*, com o objetivo de facilitar modificações genéticas e aumentar seu rendimento (Boyd et al. 1997).

Nesse contexto, a afinidade da CV-N por resíduos de manose, aliada à sua capacidade de ser expressa de forma eficiente em sistemas heterólogos, contribuiu para sua validação como

uma lectina antiviral, com implicações significativas para pesquisas avançadas em virologia e biotecnologia. A CV-N demonstrou atividade *in vitro* contra diversos vírus envelopados cujas glicoproteínas de superfície apresentam alta densidade de N-glicanas ricas em manose. A CV-N exerceu efeito neutralizante contra os vírus Influenza A e B, ao se ligar especificamente às glicoproteínas hemaglutinina e neuraminidase (Smee et al., 2008). Além disso, estudos demonstraram sua interação com a glicoproteína GP1 do vírus Ebola, bem como com as glicoproteínas E1/E2 do vírus da hepatite C (O’Keefe et al., 2003.; Barrientos et al., 2003).

No contexto de experimentações *in vivo*, a CV-N demonstrou manter sua atividade antiviral previamente observada *in vitro*, apresentando resultados consistentes e promissores para os vírus avaliados até o momento (Muñoz-Basagoiti et al. 2023). Essa eficácia foi avaliada tanto por meio de administração tópica em mucosas quanto por via parenteral. Um exemplo notável foi demonstrado em modelos murinos de infecção letal por EBOV, nos quais a administração subcutânea de CV-N resultou em uma significativa redução da carga viral, além de diminuição na taxa de mortalidade dos animais tratados. Importante destacar que, mesmo sob esse regime terapêutico, não foram observadas respostas imunogênicas adversas direcionadas à lectina (Barrientos et al., 2003).

De forma semelhante, a CV-N foi avaliada em ensaios *in vitro* e *in vivo* contra o HSV-1. Para os experimentos em modelo animal, foram utilizados camundongos Kunming submetidos a um protocolo de encefalite induzida por HSV-1, tratados com três diferentes dosagens de CV-N administradas por via intraperitoneal em intervalos distintos. Em comparação ao grupo controle — infectado e não tratado —, os camundongos tratados apresentaram apenas sinais clínicos leves e maior taxa de sobrevivência. Além disso, análises histopatológicas revelaram que os animais tratados não exibiram alterações significativas nas células cerebrais, com exceção de sinais discretos de inflamação (Yu et al. 2010).

Um estudo inovador testou *in vivo* o uso de bactérias lácticas, *Lactobacillus jensenii*, modificadas geneticamente para secretar CV-N, utilizando como modelo primatas não-humanos da espécie *Macaca nemestrina*. Os animais foram alimentados com uma formulação de probiótico contendo essas cepas capazes de expressar CV-N. A presença da lectina foi detectada na mucosa retal durante e logo após o período de administração. Desafios virais *ex vivo* realizados com biópsias de tecido retal indicaram que o pico de carga viral foi significativamente menor no tecido retal dos animais tratados em comparação aos controles — biópsia pré-tratamento 2 meses antes da administração do iogurte - (Li et al. 2011).

Ademais, abordando outra vertente das manifestações clínicas, no contexto das infecções respiratórias, um exemplo significativo é o vírus influenza recombinante, contendo o gene HA da cepa A/New Caledonia/20/99 (H1N1) com a mutação Asp225Gly na subunidade HA1, letal para camundongos e sensível à ação da CV-N, que foi utilizado para a infecção em camundongos, seguidos de tratamento por via intranasal com CV-N que demonstrou eficácia dose-dependente, garantindo 100% de sobrevivência e redução da carga viral nos pulmões. Em ensaios comparativos com a ribavirina, a CV-N apresentou maior eficácia. Em modelos com furões, observou-se também uma redução expressiva nos títulos virais nas primeiras horas após o tratamento, no entanto, esse efeito foi atenuado após 24 horas (Smee et al., 2008). Estes dados sugerem que a via intranasal pode ser uma forma segura de administrar a CV-N e conter infecções respiratórias, como a COVID-19 (Nabi-afjadi et al., 2022).

Adicionalmente, a CV-N, quando formulada como gel tópico em concentrações de 0,5% a 2%, não demonstrou efeitos citotóxicos significativos em modelos pré-clínicos, mesmo após aplicação retal e vaginal em macacos rhesus (*Macaca mulatta*), tanto machos quanto fêmeas. Essa formulação foi avaliada em um modelo de desafio com o vírus quimérico SIV/HIV-1 (SHIV89.6P), no qual os animais tratados apresentaram proteção eficaz contra a infecção viral (Tsai et al, 2003, Tsai et al, 2004). Esses achados reforçam o potencial da CV-N como um antiviral tópico seguro e promissor na prevenção da transmissão sexual de vírus envelopados, especialmente o HIV-1.

1.5.3. Melhoramento de lectinas antivirais

Apesar dos avanços na caracterização estrutural e funcional das lectinas antivirais com potencial terapêutico, estas moléculas ainda enfrentam diversos obstáculos que limitam sua aplicação clínica. Até o momento, nenhuma lectina foi aprovada para uso terapêutico contra infecções virais, mesmo diante de resultados promissores demonstrando eficácia tanto *in vitro* quanto *in vivo*, tal fato não advém das dificuldades em inibir a infecção viral, mas sim dos obstáculos da farmacocinética e farmacodinâmica da administração de uma proteína exógena no organismo humano (Mitchell et al. 2017). Com isso, aspectos como biodisponibilidade, acessibilidade, imunogenicidade, toxicidade e via de administração tornam-se fatores cruciais para a viabilidade e implementação clínica dessas moléculas.

Um primeiro aspecto que precede a condução de testes clínicos refere-se à avaliação da biodisponibilidade do fármaco — ou seja, a fração da dose administrada que efetivamente alcança a circulação sistêmica (Ogihara et al. 2023). Além do fator da biodisponibilidade, existe a toxicidade que pode ser causada pela proteína. Apesar dessas lectinas serem específicas,

potenciais efeitos colaterais podem surgir a partir da administração dessas lectinas. Exemplificando alguns efeitos adversos, temos a lectina Banlec que exibiu forte resposta mitogênica de células T, sendo considerado uma molécula imunoestimulatória (Gavrovic-Jankulovic et al. 2008; Swanson et al. 2010). Outro ponto de preocupação na administração dessas lectinas é da capacidade de aglutinar células - ela pode interagir simultaneamente com carboidratos expostos em diferentes células, favorecendo sua agregação e consequente aglutinação (Nicolson, 1974).

Contudo, proteínas heterólogas já vêm sendo administradas de forma recorrente e atóxica no organismo humano. Um exemplo notório é a toxina botulínica, um produto de origem microbiana amplamente conhecido por ser o agente causador do botulismo. No entanto, quando administrada em doses muito reduzidas, essa proteína não representa risco à saúde, sendo utilizada com sucesso na prática clínica há décadas. Seu uso consolidado demonstra que, mesmo moléculas potencialmente tóxicas, quando bem controladas e estudadas, podem ser convertidas em ferramentas terapêuticas eficazes e seguras (Pickett; Perrow 2011).

Além disso, por se tratar de uma proteína exógena, as lectinas antivirais podem ser imunogênicas, o que poderia levar a uma resposta deletéria pelo organismo humano, como reatividade alérgica ou destruição da molécula (Balzarini et al. 2007). A ConA apresenta tanto efeitos tóxicos diretos quanto imunogênicos. Estudos em modelo murino demonstraram que essa lectina possui a capacidade de se ligar às células endoteliais sinusoidais hepáticas, desencadeando a ativação de linfócitos T CD4⁺. Essa ativação culmina em um ataque imunomediado contra as células endoteliais, iniciando uma cascata inflamatória que resulta em dano tecidual hepático severo e, consequentemente, na morte dos camundongos utilizados nos experimentos (Tiegs et al., 1992.; Knolle et al., 1996).

Diante dos diversos desafios apresentados pelas lectinas antivirais, a introdução de mutações direcionadas surge como uma estratégia promissora para otimizar suas propriedades, promovendo maior afinidade pelos alvos específicos e reduzindo a toxicidade. A lectina BanLec, por exemplo, que demonstrou atividade mitogênica sobre células T, sofreu uma modificação em sua sequência gênica, onde substituíram o aminoácido histidina na posição 84 por uma treonina. Essa mutação eliminou a mitogenicidade da BanLec, mantendo sua atividade antiviral de amplo espectro contra HIV, HCV e Influenza (Swanson et al. 2015).

Em relação a CV-N, o estabelecimento de seus mutantes primeiramente orbitou estudos estruturais desta lectina, uma vez que foi demonstrado que a substituição P51G favorece a disposição da CV-N como monômero em solução, diferente da CV-N selvagem (wt – wild type),

que apresenta um equilíbrio metaestável entre dímeros e monômeros (Barrientos, Laura G. et al., 2006). Já a deleção $\Delta Q50$ desloca o equilíbrio para a forma dimérica da CV-N. A partir deste entendimento estrutural sobre a disposição dos CRDs da CV-N, foi demonstrado que a forma monomérica da CV-N, o mutante P51G, apresentou menor eficácia em inibir a infecção pelo HIV-1 *in vitro* em comparação com a CV-N selvagem (wt, do inglês *wild-type*) (Fromme et al., 2007).

Posteriormente, para potencializar sua atividade antiviral, a CV-N foi submetida a modificações estruturais, com o objetivo de substituir uma ou duas de suas pontes dissulfeto por pares de resíduos Glu-Arg localizados próximos aos CRDs. Essas alterações foram planejadas para otimizar as interações intermoleculares com glicanas virais, promovendo novas ligações polares. Como resultado, observou-se um aumento significativo na afinidade de ligação pela hemaglutinina do Influenza, o que refletiu em uma atividade antiviral aprimorada (Schilling et al. 2020).

Tais achados sugerem que modificações na sequência gênica dessa lectina podem resultar em um aumento na afinidade de ligação aos glicanos virais, refletindo em um efeito antiviral potencializado.

1.5.4. Lectinas homólogas a CV-N

Em contraste com a abordagem baseada na engenharia genética de lectinas, a prospecção de proteínas homólogas em outros organismos, por uma abordagem evolutiva, permite expandir o arsenal de lectinas antivirais naturalmente mais eficientes. A microvirina (MVN), por exemplo, é reconhecida como um homólogo funcional da CV-N. Ela possui aproximadamente 13 kDa e apresenta um único CRD, que é estruturalmente homólogo a um dos CRDs da CV-N. Deste modo, a MVN se diferencia da multivalência típica da CV-N. Além disso, a MVN reconhece especificamente glicanas $\alpha(1-2)\text{Man}$, comumente encontradas na superfície de vírus envelopados, como na glicoproteína gp120 do HIV (Shahzad-ul-Hussan et al. 2011., Huskens et al., 2010).

Estudos de toxicidade demonstraram que a microvirina apresenta baixa citotoxicidade, mesmo em concentrações elevadas, o que a torna uma candidata promissora para aplicações terapêuticas. Além disso, destaca-se por sua elevada estabilidade térmica e pelo potencial de neutralização (Shahzad-ul-Hussan, Huskens et al., 2010).

Além disso, a Scytovirin, que compartilha características estruturais e funcionais com a CV-N, foi isolada da cianobactéria *Scytonema varium*. Esta proteína apresenta uma estrutura monomérica, composta por dois domínios de ligação à manose, o que confere à Scytovirin

características bivalentes, semelhantes às da CV-N. Essa estrutura torna-a eficaz na ligação a glicanas compostas de manose, comuns em glicoproteínas virais, como as presentes no HIV (Bokesch et al., 2003).

O mecanismo de ação da Scytovirin é análogo ao da microvirina, em que a lectina se liga a glicanas do tipo $\text{Man}\alpha(1-2)\text{Man}$, localizadas na superfície das glicoproteínas virais. Estudos demonstraram que a Scytovirin não só impede a entrada do HIV-1, mas também inibe a infecção por Ebola, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sugerindo um amplo espectro antiviral (Garrison et al., 2014). No que diz respeito à citotoxicidade, embora a Scytovirin seja altamente eficaz, apresenta baixa toxicidade em células humanas, o que a torna promissora para potenciais aplicações terapêuticas.

Uma lectina antiviral homóloga recentemente identificada recebeu o nome de Dm-CVNH. Trata-se de uma proteína monomérica composta por 102 resíduos de aminoácidos e massa molecular aproximada de 11 kDa. Estruturalmente, Dm-CVNH (Figura 9) exibe notável similaridade com a CV-N, apresentando dois domínios compactos, cada um formado por cinco folhas β e duas hélices α , o que sugere uma conservação funcional ao longo da evolução. Essa lectina demonstra alta especificidade por glicanas do tipo oligomanose e alta manose, especialmente aquelas com unidades repetidas de $\text{Man}\alpha(1-2)\text{Man}$, comuns em glicoproteínas de superfície de diversos vírus. Estudos demonstraram sua eficácia antiviral contra o HIV-1, o HSV-1 e o SARS-CoV-2, reforçando sua relevância no contexto da busca por inibidores virais baseados em proteínas naturais, com destaque para seu perfil de seletividade e amplo espectro de ação (Orfanoudaki et al., 2025).

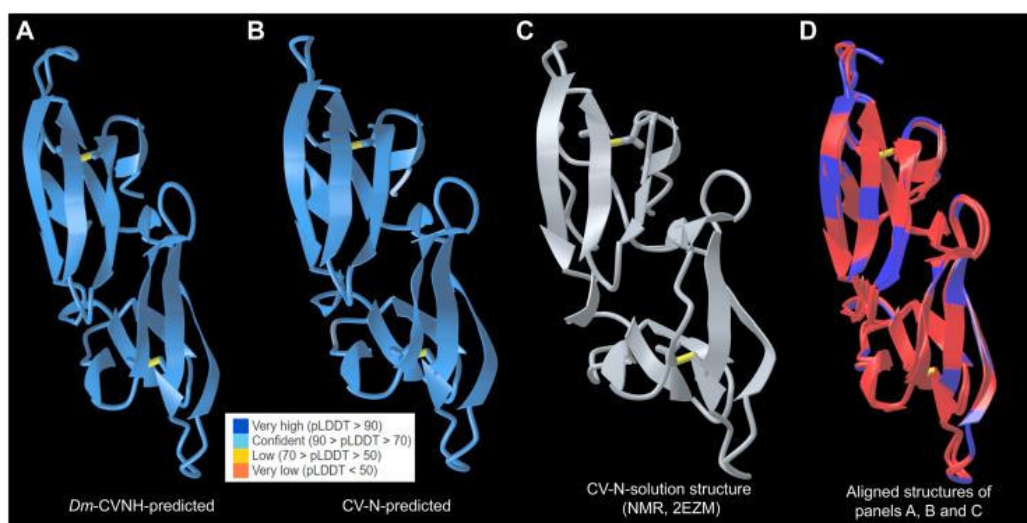


Figura 9. Comparação das estruturas tridimensionais previstas de Dm-CVNH e CV-N. (A) Representação em fita da estrutura prevista de Dm-CVNH gerada com AlphaFold2; (B) Representação em fita da estrutura prevista de CV-N gerada com AlphaFold2; (C) Representação em fita da estrutura experimental de CV-N

monomérico em solução (PDB ID: 2EZM), conforme descrito por Bewley et al. (43); (D) Sobreposição das estruturas mostradas em (A–C) (Adaptado Orfanoudaki et al., 2025).

Nesse contexto, a descoberta de novas moléculas com similaridade estrutural e funcional (Orfanoudaki et al., 2025) em relação à CV-N amplia significativamente as possibilidades terapêuticas e estratégias de melhoramento molecular. Essa diversidade de homólogos (Quadro 2) permite a identificação de candidatos alternativos que, em casos onde uma lectina não apresenta eficácia ou segurança ideais, podem oferecer propriedades complementares ou superiores.

Quadro 2. Comparação estrutural e funcional entre a CV-N e seus principais homólogos antivirais

Lectina	Tamanho	Especificidade	Organização Estrutural	Atividade Neutralizante
CV-N	~11 kDa	Alta manose	Dois domínios homólogos com estrutura tipo β -sanduíche; bivalente	HIV-1, influenza, HSV, SARS-CoV-2, Ebola
Microvirina	~13 kDa	Alta manose	Um único domínio de ligação à manose; monovalente	HIV-1, HCV
Scytovirin	~9.7 kDa	Alta manose	Dois domínios distintos, estruturalmente semelhantes, ricos em folhas β ; bivalente	HIV-1, SARS-CoV-2, Ebola, HCV, HSV
Dm-CVNH	~11 kDa	Oligomanose e alta manose	Dois domínios compactos com 5 folhas β e 2 hélices α cada; alta homologia com CV-N	HIV-1, HSV-1, SARS-CoV-2

1.6. Família *Herpesviridae*

A família *Herpesviridae* é composta por vírus envelopados que apresentam genoma de DNA dupla fita (dsDNA). São conhecidos por sua capacidade de estabelecer infecções latentes e por causar uma diversidade de doenças em humanos e animais (Knipe; Howley, 2013). A família *Herpesviridae* é subdividida em três subfamílias (Knipe; Howley, 2013) com base em critérios como tropismo celular, velocidade de replicação e características da latência: a subfamília *Alphaherpesvirinae* inclui o *Herpes simplex virus* tipo 1 (HSV-1), *Herpes simplex virus* tipo 2 (HSV-2) e o *Varicella-zoster virus* (VZV), caracterizados por replicação rápida e latência em neurônios sensoriais; a *Betaherpesvirinae* compreende o *Human cytomegalovirus* (HCMV), que infecta células epiteliais, fibroblastos endoteliais e mieloides, o *Human herpesvirus 6A* (HHV-6A), *Human herpesvirus 6B* (HHV-6B) e o *Human herpesvirus 7* (HHV-7), que infectam

uma ampla variedade de tipos celulares, como linfócitos T CD4+, células natural killer, células epiteliais e endoteliais. Com replicação mais lenta e latência em células hematopoiéticas; por fim, a subfamília *Gammaherpesvirinae* abrange o *Epstein-Barr virus* (EBV) e o *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus* (KSHV ou HHV-8), cuja latência ocorre predominantemente em células linfoides e que estão associados a doenças linfoproliferativas e tumores (Cohen 2020).

A ampla diversidade de manifestações clínicas atribuídas aos herpesvírus humanos reflete sua capacidade singular de modular o sistema imune, estabelecer latência em compartimentos específicos (Quadro 3) e reativar sob condições fisiológicas ou patológicas (Cohen 2020). Essa versatilidade destaca sua importância clínica e epidemiológica em populações vulneráveis, como neonatos e pacientes imunocomprometidos.

O estabelecimento da latência pelos herpesvírus depende do cumprimento de um conjunto de mecanismos essenciais que asseguram a persistência do genoma viral no hospedeiro (Cohen 2020). Primeiramente, é necessário que a infecção seja persistente, sem que as células latentemente infectadas sejam eliminadas pelo sistema imune. Para tanto, o DNA viral é mantido de forma estável no núcleo celular, geralmente sob a forma de múltiplas cópias de epissomos circulares. Nos casos em que a latência ocorre em células em divisão, torna-se imprescindível a expressão de proteínas virais que promovem a ligação do genoma viral ao cromossomo da célula hospedeira, garantindo sua segregação adequada. Ademais, a expressão de proteínas virais deve ser rigidamente limitada, a fim de evitar a detecção imunológica (Cohen 2020). O genoma viral associa-se às histonas, formando um complexo semelhante à cromatina, que atua tanto na regulação da expressão gênica quanto na proteção contra fatores antivirais do hospedeiro. Nesse contexto, genes relacionados à replicação lítica são silenciados por meio de modificações heterocromáticas em histonas, enquanto outros podem ser ativados através de marcas eucromáticas, assegurando o equilíbrio entre latência e reativação viral. Por fim, para manter seu ciclo de persistência, o vírus deve ser capaz de reativar, processo geralmente iniciado pela sinalização da célula hospedeira em resposta a estímulos externos ou internos (Cohen 2020).

Quadro 3. Características Biológicas e Clínicas dos Herpesvírus: Local de Replicação, Latência e Manifestações Associadas.

Vírus	Latência	Doenças Primárias	Infecções em imunocomprometidos
HSV-1	Neurônio	Herpes labial	Infecções viscerais
HSV-2	Neurônio	Herpes genital, herpes neonatal	Infecção visceral
VZV	Neurônio	Catapora	Erupção cutânea disseminada
HCMV	Mieloide progenitoras,	Mononucleose infecciosa/congênita	Hepatite, retinite
HHV-6/7	Células imunes	Roséola	Encefalite
EBV/KSHV	Células B	Mononucleose infecciosa; Rash leve	Linfoma de células B; Sarcoma de Kaposi

Adaptado de (Cohen 2020).

Ademais, os herpesvírus possuem uma ampla gama de glicoproteínas virais em seus envelopes, cada uma desempenhando funções específicas nos estágios iniciais da infecção. O processo de entrada na célula hospedeira é altamente coordenado e envolve a ação sequencial de múltiplas glicoproteínas, responsáveis pela adesão, reconhecimento de receptores celulares e fusão de membranas. Notavelmente, cada espécie da família *Herpesviridae* apresenta

mecanismos de entrada distintos, que variam conforme o tropismo celular e os receptores utilizados. A entrada dos Herpes simplex vírus tipo 1 e 2 (HSV-1 e 2) envolve a utilização de pelo menos 5 glicoproteínas na interação com receptores na superfície celular (Knipe; Howley, 2013).

Para herpesvírus que infectam mais de um tipo celular, como o *Epstein–Barr vírus* (EBV), é observado que diferentes combinações de glicoproteínas são utilizadas para infectar células B e células epiteliais (Hutt-Fletcher 2014). Em células B, o processo de entrada do EBV ocorre majoritariamente por endocitose, seguida de fusão com a membrana do endossomo. Inicialmente, o vírion liga-se ao receptor CR2/CD21 por meio da glicoproteína gp350/220 — a principal glicoproteína de superfície do vírus. Essa interação promove a adesão viral e facilita a exposição de outras glicoproteínas envolvidas na fusão. Em seguida, a gp42 se liga às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II). Esta ligação induz mudanças conformacionais nas glicoproteínas gH/gL que, junto à gB, mediam o processo de fusão da membrana do vírus com a membrana do endossomo, permitindo a liberação do capsídeo viral no citoplasma (Knipe; Howley, 2013. Robertson 2023).

Por outro lado, a entrada do EBV em células epiteliais ocorre de forma distinta: por fusão direta com a membrana plasmática. Nesse contexto, o vírus pode inicialmente interagir com integrinas celulares (como $\alpha\beta 5$, $\alpha\beta 6$ e $\alpha\beta 8$) através da glicoproteína viral BMRF2. Posteriormente, a glicoproteína gH/gL reconhece e se liga a essas integrinas, promovendo um rearranjo necessário para ativar a gB, que executa a fusão da membrana viral com a membrana plasmática da célula hospedeira (Knipe; Howley, 2013).

1.6.1. Subfamília *Alphaherpesvirinae*

Os vírus HSV-1 e HSV-2 (Figura 10), pertencentes à subfamília *Alphaherpesvirinae*, caracterizam-se por um ciclo replicativo relativamente curto e pela ampla gama de hospedeiros suscetíveis à infecção. A partícula viral madura apresenta uma organização complexa composta por: (1) um genoma de DNA linear de fita dupla, com aproximadamente 152 kb, responsável pela codificação de ao menos 74 genes; (2) um capsídeo com simetria icosaédrica, constituído por 162 capsômeros derivados de seis proteínas distintas; (3) uma camada de tegumento formada por 20 a 23 proteínas, as quais desempenham funções tanto estruturais quanto regulatórias; e (4) um envelope lipídico externo, no qual se inserem pelo menos 12 glicoproteínas virais (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM e gN), que se diferenciam em morfologia e tamanho. Algumas dessas glicoproteínas encontram-se associadas em

heterodímeros, como gH/gL e gE/gI, enquanto a maioria ocorre sob a forma monomérica (Albecka et al., 2017).

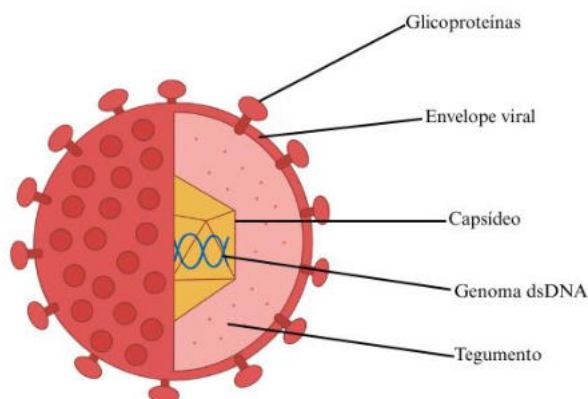


Figura 10. Imagem ilustrativa da estrutura do vírus herpes simplex (HSV). O vírus é composto por um genoma de DNA fita dupla (dsDNA) protegido por um capsídeo proteico. Externamente, encontra-se o envelope viral, derivado da membrana da célula hospedeira, no qual estão inseridas glicoproteínas responsáveis pela ligação e entrada do vírus na célula. Adaptado de Madavaraju et al. 2020.

O processo de entrada e disseminação do herpesvírus inicia-se pelo reconhecimento e ligação inicial dos vírions às moléculas de heparan sulfato (HSPG) presentes na superfície da célula hospedeira, etapa mediada principalmente pelas glicoproteínas gC e gB. Essa interação inicial facilita o contato subsequente com receptores celulares específicos, promovido pela glicoproteína gD, que reconhece moléculas como HVEM (Herpesvirus Entry Mediator), nectina-1 e o heparan sulfato 3-O-sulfatado (Campadelli-Fiume et al., 2000; Connolly et al., 2005). A ligação de gD a esses receptores induz uma mudança conformacional que desencadeia a ativação do complexo gH/gL (Atanasiu et al., 2007; Lazear et al., 2008). Esse complexo, por sua vez, regula positivamente a atividade fusogênica de gB, cuja inserção na membrana celular promove a fusão coordenada entre o envelope viral e a membrana plasmática da célula hospedeira (Atanasiu et al., 2010). Após a fusão há a liberação do capsídeo viral e proteínas associadas ao tegumento no citoplasma e o capsídeo é transportado até o núcleo, onde ocorre a liberação do genoma viral e o início da replicação do DNA (Figura 10). A replicação é seguida pela montagem de novos nucleocapsídeos, que posteriormente são direcionados à rede trans-Golgi (TGN) por meio do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi. Nesse compartimento, os vírions em formação adquirem o envelope e proteínas estruturais adicionais, tornando-se partículas maduras (Madavaraju et al. 2020).

Esses vírus maduros são então transportados em vesículas secretoras que se fundem à membrana plasmática, liberando as partículas infecciosas no meio extracelular. A liberação pode ocorrer tanto na superfície apical, permitindo a infecção de células ainda não infectadas, quanto na superfície lateral, o que viabiliza a propagação célula a célula por meio da interação com proteínas de adesão transmembrana (Figura 11). Dessa forma, o vírus assegura a disseminação eficiente da infecção e a continuidade do ciclo replicativo (Eisenberg et al., 2012 ; Fontana et al., 2017 ; Sathiyamoorthy et al., 2017 ; Weed et al., 2017).

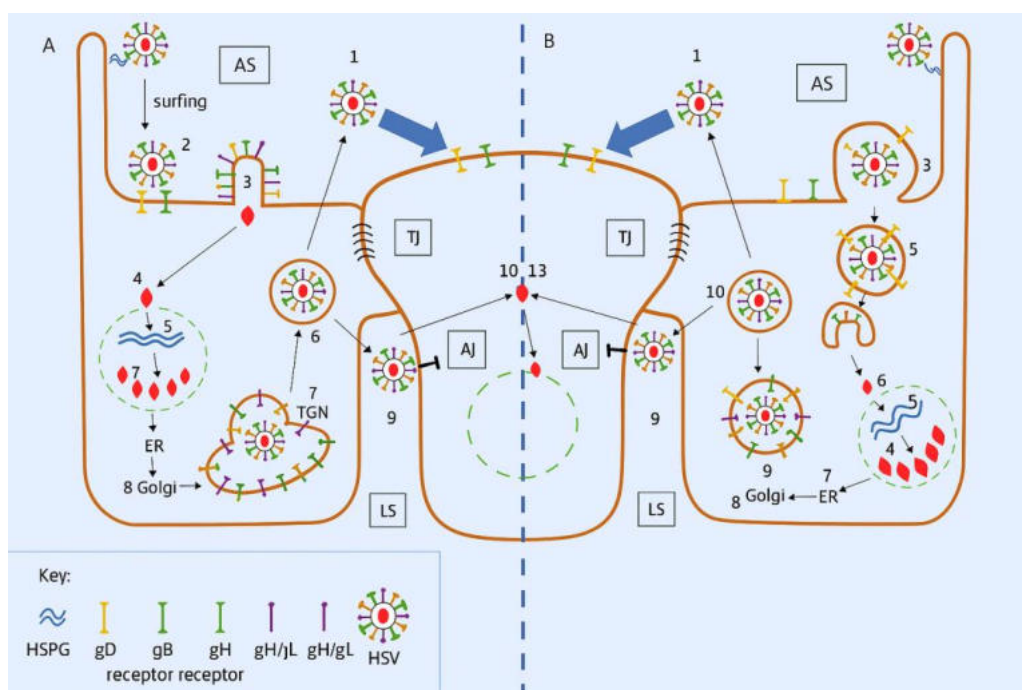


Figura 11. Ciclo replicativo do HSV-2. (A) Fusão direta com a membrana plasmática e disseminação célula a célula: (1) ligação inicial do vírus aos proteoglicanos de sulfato de heparan (HSPG); (2) interação das glicoproteínas virais com receptores da célula hospedeira; (3) fusão do envelope viral e liberação do conteúdo no citosol; (4) transporte do capsídeo e liberação do DNA viral no núcleo; (5–6) replicação do DNA e montagem do nucleocapsídeo; (7–9) trânsito do nucleocapsídeo recém-sintetizado pelo retículo endoplasmático (ER) e Golgi até a rede trans-Golgi (TGN); (10) HSV maduro em vesículas secretoras; (11) liberação do vírus na superfície apical, com potencial para infectar novas células; (12) liberação pela superfície lateral, promovendo disseminação célula a célula via interação com proteínas de adesão. (B) Via endocítica de entrada viral e disseminação célula a célula: (1) ligação inicial do vírus ao HSPG; (2) internalização mediada por projeções semelhantes a pseudópodes, envolvendo receptores celulares; (3) formação de endossomo, fusão do envelope viral com a membrana endossômica e liberação do conteúdo viral no citosol; (4) transporte do capsídeo e liberação do DNA no núcleo; (5–6) replicação do DNA e montagem do nucleocapsídeo; (7–9) trânsito pelo ER e Golgi até o TGN; (10) HSV maduro em vesículas secretoras; (11) liberação apical de partículas infecciosas; (12) liberação lateral, com infecção da célula vizinha por meio da ligação a proteínas transmembrana e entrada do capsídeo no citosol. Abreviações: AS, superfície apical; LS, superfície lateral; TJ, junção estreita; AJ, junção aderente; HSPG, proteoglicano de sulfato de heparana; ER, retículo endoplasmático; TGN, rede trans-Golgi. Adaptado de Madavaraju et al. 2020.

1.7. Glicanas de HSV-1 e HSV-2

Dentro das 12 glicoproteínas codificadas pelo HSV-1, diversas glicoproteínas estruturais — como gB, gC, gD, gE, gG e gH — apresentam múltiplos sítios de N-glicosilação com funções

estruturais e funcionais críticas. Dentre essas, a glicoproteína B (gB), principal mediadora da fusão entre as membranas viral e celular, possui seis sítios potenciais de N-glicosilação (Figura 12), localizados nas posições Asn-87, Asn-141, Asn-398, Asn-430, Asn-489 e Asn-674. Essas modificações são fundamentais para o correto dobramento da gB, sua estabilidade e funcionalidade no processo de entrada viral. Dentre os sítios de N-glicosilação da glicoproteína B (gB) do HSV-1, destaca-se a modificação do resíduo Asn-141, que exerce um papel crucial na evasão imune mediada por anticorpos humanos. Estudos estruturais indicam que o N-glicano ligado a Asn-141 atua como um verdadeiro escudo glicídico, mascarando aproximadamente 27 resíduos de aminoácidos da superfície da gB na sua conformação de pré-fusão. Dentre esses, 19 estão localizados nas regiões funcionais FR2 e FR3, previamente identificadas como alvos de anticorpos monoclonais neutralizantes. Essa glicosilação específica é particularmente relevante por encobrir o resíduo Asp-419, essencial para a interação com o anticorpo altamente neutralizante C226, cuja função é impedir a associação de gB com o complexo gH/gL e, conseqüentemente, a fusão viral (Fukui et al., 2023).

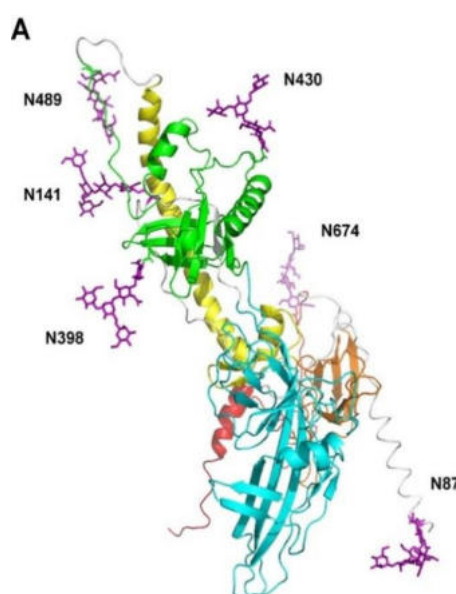


Figura 12. Estrutura tridimensional da glicoproteína B. A representação demonstra os possíveis locais de N-glicosilação na gB do HSV-1. (Adaptado de Fukui et al., 2023).

Ademais, somando-se aos achados relacionados à glicosilação das glicoproteínas de superfície dos herpesvírus, destaca-se a glicoproteína B (gB) do HSV-2, que, assim a gB presente no HSV-1, exerce um papel fundamental na fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira. A gB do HSV-2 também é classificada como uma proteína de fusão de classe III, caracterizada por sua capacidade de mediar a fusão de membranas por meio de um mecanismo dependente de mudanças conformacionais estruturadas (Luo et al. 2015).

O Herpes simplex vírus tipo 2 (HSV-2) e o tipo 1 (HSV-1) compartilham aproximadamente 82% de identidade na sequência de aminoácidos (Luo et al. 2015) refletindo sua proximidade evolutiva e similaridade estrutural. Dentro da família dos herpesvírus, a glicoproteína B (gB) é a proteína mais conservada, apresentando alta homologia entre os sorotipos HSV-1 e HSV-2 (Luo et al. 2015; LeGoff et al. 2014). Essa conservação se reflete em sua função biológica, pois a gB atua de forma semelhante na mediação da entrada viral em ambas as variantes, sendo essencial para o processo de fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira. A elevada conservação da gB ressalta sua importância crítica no ciclo de vida do vírus e indica que mecanismos de glicosilação e interação com o sistema imune podem ser semelhantes entre HSV-1 e HSV-2 (Luo et al. 2015).

A glicoproteína B (gB) do HSV-2 possui sete potenciais sítios de glicosilação do tipo N-glicanas, cuja modificação é crucial para sua funcionalidade. Estudos experimentais demonstraram que mutações nos sítios Asn-390, Asn-483 e Asn-668 resultam em redução significativa da fusão célula-célula e da entrada viral, indicando a importância desses glicanos para os processos de penetração e disseminação viral (Luo et al. 2015). Além disso, a mutação no sítio Asn-133 impacta diretamente a expressão da gB, interferindo na produção de partículas virais infecciosas ao bloquear o transporte da proteína do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi (Luo et al. 2015). Esses achados evidenciam que as N-glicanas são fundamentais não apenas para a conformação estrutural da gB do HSV-2, mas também para sua adequada localização intracelular e funcionalidade na infecção viral.

1.8. Terapia vigente contra HSV-2 e emergência de resistência

O tratamento da infecção por HSV-2 atualmente depende de antivirais como aciclovir (Figura 13) (pró-fármaco análogo de nucleosídeo ativado pela timidina quinase viral), valaciclovir e famciclovir, os quais são eficazes na supressão dos episódios clínicos agudos, porém não promovem erradicação viral nem cura definitiva, evidenciando a relevância de investigações sobre os mecanismos de resistência a essas terapias (CDC, 2021).

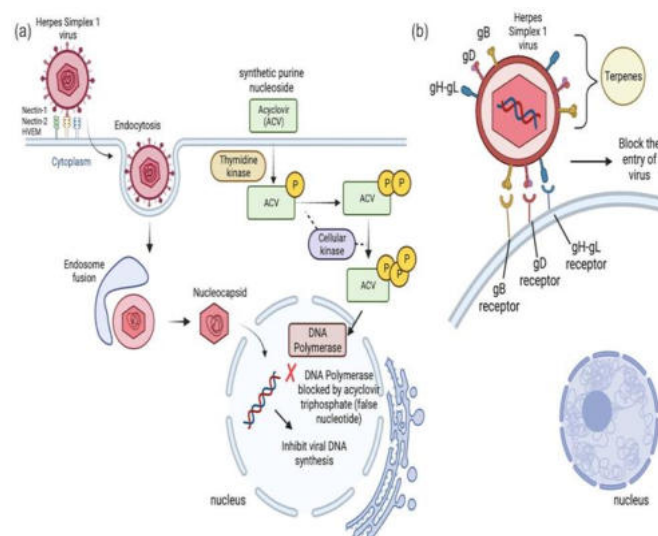


Figura 13. Mecanismo de ação do aciclovir durante a infecção pelo HSV-2. O aciclovir, um análogo sintético de nucleosídeo purínico, é fosforilado preferencialmente pela timidina quinase (TK) viral, uma vez que a TK de células não infectadas apresenta baixa afinidade por esse composto. Após sua ativação em aciclovir trifosfato, o fármaco atua como um nucleotídeo falso, sendo incorporado pela DNA polimerase viral e promovendo o bloqueio da síntese de DNA. Esse processo interrompe a replicação do HSV-2 com mínima citotoxicidade para células não infectadas (Adaptado de Sea et al. 2023).

A resistência do HSV, especialmente do HSV-2, ao aciclovir representa um importante desafio clínico, sobretudo em indivíduos imunocomprometidos, nos quais a prevalência de cepas resistentes varia entre 3,5% e 10%, em contraste com a incidência inferior a 1% observada em pacientes imunocompetentes (Schalkwijk; Snoeck; Andrei, 2022). Esse fenômeno está majoritariamente associado a mutações nos genes UL23, que codifica a timidina quinase viral essencial para a primeira etapa de ativação do aciclovir, e UL30 (Schalkwijk; Snoeck; Andrei, 2022), que codifica a DNA polimerase viral. Alterações nessas proteínas reduzem ou impedem a conversão do pró-fármaco em sua forma ativa, comprometendo sua ação antiviral. A resistência tende a surgir em cenários de uso prolongado ou profilático, particularmente sob esquemas de dosagem inadequados, havendo relatos associados ao uso estendido de corticosteróides (Kriesel et al. 2005). Observa-se ainda que a interrupção da terapia pode resultar em reversão fenotípica da resistência, que retorna com a reintrodução do aciclovir (Kriesel et al. 2005). Importante destacar que tanto cepas sensíveis quanto resistentes mantêm a capacidade de estabelecer latência e sofrer reativações, o que complexifica o manejo clínico. Há também registros de transmissão de variantes resistentes a parceiros sexuais mesmo na ausência de profilaxia antiviral contínua (Kriesel et al. 2005). A transmissão de cepas resistentes ao aciclovir evidencia um desafio crescente na prática clínica, reforçando a necessidade do desenvolvimento de terapias alternativas capazes de aprimorar o manejo de infecções por HSV em cenários de resistência antiviral (Schalkwijk; Snoeck; Andrei, 2022).

2. JUSTIFICATIVA

As infecções causadas pelo vírus herpes simples tipo 2 (HSV-2) representam um desafio persistente à saúde pública global, especialmente devido à sua elevada prevalência, capacidade de estabelecer latência vitalícia (Cohen 2020) e recorrência clínica. Apesar da disponibilidade de antivirais como o aciclovir, o tratamento permanece limitado: o fármaco não erradica a infecção (CDC, 2021), não impede completamente a transmissão e enfrenta o problema crescente da resistência viral, particularmente em indivíduos imunocomprometidos. Esse cenário evidencia lacunas terapêuticas significativas e ressalta a necessidade urgente de novas abordagens antivirais mais robustas, seguras e eficazes

Entre essas moléculas, a CV-N tem despertado interesse significativo em virtude de sua capacidade de inibir a entrada de diversos vírus envelopados nas células hospedeiras, por meio da interação com resíduos de manose presentes nas glicoproteínas da superfície viral. Estudos anteriores demonstraram que a CV-N pode ser eficaz não apenas contra o HIV-1, mas também contra HSV-1 (Yu et al. 2010), Ebola (Barrientos et al., 2003) e Influenza (Smee et al., 2008), sugerindo um potencial terapêutico que se estende a diferentes famílias virais com mecanismos de infecção mediados por glicoproteínas N-glicosiladas ricas em manose.

Além de seu perfil antiviral, outro aspecto que fortalece a relevância da CV-N como candidata terapêutica é sua viabilidade para administração tópica e em mucosas (Tsai et al, 2003, Tsai et al, 2004). Essa forma de aplicação já foi explorada em estudos *in vivo*, demonstrando-se promissora tanto em termos de biodisponibilidade quanto de segurança local. Tal característica torna a CV-N especialmente interessante para o enfrentamento de infecções que se instalam em superfícies epiteliais, como os vírus respiratórios — que penetram pela mucosa do trato respiratório — e o HSV, cuja infecção aguda ocorre com frequência pela mucosa genital ou em lesões cutâneas (Yu et al. 2010).

O projeto se justifica pela necessidade de investigar a ação da CV-N frente ao HSV-2, um vírus de grande relevância clínica e epidemiológica. Além das lesões genitais recorrentes, o HSV-2 pode ocasionar complicações graves, como encefalite herpética, cegueira infecciosa e herpes neonatal, todas associadas a elevada morbimortalidade (CDC, 2021). Esse cenário é agravado pelo aumento progressivo de casos resistentes ao aciclovir, principal fármaco disponível, o que evidencia as limitações das opções terapêuticas disponíveis. Nesse contexto, a investigação da CV-N contra o HSV-2 visa não apenas contribuir para a ampliação do arsenal antiviral, mas também para o desenvolvimento de estratégias inovadoras que atuem em alvos conservados, como as glicanas do HSV-2. Essa abordagem permite verificar a consistência e a

amplitude da ação antiviral dessa molécula, utilizando um vírus-alvo que impõe desafios específicos à resposta imune e à terapêutica convencional. Destaca-se ainda o interesse em vírus da família *Herpesviridae*, dada a eficácia previamente observada contra o HSV-1, o que reforça a relevância de investigar se esse efeito pode ser reproduzido ou até ampliado frente a outros membros da mesma família (Yu et al. 2010).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar a atividade antiviral da lectina Cyanovirin-N contra o vírus herpes simplex tipo 2 por meio de ensaios *in vitro*.

3.2. Objetivos específicos

- Investigar a citotoxicidade da CV-N em diferentes linhagens celulares, incluindo células Vero CCL-81, HeLa e RPMI, através de ensaios de viabilidade celular utilizando CellTiter Blue;
- Avaliar a capacidade neutralizante da CV-N contra HSV-2 por meio de ensaios de redução de placas de lise em monocamadas de células Vero CCL-81;
- Avaliar, por imunofluorescência, o efeito citopático do HSV-2 em células na presença ou ausência da CV-N, considerando a formação de sincícios típica da infecção *in vitro*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Linhagens celulares

Com o intuito de estabelecer um painel viral robusto para avaliação comparativa da eficácia antiviral da CV-N foram selecionadas distintas linhagens celulares, a saber: A linhagem celular HeLa (ATCC® CCL-2™), derivada de carcinoma de colo do útero humano, foi utilizada como modelo epitelial. Importante ressaltar que, por se tratar de uma linhagem epitelial humana, as células HeLa oferecem um modelo para estudos de infecção por HSV-2. Ainda que não reproduzam fielmente as características dos tecidos genitais, essas células fornecem um contexto biológico mais próximo ao tipo celular comumente infectado pelo vírus, permitindo avaliar a citotoxicidade. A linhagem epitelial nasal humana (RPMI 2650), gentilmente fornecida pela pesquisadora Isadora Alonso, do Laboratório de Genética e Imunologia das Infecções Virais, foi utilizada como modelo representativo do epitélio do trato respiratório superior nos ensaios de infecção com o HSV-2, ela já foi demonstrada como susceptível e permissiva à infecção pelo HSV-1 (BCRJ), evidenciando sua capacidade de sustentar a replicação de herpesvírus em células epiteliais humanas. A linhagem VERO (BCRJ, CCL-81™), derivada de rim de *Macaca mulatta*, foi utilizada como sistema de referência para os ensaios de infecção com o vírus herpes simples tipo 2 (HSV-2). A escolha da VERO se justifica por sua elevada permissividade a uma ampla variedade de vírus, incluindo o HSV-1 e HSV-2. A escolha dessas linhagens baseou-se na capacidade de suportar a replicação dos vírus-alvo, garantindo a suscetibilidade celular necessária para a infecção eficiente e assegurando a relevância e aplicabilidade dos dados obtidos nos ensaios subsequentes.

4.2. Análise da citotoxicidade da CV-N *in vitro*

Inicialmente, procedeu-se à realização de um ensaio de viabilidade celular com o objetivo de determinar a tolerabilidade das células frente a diferentes concentrações de CV-N. Esta etapa preliminar foi essencial para assegurar que as condições experimentais adotadas nos ensaios antivirais não fossem influenciadas por efeitos citotóxicos intrínsecos às moléculas, o que poderia comprometer a interpretação dos resultados quanto à sua ação antiviral. Para esse fim, utilizou-se o tampão PBS, diluente das lectinas testadas, como controle positivo de viabilidade, estabelecendo um parâmetro basal de integridade celular na ausência de tratamento farmacológico. As células foram semeadas em placas de cultura de 96 poços, na densidade de $6,00 \times 10^3$ células por poço de Vero CCL-81, RPMI e Hela e, após a adesão, expostas às diferentes concentrações da CV-N. As células foram previamente tratadas com as diferentes

condições experimentais, consistindo em meio DMEM High Glucose suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) com diluições 1:10 e 1:4 da CV-N, distribuídas em uma faixa logarítmica de concentrações (0,1526; 0,6104; 2,4414; 9,7656; 39,0625; 156,25; 625; 2500; 10000 nM) foram incubadas, em um volume total de 100 μ L, por um período fixo de 72 horas, permitindo a observação dos efeitos resultantes da exposição prolongada aos compostos. Ao término desse período, a viabilidade celular foi mensurada por meio do ensaio fluorescente CellTiter-Blue®, adicionando-se 20 μ L do reagente por poço, seguido de incubação por 4 horas antes da leitura da fluorescência. O mesmo protocolo experimental, incluindo volumes, tempos de incubação e condições gerais, foi aplicado às três linhagens celulares avaliadas (Vero CCL-81, HeLa e RPMI). Em seguida, a fluorescência emitida foi medida nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 560/590nm utilizando o equipamento GloMax® Discover (Promega). As curvas de citotoxicidade foram obtidas a partir da normalização dos valores de fluorescência em relação ao controle não tratado, sendo posteriormente ajustadas por regressão não linear de modelo sigmoidal (dose–resposta) utilizando o software GraphPad Prism 9. Tal abordagem possibilitou a obtenção de dados precisos acerca do perfil citotóxico de cada composto, permitindo a definição de concentrações seguras para os testes antivirais posteriores.

4.3. Ensaio de propagação viral

O vírus HSV-2 utilizado neste estudo foi gentilmente cedido pela Professora Maria Teresa Villela Romanos, do Departamento de Virologia do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Inicialmente, foi realizado um ensaio de determinação da multiplicidade de infecção (*multiplicity of infection* – MOI) ideal para obter-se altos títulos virais, com o objetivo de avaliar dois parâmetros principais: a melhor MOI para infecção e o intervalo de tempo que resultasse em maior título viral. Para isso, foram utilizadas quatro garrafas de cultura de 25 cm^2 , previamente plaqueadas a 1×10^6 células por garrafa, mantidas em meio DMEM High Glucose suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), incubadas a 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO_2 por 24 horas antes da infecção.

No dia da infecção, as células foram expostas a diferentes MOIs (0,01; 0,001 e 0,0001), utilizando 5,45 μ L de inóculo viral, completados para um volume final de 5 mL de meio DMEM High Glucose sem SFB. As culturas foram então incubadas por 1 hora na estufa para permitir a adsorção viral. Após esse período, o inóculo foi removido e substituído por 10 mL de meio de manutenção (DMEM High Glucose suplementado com 5% de SFB). As amostras foram

coletadas nos tempos de 24, 48 e 72 horas pós-infecção para posterior quantificação do título viral.

Com a determinação dos parâmetros ideais para obtenção de um título viral mais elevado, foi conduzido o ensaio de propagação viral utilizando a MOI de 0,001 e o tempo de infecção de 72 horas. Para esse procedimento, foram plaqueadas 3×10^6 células em cinco garrafas de cultura de 75 cm², sendo quatro destinadas à infecção e uma utilizada como controle negativo (MOCK).

A infecção foi conduzida mediante a adição de 5,45 µL do inóculo viral, previamente diluído em DMEM High Glucose sem suplementação de soro, totalizando 3 mL de volume final por garrafa. O grupo mock foi preparado de maneira idêntica, exceto pela ausência do vírus, recebendo o mesmo volume de DMEM High Glucose sem soro utilizado para diluição do inóculo. As culturas foram incubadas por 1 hora na estufa (37 °C, 5% CO₂) para permitir a adsorção viral. Em seguida, o inóculo foi removido e substituído por meio DMEM High Glucose suplementado com 2% de SFB. As células foram mantidas sob essas condições por um período de 72 horas.

Ao término da infecção, o sobrenadante das culturas foi coletado, centrifugado a $300 \times g$ por 10 minutos para remoção de detritos celulares e, posteriormente, filtrado em membrana de 0,22 µm. Após a filtração, o volume foi homogeneizado e aliquoteado para armazenamento e utilização em ensaios subsequentes.

4.4. Titulação por ensaio de placa de lise

Para a realização da titulação viral por meio do ensaio de formação de placas de lise (*plaque assay*), inicialmente foi realizado o preparo e cultivo celular (Tabela 2). As células utilizadas, VERO CCL-81, foram inicialmente tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em volume adequado de meio de cultura DMEM high glucose. Em seguida, foram semeadas em placas de 12 poços $1,67 \times 10^5$ células por poço. Após plaqueamento, as placas foram agitadas suavemente em padrão de cruz para garantir a distribuição homogênea das células e incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas para atingir confluência.

Tabela 2. Resumo dos vírus testados, modelos celulares utilizados para cultivo in vitro e período de incubação.

Vírus	Linhagem celular	Incubação (dias)
HSV-1	VERO CCL-81	3
HSV-2	VERO CCL-81	2

No dia seguinte, procedeu-se com a diluição do inóculo viral. Para isso, alíquotas do HSV-2 previamente armazenadas foram descongeladas, homogeneizadas e diluídas em série (10^{-1} a 10^{-6}) utilizando placa de poço fundo contendo 450 μ L de DMEM não-suplementado por poço. Cada diluição foi realizada por transferência de 50 μ L da diluição anterior para o poço seguinte, utilizando ponteiras estéreis novas a cada transferência. Paralelamente, o meio de cultura presente nas placas foi cuidadosamente removido com pipeta multicanal, sem perturbar a monocamada celular, e foram adicionados 200 μ L da diluição viral em cada poço. As placas foram incubadas por 1 hora na estufa para promover a adsorção viral, sendo agitadas a cada 10 minutos para favorecer a distribuição do vírus sobre a monocamada. Ao término do período de infecção, o inóculo viral foi removido e cada poço recebeu 1 mL de meio α -MEM semi-sólido, contendo carboximetilcelulose (CMC), a fim de limitar a difusão viral e permitir a formação de placas visíveis para quantificação da infecção, previamente preparado na concentração de 1,5%. Após 48 horas de incubação, as células foram fixadas com formaldeído a 10%. O conteúdo dos poços foi então descartado na capela e as placas lavadas suavemente com água corrente. Em seguida, foi realizada a coloração com cristal violeta (Cristal violeta 0,5% (p/v) em água destilada, contendo 10% de etanol (v/v)) por 5 minutos à temperatura ambiente, seguido de remoção da solução corante e lavagem com água corrente. Por fim, as placas foram deixadas para secagem na estufa a 37°C. As placas de lise celular foram quantificadas visualmente para determinação do título viral em PFU/mL (unidades formadoras de placa por mililitro). A contagem foi realizada apenas nos poços que apresentaram de 10 a 100 PFUs visíveis e contáveis, evitando sobreposição das placas e garantindo maior precisão na quantificação. Cada condição experimental foi realizada em placas de 12 poços, com três réplicas biológicas e três réplicas experimentais.

4.5. Back Titration

O objetivo desta metodologia foi confirmar o título viral de HSV-2 obtido após o ensaio de propagação, garantindo a precisão das unidades formadoras de placa (PFU) utilizadas nos experimentos subsequentes.

As células VERO CCL-81 foram plaqueadas em placas de 6 poços, sendo utilizadas três placas a partir de uma garrafa de 75 cm² em confluência. Após centrifugação, o pellet celular foi ressuspensionado em volume adequado de meio, considerando 2 mL por poço, com acréscimo de 1 mL extra para evitar perdas por pipetagem ou formação de bolhas. O plaqueamento foi realizado de forma uniforme e, em seguida, as placas foram mantidas em estufa de CO₂ por 24 horas.

Para a infecção, foi preparada a diluição do vírus HSV-2 a partir do título previamente determinado ($7,95 \times 10^5$ PFU/mL), obtido por titulação após o ensaio de propagação. Foram preparados inóculos correspondentes a 100, 50 e 25 PFU, que foram adicionados às células e incubados por 1 hora, com agitação a cada 10 minutos para garantir a adequada disseminação viral. Após esse período, o inóculo foi removido e substituído por meio semi-sólido preparado com carboximetilcelulose (CMC 1,5%), obtido a partir da diluição de CMC 3% em meio Alfa-MEM 2× suplementado com bicarbonato de sódio, antibióticos e soro fetal bovino. As placas foram incubadas até 2 dias pós-infecção (d.i.), quando se procedeu à fixação com formaldeído 10% por 30 minutos, seguida de coloração com cristal violeta. Por fim, as placas foram lavadas, secas e armazenadas para posterior análise das placas formadas.

4.6. Ensaios de neutralização viral por redução de placa de lise

Para a realização do ensaio de neutralização viral com a proteína CV-N (Tabela 3), utilizou-se o modelo de redução de placas (plaque reduction assay) em células VERO CCL-81, previamente plaqueadas conforme descrito no item 3.5.

Tabela 3. Resumo dos vírus testados, modelos celulares utilizados para cultivo *in vitro* e período de incubação.

Vírus	Modelo celular	Incubação (dias)
HSV-1	VERO CCL-81	3
HSV-2	VERO CCL-81	2

Simultaneamente, foi preparado o meio semi-sólido contendo carboximetilcelulose (CMC) a 1,5%, utilizado para restrição da disseminação do vírus após a infecção. No segundo dia, foi realizada a preparação das diluições seriadas da CV-N (concentração inicial: 1µM), com diluições em série 1:4, utilizando 240 µL de base por poço e 80 µL por transferência, até atingir a concentração final desejada de 2000 nM. Em paralelo, o vírus foi diluído a partir de um estoque com título de $1,73 \times 10^6$ PFU/mL. Considerando a concentração desejada de 100 PFU por 0,1 mL (ou 1000 PFU/mL), a diluição foi ajustada para que a mistura final de vírus e CV-N resultasse em 50 PFU por poço. Para isso, foram utilizados 8,67 µL do vírus estoque diluídos em 15 mL de DMEM sem soro. As soluções de CV-N diluída e vírus foram então combinadas na proporção 1:1 em poços de uma deep well, totalizando 480 µL por condição. As misturas foram incubadas por 1 hora a 37 °C para permitir a interação CV-N/Vírus. Após a incubação, foram transferidos 200µL de cada mistura para os poços das placas previamente plaqueadas com células. Cada condição foi testada em duplicata. Após 1 hora de infecção, as placas foram

cuidadosamente manipuladas para remoção do inóculo viral, e adicionou-se 1mL de meio CMC a 1,5% em cada poço. O tempo de incubação variou de acordo com o vírus utilizado, sendo realizadas fixações com formaldeído a 10% após 48 ou 72 horas, conforme as características do ciclo replicativo de cada vírus. O conteúdo dos poços foi cuidadosamente descartado em capela de segurança biológica, seguido de lavagem com água corrente, evitando-se o jato direto para não desestabilizar a monocamada celular. Em seguida, procedeu-se à coloração com cristal violeta. Após a secagem das placas na estufa, realizou-se a contagem das placas de lise para a determinação da atividade antiviral residual da CV-N frente ao vírus HSV-2 e HSV-1. O HSV-1 utilizado neste experimento com o objetivo de comparar a atividade neutralização da CV-N frente ao HSV-1 e HSV-2, foi isolado a partir de uma amostra de um paciente com COVID-19 grave, caracterizando uma coinfeção produtiva por SARS-CoV-2 e alfa-herpesvírus humano 1; o isolado encontra-se registrado sob o número de acesso MT846410 na base de dados GenBank. As curvas de neutralização viral foram obtidas a partir da contagem de placas de lise normalizada pelo controle infectado, e os valores de IC₅₀ foram determinados por regressão não linear do tipo log(inibidor) vs. response, utilizando o software GraphPad Prism 9.

4.7. Imunofluorescência

A imunofluorescência foi realizada com o objetivo de analisar a propagação do HSV-2 em cultura celular e avaliar a replicação viral em diferentes condições de infecção. Para isso, foram plaqueadas $6,00 \times 10^3$ células por poço em placas de 96 poços, utilizando meio de cultura DMEM high glucose suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB). As células foram então infectadas com HSV-2 utilizando uma série ampla de MOIs, incluindo 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001, 0,00001, 0,000001 e 0,0000001. Após 48 horas de infecção, procedeu-se ao protocolo de imunomarcagem para detecção das células infectadas. Inicialmente, realizou-se a fixação com paraformaldeído (PFA) a 4% por 15 minutos à temperatura ambiente (100 µL/poço), seguida de duas lavagens com PBS (100 µL/poço). O bloqueio e a permeabilização celular foram conduzidos utilizando solução de BSA a 3% em PBS contendo 0,2% de Triton X-100, por 20 minutos (50 µL/poço). Em seguida, as células foram lavadas com PBS (100 µL/poço) e incubadas com soro de um paciente confirmado como positivo para HSV-2, cujo diagnóstico foi realizado pelo setor de Diagnóstico do Laboratório de Virologia Molecular, sob responsabilidade do Professor Orlando Ferreira, diluído 1:10 em PBS, por 2 horas à temperatura ambiente (30 µL/poço). Após três lavagens com PBS (100 µL/poço cada), procedeu-se à incubação com o anticorpo secundário AlexaFluor 488 Donkey Anti-human IgG (1:1000 em PBS) associado a DAPI (1:20.000 em PBS) por 1 hora à temperatura ambiente (30 µL/poço).

Posteriormente, as células foram lavadas três vezes com PBS (100 µL/poço) e mantidas em 200 µL de PBS até a aquisição das imagens em microscópio invertido de Epifluorescência Olympus.

4.8. Citometria

A análise por citometria de fluxo foi realizada com o objetivo de quantificar a proporção de células infectadas por HSV-2 sob diferentes concentrações do antiviral CV-N. Para isso, foram plaqueadas $6,00 \times 10^3$ células Vero CCL-81 por poço em placas de 96 poços, utilizando DMEM High Glucose suplementado com 5% de SFB. Após adesão celular, as células foram infectadas com HSV-2 utilizando uma MOI fixa de 0,1 para todas as concentrações testadas de CV-N (15,625 nM; 62,5 nM; 250 nM; 1000 nM). Foram incluídos como controles células mock (não infectadas) e células só infectadas (HSV-2 sem CV-N). As placas foram incubadas por 48 horas para permitir o estabelecimento da infecção.

Decorrido esse período, as células foram submetidas ao protocolo de imunomarcagem para análise por citometria. A fixação foi realizada com paraformaldeído (PFA) a 4% por 15 minutos à temperatura ambiente (100 µL/poço), seguida de duas lavagens com PBS (100 µL/poço). A permeabilização e o bloqueio foram conduzidos com BSA 3% em PBS contendo 0,2% de Triton X-100 por 20 minutos (50 µL/poço). Após nova lavagem com PBS, procedeu-se à incubação com soro humano positivo para HSV-2 (diagnosticado pelo setor de Diagnóstico do Laboratório de Virologia Molecular, sob coordenação do Prof. Orlando Ferreira), diluído 1:10 em PBS, por 2 horas à temperatura ambiente (30 µL/poço).

As células foram lavadas três vezes com PBS e incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário AlexaFluor 488 Donkey anti-human IgG (1:1000), diluído em PBS (30 µL/poço). Após três lavagens finais com PBS, as células foram ressuspensas em 200 µL de PBS. A aquisição dos dados foi realizada em citômetro de fluxo Accuri C6, com leitura em SSC (Side Scatter) e FSC (Forward Scatter). A fluorescência foi detectada pelo filtro FL1 (513–548 nm), utilizando excitação com laser azul 488 nm.

5. RESULTADOS

5.1. HSV-2 foi efetivamente propagado em cultura de células Vero CCL-81

Adicionalmente, foi conduzida uma análise qualitativa por imunofluorescência, com o objetivo de verificar a presença e distribuição dos antígenos virais nas células infectadas. Para essa etapa, utilizou-se soro de paciente positivo para HSV-2 como anticorpo primário, permitindo a detecção do vírus em células Vero CCL-81 infectadas *in vitro*.

A avaliação microscópica após 48 horas de infecção revelou que, em MOIs mais elevadas (10 e 1), ocorreu acentuada morte celular, assim, a intensa replicação lítica do HSV-2 levou à redução do número de células viáveis por poço, o que consequentemente resultou em menor detecção do sinal verde associado às partículas virais. Por outro lado, nas condições com MOIs mais baixas, observou-se maior número de células viáveis (Figura 14), embora apresentando alterações morfológicas características da infecção, como formação de sincícios. Nessas condições, especialmente na MOI de 0,1, a presença simultânea entre os antígenos virais e as células foi mais intensa, indicando uma infecção indicando um aumento na intensidade do sinal correspondente aos antígenos virais.

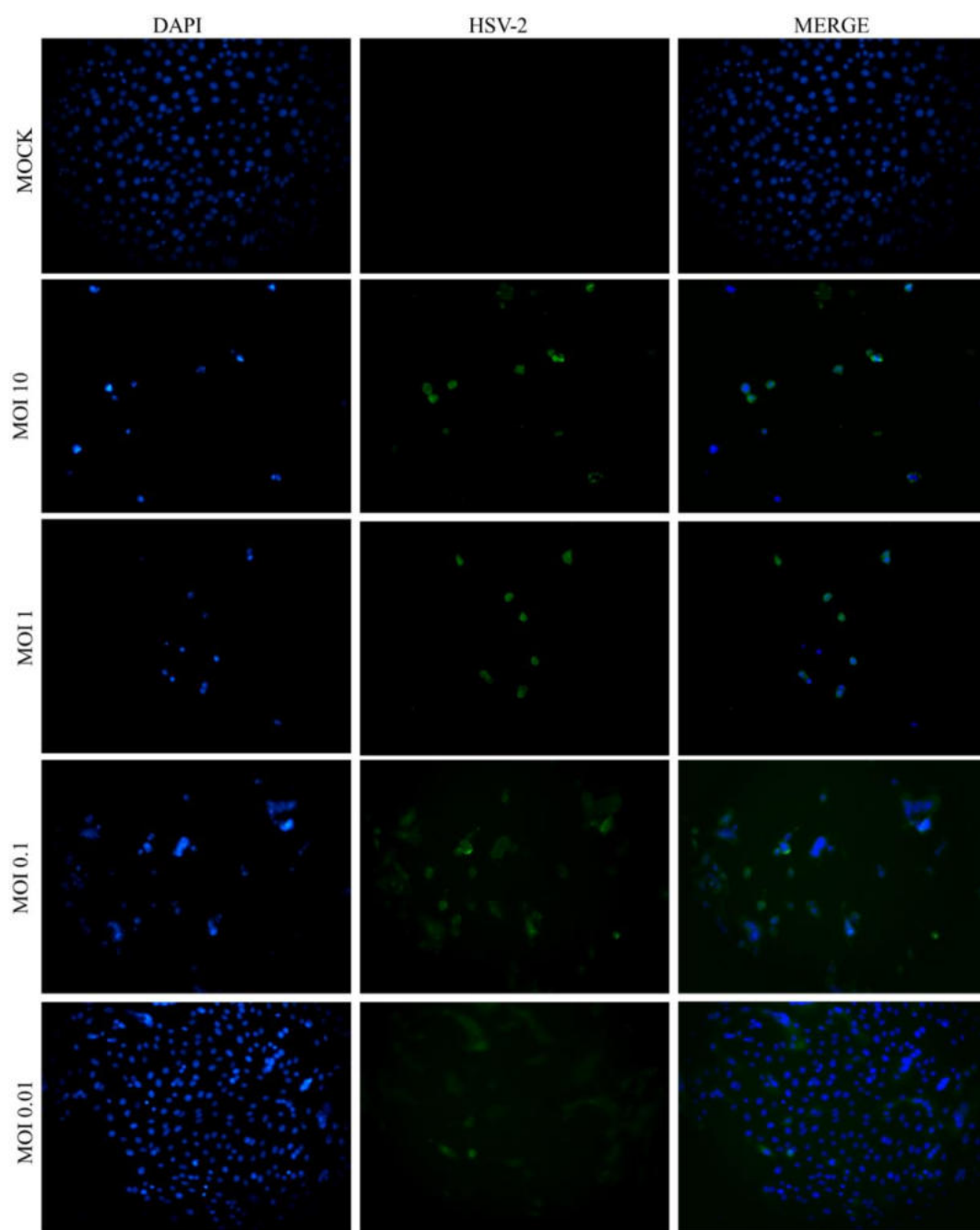


Figura 14. Imunofluorescência de células infectadas por HSV-2. Na disposição das imagens, a coluna vertical corresponde aos controles e às diferentes concentrações de CV-N, enquanto as colunas horizontais representam os antígenos virais (verde), DAPI (azul) e a imagem combinada (MERGE).

5.2. As linhagens celulares humanas HeLa e RPMI apresentam maior tolerância à CV-N que as células Vero

Para avaliar a citotoxicidade da CV-N em linhagens celulares suscetíveis ao HSV-2, células Vero CCL-81, Hela e RPMI foram tratadas com diferentes concentrações da lectina por 72 h.

O ensaio de viabilidade celular realizado na linhagem Vero CCL-81 resultou em um valor de CC_{50} de 52,75 nM (Figura 15), indicando a concentração do composto necessária para reduzir em 50% a viabilidade das células em relação ao controle tratado com PBS (veículo).

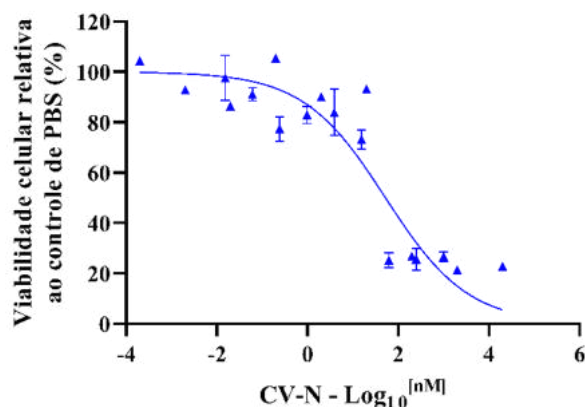


Figura 15. Viabilidade celular da linhagem Vero CCL-81 após tratamento com diferentes concentrações de CV-N. O eixo X representa a viabilidade relativa (%) em relação ao controle não tratado, enquanto o eixo Y corresponde à concentração logarítmica do composto (CV-N). A curva de dose-resposta revelou um CC_{50} de 52,75 nM.

Já na linhagem de epitélio nasal humano, obteve-se o valor de CC_{50} de 143,4 nM (Figura 16). A análise nesse modelo fisiologicamente relevante permite avaliar a citotoxicidade do composto em um tipo celular que reflete de forma mais fiel o ambiente de infecção dos alphaherpesvírus.

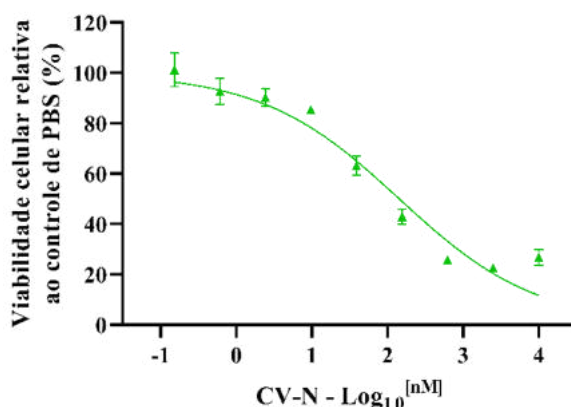


Figura 16. Viabilidade celular da linhagem RPMI após tratamento com diferentes concentrações de CV-N. O eixo X representa a viabilidade relativa (%) em relação ao controle não tratado, enquanto o eixo Y corresponde à concentração logarítmica do composto (CV-N). A análise da curva de dose-resposta revelou um CC_{50} de 143,4 nM.

O ensaio de viabilidade celular realizado na linhagem HeLa, células epiteliais humanas amplamente utilizadas em estudos de replicação e citotoxicidade viral, resultou em um valor de

CC₅₀ de 285,4 nM (Figura 17), indicando a concentração do composto necessária para reduzir em 50% a viabilidade das células em relação ao controle. É importante destacar que o controle com PBS apresentou toxicidade relativa, não alcançando 100% de viabilidade celular, o que deve ser considerado na interpretação dos resultados.

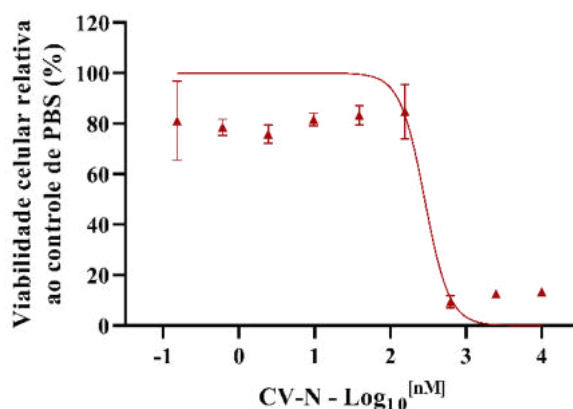


Figura 17. Viabilidade celular da linhagem HeLa após tratamento com diferentes concentrações de CV-N. O eixo X representa a viabilidade relativa (%) em relação ao controle não tratado, enquanto o eixo Y corresponde à concentração logarítmica do composto (CV-N). A curva de dose-resposta revelou um CC₅₀ de 285,4 nM.

5.3. A CV-N foi capaz de neutralizar a infecção por HSV-2 na linhagem Vero CCL-81

Nos ensaios de neutralização de placa, a lectina CV-N apresentou um IC₅₀ de 1,59nM (Figura 18) frente ao HSV-2, enquanto o IC₅₀ da CV-N em relação ao HSV-1 foi de 3,09nM. Com base no valor de CC₅₀ obtido em células VERO CCL-81, de 52,75nM, foi calculado um índice de seletividade (IS) de 33,25 para o HSV-2 e 17,07 para o HSV-1.

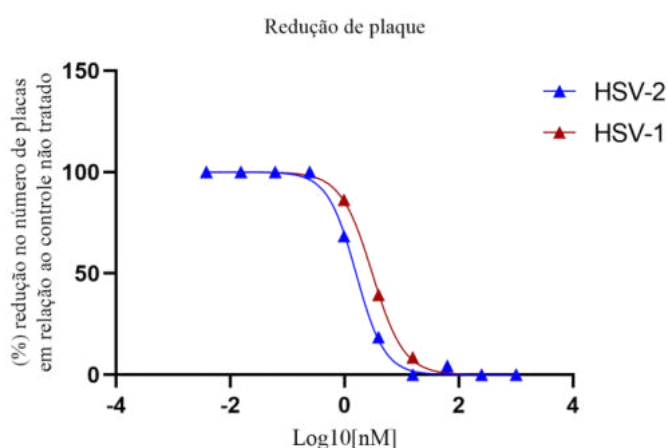


Figura 18. Ensaio de redução de placas para avaliação da atividade antiviral da CV-N. O eixo *x* representa a concentração da CV-N em escala logarítmica (log₁₀ [nM]), enquanto o eixo *y* indica a porcentagem de redução no número de placas virais em relação ao controle não tratado. A curva obtida permitiu determinar o valor de IC₅₀ da CV-N, correspondente a 1,59Nm para o HSV-2 e 3,09 para o HSV-1.

A imagem apresentada é representativa do ensaio de redução de placas realizado para avaliar a atividade antiviral da lectina CV-N. Observou-se um aumento progressivo da carga viral ao longo da diluição da lectina, evidenciado pela maior formação de placas virais nas concentrações mais baixas. A análise permitiu calcular o valor de IC₅₀, determinado em 1,59nM para a CV-N.

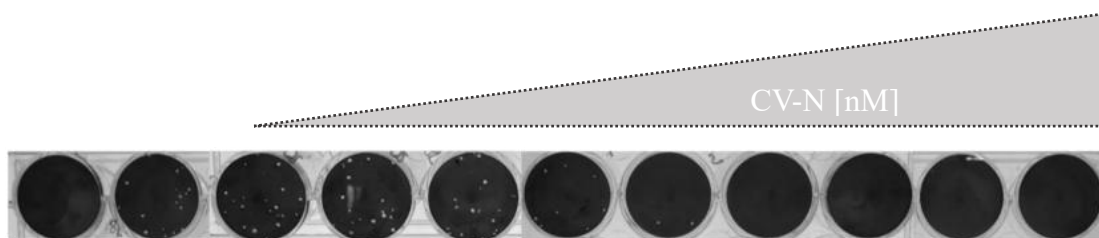


Figura 19. Neutralização do HSV-2 pela CV-N por ensaio de redução de placa de lise. O primeiro poço corresponde ao *mock* (controle celular), o segundo ao controle de vírus sem CV-N, e os demais representam diluições seriadas decrescentes da lectina. Em todos os poços infectados foi inoculado o mesmo volume de suspensão viral, padronizado para 25 PFU por poço. Os resultados apresentados correspondem à um dos experimentos independentes realizados em triplicata.

A comparação entre os dois herpesvírus evidencia que, embora a citotoxicidade da CV-N seja igual, sua atividade antiviral varia de forma significativa (Tabela 4). Enquanto o HSV-1 apresentou um SI de 17,07, o HSV-2 mostrou um valor superior (33,25), indicando que a CV-N é mais seletiva e eficaz na neutralização do HSV-2 sob as mesmas condições experimentais.

Tabela 4. Atividade antiviral da CV-N frente a HSV-1 e HSV-2 em células Vero CCL-81

Virus	CV-N		
	CC ₅₀ [nM]	IC ₅₀ [nM]	SI (CC ₅₀ / IC ₅₀)
HSV-1	52,75	03,09	17,07
HSV-2	52,75	1,586	33,25

CC₅₀ - concentração citotóxica média

IC₅₀ - concentração inibitória média

SI - índice de seletividade

5.4. A ausência de sinal detectável por imunofluorescência sugere que a CV-N neutralizou de forma eficaz o HSV-2 em células Vero CCL-81.

A imunofluorescência realizada permitiu uma análise qualitativa da ação neutralizante da CV-N sobre o HSV-2. Observou-se que concentrações mais elevadas de CV-N resultaram em maior preservação celular e em menor número de focos de infecção. No entanto, mesmo nas condições com maior concentração da lectina, ainda foram detectadas alterações morfológicas celulares, como condensação nuclear e formação de sincícios. À medida que a concentração de CV-N diminuía, essas alterações morfológicas tornaram-se mais evidentes, com aumento do

número de sincícios e maior condensação nuclear, refletindo a redução da capacidade neutralizante da lectina nas concentrações subótimas frente ao vírus (Figura 20).

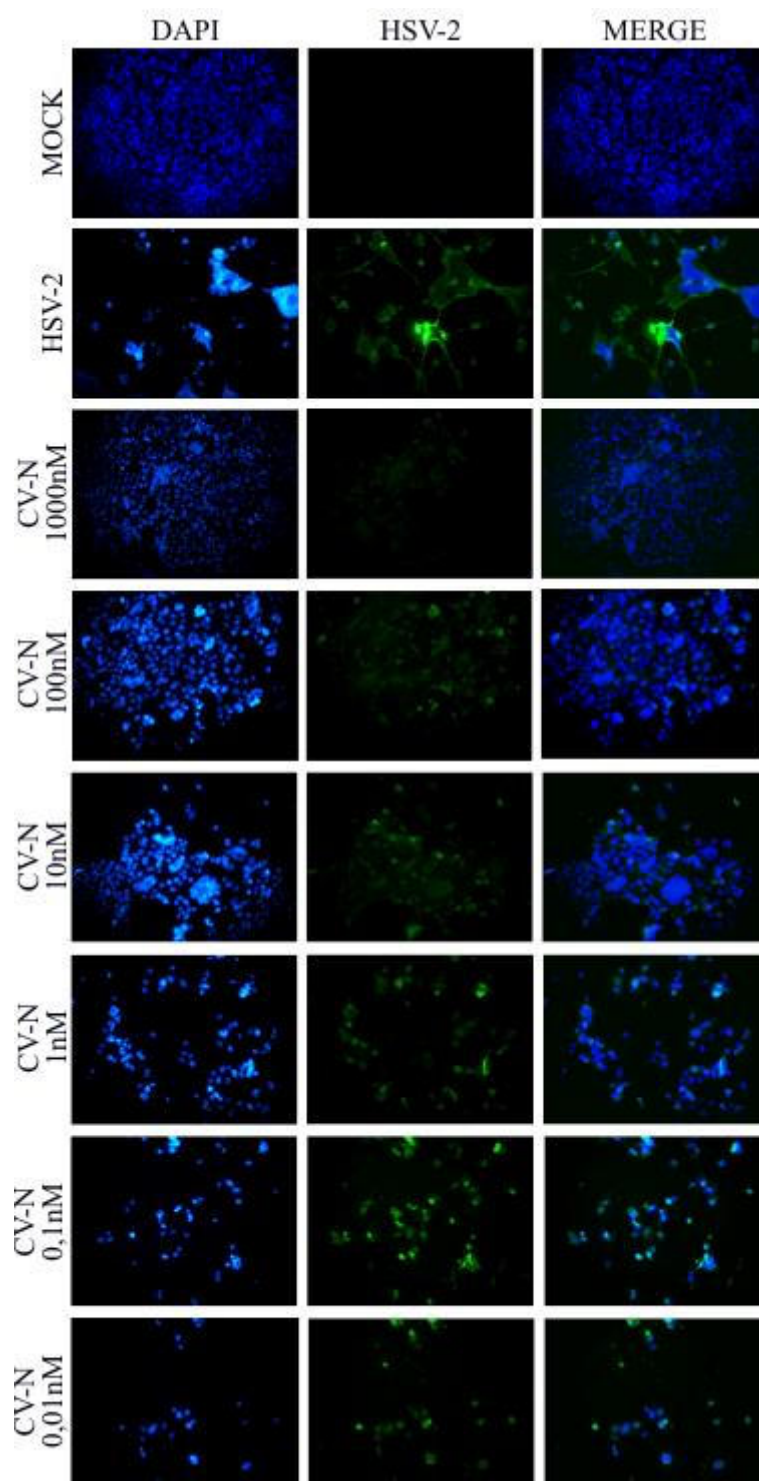


Figura 20. Efeito da CV-N na infecção por HSV-2 observado por imunofluorescência em células Vero CCL-81. Azul (DAPI) e verde (antígenos do HSV-2). Concentrações mais altas de CV-N preservam a viabilidade celular e reduzem a infecção, enquanto concentrações mais baixas aumentam a infecção e a morte celular.

5.5. CV-N reduz a porcentagem de células infectadas por HSV-2

A análise preliminar por citometria de fluxo demonstrou que o aumento da concentração de CV-N reduziu progressivamente o percentual de células infectadas por HSV-2, indicando um efeito dose-dependente (Figura 21) consistente com o perfil antiviral observado nos ensaios de redução de placa de lise e imunofluorescência. No entanto, na concentração de 1000 nM foi registrado um aumento inesperado na porcentagem de células infectadas. Essa inversão do efeito é interpretada como consequência de citotoxicidade significativa nessa faixa de concentração, uma vez que níveis elevados de morte celular podem comprometer a interpretação do ensaio.

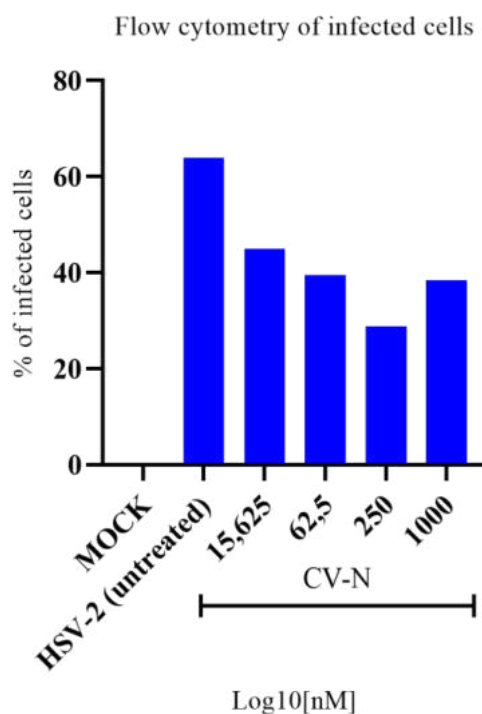


Figura 21. Ensaio preliminar de citometria. Observa-se que, conforme a concentração do composto aumenta, o percentual de células infectadas diminui, indicando efeito antiviral dose-dependente. O eixo Y representa o percentual de células infectadas (%), enquanto o eixo X apresenta as condições experimentais: controle negativo (MOCK), controle positivo (HSV-2 não tratado) e as células infectadas tratadas com diferentes concentrações de CV-N (15,625 nM; 62,5 nM; 250 nM; 1000 nM)

6. DISCUSSÃO

A terapêutica atual contra o HSV-2 fundamenta-se principalmente no uso de análogos de nucleosídeos, como aciclovir, valaciclovir e famciclovir, os quais, embora reduzam a gravidade e a duração dos episódios clínicos, não promovem a cura ou a eliminação definitiva do vírus (CDC, 2021). A emergência de cepas resistentes ao aciclovir, especialmente em indivíduos imunocomprometidos, reforça essa limitação terapêutica, já que mutações nos genes UL23 e UL30 podem comprometer a ativação e o mecanismo de ação do fármaco (Schalkwijk; Snoeck; Andrei, 2022). Essa resistência tende a surgir em regimes prolongados ou profiláticos e pode apresentar reversibilidade fenotípica com a suspensão do tratamento, retornando mediante nova exposição ao antiviral (Kriesel et al., 2005). Diante desse cenário, torna-se evidente a necessidade de buscar alternativas terapêuticas capazes de superar a dependência dos antivirais clássicos.

Nesse contexto, a Cyanovirin-N (CV-N) surge como uma candidata promissora. Representa um dos exemplos mais bem caracterizados de lectinas antivirais, e estudos ao longo das últimas décadas demonstram de forma consistente sua habilidade de reconhecer glicanas ricas em manose presentes na superfície de diversos vírus envelopados. Esse mecanismo confere à CV-N potencial tanto profilático quanto terapêutico contra vírus suscetíveis, incluindo aqueles cujo tratamento convencional enfrenta limitações importantes (O'Keefe et al., 2003; Barrientos et al., 2003).

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a CV-N apresenta elevada atividade antiviral contra o HSV-2 em VERO CCL-81, com IC_{50} de 1,59 nM e índice de seletividade (IS) de 33,25. Esse desempenho foi superior ao observado frente ao HSV-1, para o qual o IC_{50} foi de 3,09 nM e o IS de 17,07. Além disso, os valores de CC_{50} obtidos para as linhagens RPMI (143,4 nM) e HeLa (285,4 nM) foram consideravelmente superiores ao observado em Vero CCL-81 (52,75 nM). Esse maior CC_{50} em modelos epiteliais relevantes para a infecção por HSV-1 e HSV-2 indica um perfil citotóxico mais favorável, sugerindo um comportamento promissor do composto nesses tipos celulares, caracterizados pelo tropismo natural dos herpesvírus. Esses achados reforçam a eficácia da CV-N frente a herpesvírus e sugerem que diferenças estruturais (Knipe; Howley, 2013) entre as glicoproteínas das duas espécies podem influenciar a acessibilidade das glicanas de alta manose ao sítio de ligação da lectina, resultando em distintas suscetibilidades à inibição.

A afinidade da CV-N por glicanas ricas em manose já foi amplamente demonstrada como o principal mecanismo responsável pela sua atividade antiviral. Estudos estruturais revelaram que

a lectina possui domínios específicos de ligação a oligomanose, capazes de reconhecer e se ligar de maneira multivalente às glicoproteínas virais, bloqueando etapas iniciais do processo de entrada (Botos et al., 2002; Bewley, 2001). Assim, a maior sensibilidade observada no HSV-2 pode estar relacionada à presença de glicoproteínas de superfície com padrões de glicosilação mais favoráveis à interação da lectina.

Os valores de IC_{50} encontrados neste estudo estão em concordância com aqueles descritos para outros vírus envelopados. Pesquisas anteriores já demonstraram a potente ação da CV-N contra HIV-1, com atividade na faixa nanomolar (Boyd et al., 1997), bem como contra Influenza (O’Keefe et al., 2003), vírus Ebola (Barrientos et al., 2003) e SARS-CoV-2 (Nabi-Afjadi et al., 2022). Esses dados reforçam que o reconhecimento de oligomanoses pela CV-N constitui um mecanismo altamente conservado, aplicável a diferentes famílias virais, sustentando sua relevância como candidato a antiviral de amplo espectro. Entretanto, ainda é necessário realizar ensaios de neutralização viral nas linhagens HeLa e RPMI para verificar se o perfil de neutralização observado em Vero CCL-81 será mantido em modelos celulares mais fisiologicamente relevantes.

No contexto das infecções por herpesvírus, a CV-N tem se destacado pela sua potente capacidade de neutralização, conforme já evidenciado para HSV-1 e nesse estudo para HSV-2. Essa eficácia é particularmente relevante considerando a ampla prevalência desses vírus na população e as limitações das terapias atualmente disponíveis, como resistência viral e efeitos adversos associados (Schalkwijk; Snoeck; Andrei, 2022). A literatura aponta que a aplicação tópica da CV-N já foi explorada como uma estratégia viável em modelos animais, particularmente em estudos de desafio mucoso com HIV-1 em primatas não humanos. Nesses experimentos, a administração vaginal de CV-N demonstrou reduzir significativamente a transmissibilidade viral, evidenciando sua capacidade de atuar como barreira antiviral em tecidos mucosos (Tsai et al., 2003). Embora esses estudos não envolvam infecção genital por HSV-2, eles fornecem um arcabouço conceitual importante: a eficácia da CV-N em ambiente mucoso sugere que abordagens tópicas semelhantes poderiam ser adaptadas e avaliadas para o HSV-2 ou como um adjuvante às terapias convencionais.

Além disso, a ação tópica da CV-N apresenta vantagens adicionais, como a possibilidade de aplicação localizada, o que limita a exposição sistêmica e potencialmente reduz o risco de eventos adversos. Esse aspecto torna-se particularmente relevante diante das preocupações já relatadas na literatura sobre toxicidade e imunogenicidade associadas à administração sistêmica da lectina. Toxicidade, nesse contexto, refere-se a efeitos celulares ou teciduais indesejáveis —

como citotoxicidade, inflamação ou dano epitelial — decorrentes da interação direta da CV-N com células hospedeiras em concentrações elevadas. Imunogenicidade, por sua vez, diz respeito à capacidade da proteína de induzir uma resposta imune, potencialmente levando à produção de anticorpos anti-CV-N, inflamação exacerbada ou perda de eficácia em aplicações subsequentes. Estudos pré-clínicos demonstraram que a administração sistêmica ou parenteral da CV-N pode deflagrar respostas inflamatórias, além de apresentar citotoxicidade dependente da dose (Mori et al., 2005; Huskens et al., 2010). Assim, o uso tópico não apenas se mostra promissor pela eficácia já demonstrada, mas também como uma estratégia prática para contornar parte das barreiras que têm dificultado a translação clínica da CV-N.

Comparativamente aos antivirais convencionais, como aciclovir, valaciclovir e penciclovir, que atuam como análogos de nucleosídeos inibindo a DNA polimerase viral, a CV-N apresenta um mecanismo de ação distinto e complementar, baseado no bloqueio da entrada viral por meio da interação com glicanas de alta manose presentes nas glicoproteínas de superfície viral. Essa diferença é relevante, pois sugere que a lectina poderia ser utilizada de forma sinérgica com os fármacos já disponíveis, reduzindo a carga viral inicial e, ao mesmo tempo, limitando a possibilidade de emergência de variantes resistentes. Enquanto os análogos de nucleosídeos dependem da replicação ativa do vírus para exercer efeito, a CV-N atua em uma etapa anterior do ciclo, impedindo a infecção inicial das células hospedeiras e podendo reduzir sua transmissão.

Nesse contexto, a CV-N surge não apenas como um candidato tópico de interesse para reduzir a transmissibilidade do HSV-2, mas também como uma abordagem terapêutica complementar aos antivirais nucleosídicos convencionais (Kriesel et al., 2005). Enquanto fármacos como aciclovir, valaciclovir e famciclovir atuam inibindo a DNA polimerase viral após fosforilação pela timidina-quinase, processo frequentemente comprometido em cepas resistentes, a CV-N opera por um mecanismo inteiramente distinto, baseado no reconhecimento de glicanas ricas em manose presentes nas glicoproteínas virais (Luo et al. 2015; LeGoff et al. 2014). Esses alvos estruturais tendem a ser altamente conservados entre diferentes isolados clínicos, inclusive nos resistentes aos análogos nucleosídicos, o que torna a lectina um recurso promissor frente aos atuais desafios terapêuticos. Assim, a CV-N não se configura como substituta dos antivirais clássicos, mas como uma estratégia adicional capaz de atuar onde esses fármacos apresentam limitações — seja em casos de resistência, em cenários de baixa adesão ao tratamento sistêmico ou em populações com risco aumentado de transmissão. Além de seu potencial para reduzir a infectividade viral e a transmissibilidade, aplicações tópicas

experimentais sugerem que compostos com ação direta sobre glicoproteínas virais podem também atenuar a progressão de lesões agudas, favorecendo uma resolução mais rápida do quadro inicial.

Dessa forma, a integração de moléculas como a CV-N ao arsenal terapêutico contra o HSV-2 representa uma oportunidade de expandir mecanismos de ação disponíveis, reforçando abordagens de prevenção e oferecendo alternativas em situações em que tratamentos tradicionais alcançam eficácia limitada.

Outro aspecto relevante a ser considerado é a relação entre a classe da proteína de fusão viral e o reconhecimento pela CV-N. Embora a literatura descreva que diversas glicoproteínas virais são ricas em manose, nem todas são igualmente reconhecidas pela lectina. Um exemplo é o dos flavivírus, cujas glicoproteínas apresentam glicosilações de alta manose, mas não são eficientemente inibidos pela CV-N (Sharma et al., 2016). Essa diferença sugere que não apenas a composição glicosídica, mas também o contexto estrutural em que essas glicanas estão inseridas, desempenha papel crucial na acessibilidade para a ligação da lectina. Nesse sentido, a correlação com a classe das proteínas de fusão pode ser um fator determinante: enquanto vírus com glicoproteínas de fusão de classe I, como o SARS-CoV-2, e de classe III, como o HSV-1 e HSV-2, são efetivamente reconhecidos e neutralizados, os de classe II, como os flavivírus (Orfanoudaki et al., 2025), não apresentam a mesma suscetibilidade, mesmo possuindo oligomanoses. Assim, o reconhecimento pela CV-N parece depender de uma combinação entre a presença de glicanas acessíveis e a organização espacial característica de cada classe de proteína de fusão, o que pode explicar a variação de sensibilidade observada entre diferentes famílias virais mesmo que o perfil de oligomanose seja similar.

Diante desses achados, torna-se evidente que a CV-N representa um eixo promissor para o desenvolvimento de novas estratégias antivirais contra o HSV-2, especialmente em cenários onde a resistência a análogos nucleosídicos compromete a eficácia da terapia convencional. Contudo, avançar nessa direção exige um esforço integrado entre validação pré-clínica e aprimoramento molecular. A utilização de modelos animais — incluindo modelos murinos de infecção genital, já consolidados para estudos de antivirais tópicos — pode oferecer respostas decisivas sobre segurança, farmacodinâmica e impacto real na transmissibilidade viral e no curso das lesões agudas. Paralelamente, abordagens de engenharia molecular, como o desenvolvimento de mutantes menos citotóxicos ou com maior afinidade por glicanas conservadas, bem como a exploração de homólogos naturais como, Dm-CVNH, ampliam o espectro de possibilidades terapêuticas. Assim, a continuidade dessas linhas de investigação

não apenas pode consolidar a CV-N como ferramenta complementar aos antivirais tradicionais, mas também abrir caminho para uma nova geração de lectinas antivirais voltadas a vírus com alto grau de conservação estrutural em seus alvos glicanos, contribuindo para o avanço de alternativas profiláticas e terapêuticas mais robustas no enfrentamento do HSV-2.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram de forma consistente o potencial da lectina antiviral Cyanovirin-N (CV-N) como candidata para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e preventivas contra o HSV-2. Inicialmente, a avaliação da citotoxicidade revelou que a CV-N apresenta um perfil de segurança dependente da linhagem celular, com valores de CC_{50} mais elevados em células epiteliais HeLa (285,4 nM) e RPMI (143,4 nM) quando comparadas à linhagem Vero CCL-81 (52,75 nM). Esse achado é particularmente relevante, uma vez que as células epiteliais representam os principais alvos naturais dos herpesvírus, indicando que a molécula tende a apresentar melhor tolerabilidade justamente nos tecidos mais relevantes para infecção genital.

Em relação ao desempenho antiviral, a CV-N se mostrou altamente eficaz contra o HSV-2, apresentando IC_{50} de 1,59 nM e índice de seletividade (IS) de 33,25, valores superiores aos observados frente ao HSV-1 (IC_{50} de 3,09 nM; IS de 17,07). Ensaios de redução de placas confirmaram que o composto é capaz de impedir a formação de focos infecciosos, enquanto a imunofluorescência evidenciou clara diminuição do efeito citopático e da formação de sincícios em culturas tratadas, reforçando a capacidade da CV-N de interferir diretamente no processo de entrada viral mediado por glicoproteínas ricas em manose. Esses dados se alinham ao mecanismo de ação já descrito na literatura, baseado no reconhecimento multivalente de glicanas conservadas, o que a diferencia dos antivirais nucleosídicos tradicionais e sugere utilidade potencial mesmo frente a cepas resistentes ao aciclovir.

De maneira integrada, os achados deste trabalho reforçam que a Cyanovirin-N possui não apenas elevada potência antiviral, mas também um perfil citotóxico favorável em células epiteliais humanas, o que sustenta sua promessa como intervenção tópica para reduzir a transmissibilidade do HSV-2 e mitigar o desenvolvimento de lesões agudas durante a infecção.

Perspectivas futuras incluem a validação desses resultados em modelos animais de infecção genital, permitindo avaliar biodistribuição, toxicidade local e eficácia *in vivo*. Além disso, abordagens de engenharia molecular, como o desenvolvimento de mutantes menos imunogênicos ou com maior estabilidade, bem como a investigação de homólogos. Finalmente, a integração da CV-N em formulações tópicas inovadoras, como géis mucoadesivos ou sistemas de liberação controlada, representa um caminho promissor para transpor os achados *in vitro* e aproximar esta molécula da aplicação translacional.

Em conjunto, este estudo contribui para o entendimento da atividade antiviral da CV-N contra o HSV-2 e estabelece bases sólidas para investigações posteriores, reforçando seu papel

como uma alternativa complementar e mecanisticamente distinta aos antivirais clássicos disponíveis para o manejo das infecções por herpesvírus.

8. REFERÊNCIAS

- ARVIN, A. M.; GILDEN, D. Varicella-Zoster Virus. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; DAMANIA, B. A. (eds.). *Fields Virology: DNA Viruses*. 7. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2021. v. 2, p. 445–488.
- ATANASIU, D. et al. Bimolecular complementation reveals that glycoproteins gB and gH/gL of herpes simplex virus interact with each other during cell fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, p. 18718–18723, 2007.
- ATANASIU, D.; SAW, W. T.; COHEN, G. H.; EISENBERG, R. J. Cascade of events governing cell-cell fusion induced by herpes simplex virus glycoproteins gD, gH/gL, and gB. *Journal of Virology*, v. 84, p. 12292–12299, 2010.
- BACKOVIC, M.; JARDETZKY, T. S. Class III viral membrane fusion proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 19, n. 2, p. 189–196, 2009.
- BAGDONAITE, I. et al. A strategy for O-glycoproteomics of enveloped viruses – the O-glycoproteome of herpes simplex virus type 1. *PLoS Pathogens*, v. 11, e1004784, 2015.
- BAGDONAITE, I. et al. Glycoengineered keratinocyte library reveals essential functions of specific glycans for all stages of HSV-1 infection. *Nature Communications*, v. 14, 7000, 2023.
- BAQUERO, E.; ALBERTINI, A. A. V.; GAUDIN, Y. Recent mechanistic and structural insights on class III viral fusion glycoproteins. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 33, p. 52–60, 2015.
- BARRIENTOS, L. G. et al. Cyanovirin-N binds to the viral surface glycoprotein GP1,2 and inhibits infectivity of Ebola virus. *Antiviral Research*, v. 58, p. 47–56, 2003.
- BARRIENTOS, L. G.; MATEI, E.; LASALA, F.; DELGADO, R.; GRONENBORN, A. M. Dissecting carbohydrate–Cyanovirin-N binding by structure-guided mutagenesis. *Protein Engineering, Design & Selection*, v. 19, p. 525–535, 2006.
- BARRIENTOS, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins. *Science*, v. 119, n. 3091, p. 419, 1954.
- BELFIORI, B. et al. Vicia ervilia lectin (VEA) has an antibiofilm effect... *Archives of Microbiology*, v. 206, p. 371, 2024.

- BEWLEY, C. A.; OTERO-QUINTERO, S. The potent anti-HIV protein cyanovirin-N... *Journal of the American Chemical Society*, v. 123, p. 3892–3902, 2001.
- BHUTIA, S. K. et al. Plant lectins in cancer therapeutics. *Pharmacological Research*, v. 144, p. 8–18, 2019.
- BOKESCH, H. R. et al. A potent novel anti-HIV protein from the cultured cyanobacterium *Scytonema varium*. *Biochemistry*, v. 42, p. 2578–2584, 2003.
- BOTOS, I. et al. Structures of the complexes of cyanovirin-N and high-mannose oligosaccharides. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 34336–34342, 2002.
- BOYD, M. R. et al. Discovery of cyanovirin-N... *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 41, p. 1521–1530, 1997.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines, 2021: Genital Herpes*. Atlanta: CDC, 2021.
- CIPOLLO, J. F.; PARSONS, L. M. Glycomics and glycoproteomics of viruses. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 39, p. 371–409, 2020.
- COHEN, J. I. Herpesvirus latency. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 130, n. 7, p. 3361–3369, 2020.
- CONNOLLY, S. A. et al. Potential nectin-1 binding site on HSV gD. *Journal of Virology*, v. 79, p. 1282–1295, 2005.
- DE BOLLE, L.; NAESENS, L.; DE CLERCQ, E. Update on human herpesvirus 6. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 18, p. 217–245, 2005.
- Flipping the Switch from Monomeric to Dimeric CV-N Has Little Effect on Antiviral Activity. *Structure*, v. 12, p. 1799–1807, 2004.
- FROMME, R. et al. A monovalent mutant of cyanovirin-N. *Biochemistry*, v. 46, p. 9199–9207, 2007.
- FUJIMOTO, Y. K.; GREEN, D. F. Carbohydrate recognition by CV-N. *Journal of the American Chemical Society*, v. 134, p. 19639–19651, 2012.
- FUKUI, A. et al. Dual impacts of a glycan shield on HSV-1 gB. *mBio*, v. 14, e0099223, 2023.

- FUKUI, A. et al. Establishment of a system to quantify HSV-induced fusion. *Microbiology and Immunology*, v. 67, p. 114–119, 2023.
- GARRISON, A. R. et al. Scytovirin displays potent activity against Ebola virus. *Antiviral Research*, v. 112, p. 1–7, 2014.
- GAVROVIC-JANKULOVIC, M. et al. Recombinant banana lectin isoform. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 40, p. 929–941, 2008.
- GONG, Y. et al. Glycosylation in SARS-CoV-2 and ACE2. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 6, p. 396, 2021.
- HARFOUCHE, M. et al. Global incidence and prevalence of HSV infections. *Sexually Transmitted Infections*, v. 101, p. 214–223, 2025.
- HASHIM, O. H. et al. Lectins as cancer biomarkers. *PeerJ*, v. 5, e3784, 2017.
- HORTIN, G. L.; TRIMPE, B. L. Lectin affinity chromatography. *Analytical Biochemistry*, v. 188, p. 271–277, 1990.
- HUANG, Y. et al. Structural properties of SARS-CoV-2 spike. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 41, p. 1141–1149, 2020.
- HUEMER, H. P. et al. gC central segment not involved in C3b binding. *Journal of General Virology*, v. 70, p. 1571–1578, 1989.
- HUSKENS, D. et al. Microvirin: antiviral lectin. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, p. 24845–24854, 2010.
- HUTT-FLETCHER, L. M. Epstein–Barr virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, n. 46, p. 16242–16243, 2014.
- JIN, X. et al. Jackbean lectin inhibits biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, v. 126, p. 300–310, 2019.
- JOHANSEN, E. et al. Lectin HPLC method. *Journal of Visualized Experiments*, 2009.
- KHAN, F. et al. Lectins as markers for blood grouping. *Medical Science Monitor*, v. 8, p. RA293–RA300, 2002.
- KILPATRICK, D. C. *Handbook of Animal Lectins*. Wiley, 2000.

- KNOLLE, P. A. et al. Role of sinusoidal endothelial cells. *Hepatology*, v. 24, p. 824–829, 1996.
- KONOZY, E. H. E.; OSMAN, M. E. M. Dual nature of dietary lectins. *Heliyon*, v. 10, e39471, 2024.
- KULLOLLI, M. et al. Multi-lectin affinity chromatography. *Journal of Separation Science*, v. 31, p. 2733–2739, 2008.
- LEGOFF, J. et al. Diagnosis of genital herpes. *Virology Journal*, v. 11, p. 1–17, 2014.
- LI, M. et al. Incorporation of CV-N in food product. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, v. 58, p. 379–384, 2011.
- LIS, H.; SHARON, N. Lectins. *Chemical Reviews*, v. 98, n. 2, p. 637–674, 1998.
- LOUTEN, J. Virus structure and classification. In: *Essential Human Virology*. p. 19–29, 2016.
- LUO, S. et al. N-glycans on HSV-2 gB. *Virology*, v. 483, p. 72–72, 2015.
- MADAVARAJU, K. et al. HSV entry mechanisms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 10, 617578, 2020.
- MASON, C. P.; TARR, A. W. Human lectins in viral infections. *Molecules*, v. 20, n. 2, p. 2229–2243, 2015.
- MITCHELL, C. A. et al. Antiviral lectins. *Antiviral Research*, v. 142, p. 37–54, 2017.
- MODIS, Y. et al. Structure of dengue E protein. *Nature*, v. 427, p. 313–319, 2004.
- MUELLER, D.; CLAUSS, H. Herpes virus infections. *Clinical Liver Disease*, v. 6, p. 63–66, 2015.
- MUKHOPADHYAY, S. et al. Flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, p. 13–22, 2005.
- MUÑOZ-BASAGOITI, J. et al. CV-N binds SARS-CoV-2 glycans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 120, e2214561120, 2023.
- NABI-AFJADI, M. et al. Lectins and lectibodies. *Cellular and Molecular Biology Letters*, v. 27, p. 37, 2022.

NICOLSON, G. L. Lectins and animal cell surfaces. *International Review of Cytology*, v. 39, p. 89–190, 1974.

O'KEEFE, B. R. et al. Anti-influenza activity of CV-N. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, p. 2518–2525, 2003.

ORFANOUDAKI, M. et al. Dm-CVNH structure and activity. *Journal of Biological Chemistry*, v. 301, 108319, 2025.

PENG, Q. et al. Variations in HA glycosylation of H9N2. *Virus Genes*, v. 55, p. 182–190, 2018.

PICKETT, A.; PERROW, K. New uses of botulinum toxin. *Toxins*, v. 3, p. 63–81, 2011.

PODDER, M. K. et al. Galactose-binding seed lectin. *Heliyon*, v. 10, e24592, 2024.

POIROUX, G. et al. Plant lectins targeting O-glycans. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, 2017.

POTENT inhibition of HIV-1 fusion by cyanovirin-N. *Journal of Molecular Biology*, v. 318, p. 1–8, 2002.

SALEH, H. M.; KUMAR, S. Varicella-Zoster Virus. *StatPearls*, 2025.

SANDA, M. et al. Glycosylation of SARS-CoV-2 spike. *Analytical Chemistry*, v. 93, p. 2003–2009, 2021.

SATO, Y. et al. Novel lectin from *Oscillatoria agardhii*. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, v. 125, p. 169–177, 2000.

SCHILLING, P. E. et al. Mannosylated HA peptides bind CV-N. *RSC Advances*, v. 10, p. 11079–11087, 2020.

SHAHZAD-UL-HUSSAN, S. et al. Structure of microvirin. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, p. 20788–20796, 2011.

SANTOS, J. V. O.; PORTO, A. L. F.; CAVALCANTI, I. M. F. Potential application of combined therapy with... 2021.

SINGH, R. S. et al. Cyanobacterial lectins as antiviral agents. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 102, p. 475–496, 2017.

- SIROHI, D.; KUHN, R. J. Zika virus structure. *Journal of Infectious Diseases*, v. 216, p. S935–S944, 2017.
- SMEE, D. F. et al. Treatment of influenza with CV-N. *Antiviral Research*, v. 80, p. 266–271, 2008.
- SUMNER, J. B.; HOWELL, S. F. Hemagglutinin of jack bean. *Journal of Bacteriology*, v. 32, p. 227–237, 1936.
- SWANSON, M. D. et al. Engineering a therapeutic lectin. *Cell*, v. 163, p. 746–758, 2015.
- SWANSON, M. D. et al. Banana lectin inhibits HIV. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, p. 8646–8655, 2010.
- TATE, M. D. et al. Glycosylation of influenza HA. *Viruses*, v. 6, p. 1294–1316, 2014.
- TIEGS, G. et al. ConA-induced liver injury. *Journal of Clinical Investigation*, v. 90, p. 196–203, 1992.
- TSAI, C.-C. et al. CV-N gel prevents SHIV transmission. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v. 19, p. 535–541, 2003.
- WALLS, A. C. et al. Structure of SARS-CoV-2 spike. *Cell*, v. 181, p. 281–292.e6, 2020.
- WATANABE, Y. et al. Vulnerabilities in coronavirus glycan shields. *Nature Communications*, v. 11, 2688, 2020.
- YU, H. et al. Antiviral activity of recombinant CV-N against HSV-1. *Virologica Sinica*, v. 25, p. 432–439, 2010.
- ZHANG, X. et al. Flavivirus envelope glycoprotein. *Viruses*, v. 9, 338, 2017.