

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CITOTOXIDADE E ATIVIDADE ANTI-HSV-1 DE COMPOSTO SINTÉTICO DIBENZILIDENOCETONA

Thays Rosa da Silva (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Thalita Zago Oliveira (Co-autora), Tania Ueda Nakamura (Orientadora), e-mail: tunakamura@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências da Saúde/Farmácia

Palavras-chave: HSV-1, dibenzilidenocetona, atividade antiviral

Resumo:

O vírus herpes simples tipo 1 (HSV-1), causador de lesões vesiculares orofaciais benignas, está amplamente disseminado na população mundial. Apresenta tropismo por células nervosas nos gânglios trigeminais ou lombossacral, onde estabelece latência. O vírus HSV-1 é composto por DNA de fita dupla, capsídeo icosaédrico, tegumento e envelope contendo glicoproteínas virais. Dependendo do estado imunológico do hospedeiro, o vírus pode ser reativado e causar complicações, tais como encefalite e ceratite. Ainda não há cura para pacientes infectados, sendo que o tratamento atual é realizado com análogos de nucleosídeos, os quais impedem a replicação viral. Todavia, a seleção de cepas resistentes ao tratamento padrão é crescente. Diante da problemática apresentada, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a citotoxicidade e atividade antiviral, *in vitro*, de estrutura dibenzilidenocetona (A3), um composto com estrutura semelhante aos curcuminóides e chalconas. Para isso, foram aplicados o método colorimétrico do vermelho neutro e o método de redução de placas de lise em células VERO. Os resultados mostram que a substância A3 não apresenta toxicidade, *in vitro*, e apresenta atividade anti-HSV-1.

Introdução

O HSV-1 está amplamente disseminado na população mundial, sendo que normalmente a infecção ocorre na mucosa oral e nas áreas oculares. Todavia, o HSV-1 é um dos principais causadores da encefalite esporádica (KOLLIAS et al., 2015).

O genoma do HSV-1 é composto por DNA de fita dupla, capsídeo icosaédrico envolto por tegumento e envelope com glicoproteínas (ROIZMAN; PELLET, 2001). Após a infecção primária, os vírus podem estabelecer latência nos gânglios trigeminais ou lombossacral (WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

O tratamento atual consiste na administração de análogos de nucleosídeos, sendo que o Aciclovir é o mais utilizado. Entretanto, a seleção de cepas resistentes a este fármaco é crescente, devido ao uso frequente (STRANSKA et al., 2005).

A substância dibenzilidenocetona (DBC) A3 apresenta semelhança estrutural com os compostos bioativos curcuminóides e chalconas naturais (DIN et al., 2014). A substância A3 consiste em um 1,5-diarylpentadienona ligado a uma cetona cíclica, ciclo-pentanona. O presente projeto objetivou avaliar a citotoxicidade de estrutura A3 e atividade anti-HSV-1, pelo método colorimétrico do vermelho neutro e redução de placas de lise.

Materiais e métodos

O composto DBC A3 foi sintetizado sob responsabilidade do Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho do Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Micro-organismos da Universidade Federal de São Carlos.

Manutenção Celular e vírus

Células VERO foram mantidas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂ com meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Amostras de HSV-1 sensível ao aciclovir (cepa KOS) foram previamente propagadas e tituladas para os ensaios antivirais.

Ensaio de citotoxicidade e atividade antiviral pelo método do vermelho neutro

Células VERO foram mantidas em placa de 96 poços a 37°C em estufa úmida até confluência celular. A substância A3 foi diluída seriadamente (1:2) e aplicada sobre a monocamada celular para avaliar a citotoxicidade, sendo mantida em estufa úmida nas mesmas condições citadas por 72h. Após, a viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico do vermelho neutro. Para tal, a placa foi lavada com tampão fosfato salina (PBS) e adicionou-se 200 µL de solução vermelho neutro. A placa foi incubada em estufa úmida a 37°C, ao abrigo da luz, por 3h. Após, os poços foram lavados com 200 µL de solução fixadora (1% CaCl₂ e 2% formaldeído), para eliminar corante não aderido no interior das células e aderir o substrato às células. Por fim, a solução fixadora foi descartada e, adicionou-se 200 µL de solução etanólica (50%) e ácido acético (30%) para solubilizar o corante. Após 10 min de agitação, realizou-se a leitura em leitor de microplaca a 540 nm.

Para o ensaio de atividade antiviral, células VERO foram cultivadas em placa de 96 poços. A monocamada foi infectada com HSV-1 TCID₅₀ (dose infectiva do vírus para 50% das células) e incubada por 1h em estufa úmida a 37°C. Em seguida, diluições seriadas (1:2) da substância A3 foram adicionadas nos poços testes. Assim, a placa foi incubada por 72h e avaliada pelo método colorimétrico do vermelho neutro, conforme descrito anteriormente.

Atividade antiviral pelo método de redução de placa de lise (pós penetração)

Após cultivar células VERO em placa de 24 poços em estufa úmida com tensão de 5% CO₂, a monocamada foi lavada com PBS e infectada com uma concentração correspondente a 40-60 unidades formadoras de placas (UFP) de HSV-1 cepa KOS. A placa foi incubada, a 37°C em estufa úmida, por 1h. Em

seguida, os poços foram lavados com PBS, e adicionou-se diluições seriadas da substância em DMEM contendo carboximetilcelulose (0,5%). Assim, foi incubada nas mesmas condições citadas, por 72h, fixada com 1 mL/poço de formaldeído 10% e incubadas por 24h ao abrigo da luz. Em seguida, os poços foram lavados em água corrente e corados com cristal violeta 0,5%. Realizou-se a contagem das placas de lise para o cálculo da porcentagem de inibição de formação de placas de lise em relação ao controle de vírus.

Atividade antiviral pelo método de redução de placa de lise

Monocamada de células VERO foi cultivada em placa de 24 poços. Sequencialmente, as células foram infectadas com uma concentração correspondente a 40-60 unidades formadoras de placas (UFP)/poço das suspensões virais e adicionou-se diluições seriadas (1:2) de A3. Após incubação de 1h a 37 °C, em estufa úmida com tensão de 5% CO₂, a monocamada foi lavada com PBS e adicionou-se diluições seriadas da substância em DMEM contendo carboximetilcelulose (0,5%). Novamente a placa foi incubada nas mesmas condições citadas e, após 72h, fixadas com 1 mL/poço de formaldeído 10% e incubadas por 24h ao abrigo da luz. Após, as placas foram lavadas em água corrente e coradas com cristal violeta 0,5%. Realizou-se a leitura e contagem de placas de lise e calculou-se a porcentagem de inibição de formação de placas de lise em relação ao controle de vírus.

Resultados e Discussão

No experimento de atividade antiviral (pós-penetração), não houve redução do número de placas de lise nos poços tratados quando comparados ao controle de vírus. Os resultados da avaliação da citotoxicidade e da atividade antiviral do A3 estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Citotoxicidade e atividade anti-HSV-1 determinada pelo método colorimétrico do vermelho neutro.

Composto	CC ₅₀ (µM) ± DP	EC ₅₀ (µM) ± DP	IS
A3	860 ± 32,57	32,1 ± 1,62	26,8

CC₅₀=Concentração tóxica para 50% das células (µM); DP = Desvio Padrão; EC₅₀=concentração que inibiu 50% da infecção viral (µM); IS = Índice de seletividade (CC₅₀/EC₅₀);

Os resultados mostraram que o EC₅₀ de 32,1±1,62 µM da substância A3 é inferior ao CC₅₀ de 860 µM. Sendo assim, a concentração capaz de proteger 50% das células contra a infecção pelo HSV-1 não foi tóxica para as células VERO. Os resultados encontrados, nos experimentos de citotoxicidade e atividade antiviral, permitiram o cálculo do índice de seletividade (IS) obtendo o resultado de 26,8. Como controle positivo, no teste antiviral, foi empregado o Aciclovir, cujo EC₅₀ determinado foi 0,13 ± 0,002 µM. Estes resultados foram confirmados no experimento de atividade antiviral realizado segundo o método de redução de placa de lise. Assim, quando a

substância esteve presente em todas as etapas da replicação viral, houve a redução do número de placas de lise nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL, sendo que na concentração de 100 µg/mL (329,85 µM) de A3, observou-se redução completa do número de placas de lise.

Conclusões

A substância A3 apresentou atividade anti-HSV-1, confirmada por duas metodologias distintas (análise de efeito citopático revelado pelo método colorimétrico do vermelho neutro e por redução das placas de lise). A baixa citotoxicidade do composto sobre células VERO revelou um índice de seletividade muito bom, assim o composto A3 é um candidato em potencial no tratamento de lesões causadas pelo HSV-1.

Agradecimentos

Apoio financeiro do CNPq. Ao mestrando Leandro Martin Paulino pelo apoio e auxílio na realização de alguns experimentos.

Referências

DIN, Z.U., FILL, T.P., ASSIS, F.F., BIDÓIA, L.D., KAPLUM, V., GARCIA, F.P., NAKAMURA, C.V., OLIVEIRA, K.T., FILHO, E.R., 2014. Unsymmetrical 1,5-diaryl-3-oxo-1,4-pentadienyls and their evaluation as antiparasitic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 3, p. 1121-1127, fev, 2014.

KOLLIAS, C.M.; HUNEKE, R.B.; WIGDAHL, B.; JENNINGS, S.R. Animal models of herpes simplex virus immunity and pathogenesis. **Journal of NeuroVirology**, v. 21, n. 1, p. 8–23, fev, 2015.

ROIZMAN, B.; PELLETT, P.E. The Family Herpesviridae: A Brief Introduction. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.S.; MARTIN, M.A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. **Fields Virology**. 4ª edição. Philadelphia: Lippincott Raven, 2001. p. 2399-2459.

STRANSKA, R.; SCHUURMAN, R.; NIENHUIS, E.; GOEDEGEBUURE, I.W.; POLMAN, M.; WEEL, J.F.; DILLEN, P.M.; BERKHOUT, R.J.; VAN LOON, A.M., Survey of acyclovir-resistant herpes simplex virus in the 86 Netherlands: prevalence and characterization. **Journal of Clinical Virology**, v.32, n.1, p.7-18, jan, 2005.

WHITLEY, R. J.; ROIZMAN, B. Herpes simplex virus infections. **Lancet**, v. 357, n. 9267, p. 1513-1518, mai, 2001.