

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HERPES SIMPLEX TIPO 1 DO DICLOFENACO NA INTERFERÊNCIA DA DISSEMINAÇÃO INTERCELULAR DO VÍRUS

Débora Gimenes Vianna (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Dyenefer Pereira Fonseca,
Tania Ueda Nakamura (Orientadora), e-mail: tunakamura@uem.br

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

Área e subárea do conhecimento: Farmácia, Farmacognosia.

Palavras-chave: Herpes simples tipo 1, diclofenaco, disseminação intercelular.

Resumo

O Herpes simples tipo 1 (HSV-1), pertencente à família *Herpesviridae*, é um vírus envelopado de DNA fita dupla, que possui grande prevalência populacional. As manifestações clínicas se caracterizam pela formação de lesões orofaciais avermelhadas, com presença de vesículas, que pode evoluir para quadros mais graves, como encefalite viral e ceratite estromal. Frequentemente se faz o uso de fármacos para o tratamento anti-herpético, como os análogos de nucleosídeos, sendo o aciclovir (ACV) o mais comumente utilizado, atuando no bloqueio do ciclo da replicação viral. Todavia, o uso contínuo do ACV pode levar ao surgimento de cepas resistentes a esse fármaco, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Tal fato, evidencia a necessidade da busca por novas substâncias que promovam uma terapia anti-herpética. Nesse sentido, o uso de fármacos conhecidos clinicamente para outras enfermidades, podem ser uma estratégia promissora, pois permite explorar efeitos distintos de fármacos já consolidados. O diclofenaco é um anti-inflamatório não esteroide, que tem como principais atividades a ação anti-inflamatória, analgésica e antipirética. Em estudos recentes realizados em nosso laboratório, foi observado que o diclofenaco apresentou atividade antiviral *in vitro* frente ao HSV tipo 1 e 2, atuando na fase pós-penetração dos vírus nas células. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade anti-HSV-1 do diclofenaco frente a diferentes MOIs (multiplicidade de infecção), para então determinar se o diclofenaco atua impedindo a disseminação intercelular do HSV-1.

Introdução

O Herpes simples tipo 1 (HSV-1) é um vírus envelopado de DNA fita dupla, amplamente difundida entre a população mundial. Clinicamente sua manifestação é caracterizada pela formação de lesões orofaciais avermelhadas com presença de vesículas (WHITLEY; ROIZMAN, 2001). A primo-infecção ocorre por meio do contato entre mucosas de um indivíduo que apresenta lesões com um indivíduo sadio (WHITLEY; ROIZMAN, 2001). As lesões surgem no epitélio estratificado

escamoso, e posteriormente o vírus tende a se instalar nos gânglios da base, onde após um curto estágio de replicação, torna-se latente (WHITLEY; ROIZMAN, 2001). Quando ocorre a exposição do indivíduo a fatores predisponentes, como traumas ou estresse, o vírus pode ativar o ciclo lítico, o que resulta no reaparecimento das manifestações clínicas.

O tratamento anti-herpético frequentemente empregado é por meio de fármacos análogos de nucleosídeo, como o aciclovir (ACV), um pró-fármaco que causa bloqueio no ciclo de replicação do vírus. Entretanto, devido a mutações que afetam seu mecanismo de ação, esse tipo de tratamento não tem obtido a mesma eficácia, sendo necessária a busca por substâncias alternativas para a terapia herpética (WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

O diclofenaco é um anti-inflamatório não esteroidal, da classe do ácido fenilacético, e exerce função anti-inflamatória, analgésica e antipirética, isso porque, promove inibição das ciclooxigenases (COXs). Em 1998, Gordon e colaboradores realizaram o primeiro estudo correlacionando o fármaco a um efeito antiviral *in vitro*, ao qual o diclofenaco teve efeito inibitório sobre diferentes sorotipos de adenovírus (GORDON et. al., 1998). Em trabalhos recentes desenvolvido por nosso grupo, se observou que o diclofenaco exerce efeitos antivirais consideráveis em estudo *in vitro*, principalmente sobre a cepa resistente ao ACV (HSV-1/cepa AR29).

Sendo assim, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a atividade anti-HSV-1 do diclofenaco frente a diferentes MOIs (multiplicidade de infecção), e verificar se o diclofenaco atua impedindo a disseminação intercelular do HSV-1.

Materiais e métodos

Cultivo celular e de vírus

Os ensaios foram realizados em células VERO (Células Epiteliais de Rim de Macaco Verde Africano), cultivadas em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas em estufa úmida 37°C, 5% de CO₂. Para os ensaios de atividade antiviral foi utilizado Herpes Vírus Simples tipo 1 (HSV-1): cepa KOS, isolado clínico de lesão orofacial sensível ao ACV (cepa padrão) e cepa AR29, isolado clínico de lesão orofacial resistente ao ACV. Tendo sido previamente propagadas e tituladas, com diluições seriadas do vírus para determinar o TCID₅₀ (dose infecciosa para 50% das células).

Ensaio de redução de número de partículas infecciosas

O ensaio foi realizado em placas de 24 poços, preparadas com monocamada de células VERO. Uma placa foi infectada com dois MOI's distintos (0,1 e 1) e incubada em estufa úmida de tensão 5% de CO₂, a 37 °C por 1h. Em sequência, os poços foram lavados com tampão fosfato de salino (PBS), para serem então tratados com concentrações referentes, respectivamente, ao EC₅₀ e o dobro do EC₅₀ dos fármacos em estudo: diclofenaco (50µg/mL e 100µg/mL) e

ACV (0,5µg/mL e 1,0µg/mL). A placa foi incubada por 72h, e após esse período, foram retirados os sobrenadantes dos poços, e centrifugados a 13.000 rpm por 15min. Foram realizadas titulações seriadas em novas placas contendo monocamada de célula VERO, as placas foram incubadas em estufa úmida de tensão 5% de CO₂, a 37 °C por 1h. Em seguida, foi retirado o sobrenadante, lavada a placa, e adicionado DMEM 2X com Carboximetilcelulose 1%, afim de se observar a formação de placas de lise. Após 72h, as placas foram fixadas com paraformaldeído 10%, e após 24h coradas com cristal violeta 20%.

Resultados e Discussão

A ação dos fármacos foi testada frente a diferentes MOIs de HSV-1 (cepa KOS). A análise demonstrada na Figura 1 e 2, representa o número de placas de lise formadas após titulação, frente aos diferentes tratamentos com ACV ou DCF.

Não foi possível observar uma redução nos títulos virais com os diferentes tratamentos. Porém, foi observada uma redução no número de placas de lises formadas para ambas as concentrações do diclofenaco testadas, principalmente para o MOI de 1, demonstrando que para uma maior quantidade de partículas virais disponíveis, o fármaco possui uma melhor ação. É possível que isso ocorra devido a ação indireta do DCF sobre o ciclo de replicação viral, inibindo a COX-2. Dessa forma, menos partículas virais desencadeiam uma menor produção de fatores inflamatórios e, conseqüentemente, menor atividade do diclofenaco.

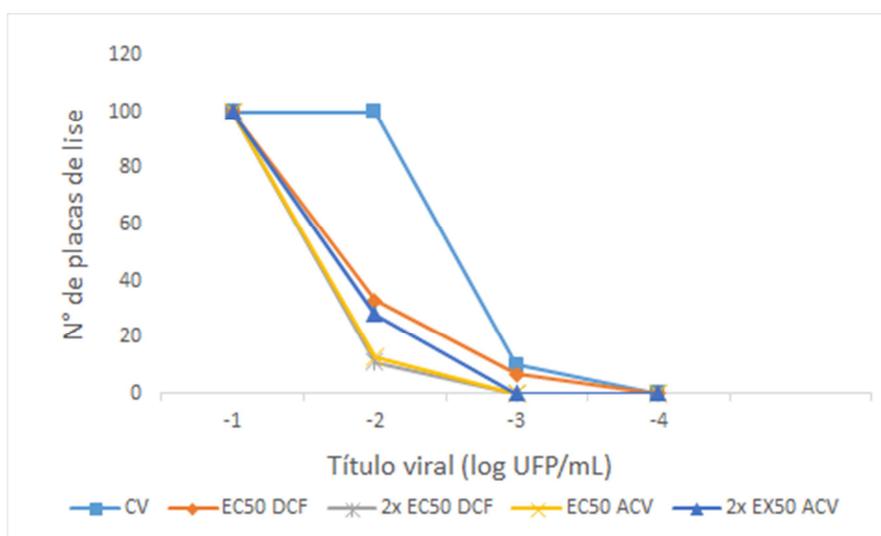


Figura 1: Diminuição do número de placas de lise do MOI de 1 para o vírus HSV-1 (cepa KOS) para os fármacos testados. CV= Controle de vírus; EC₅₀= Concentração efetiva para diminuir 50% da infecção Viral;

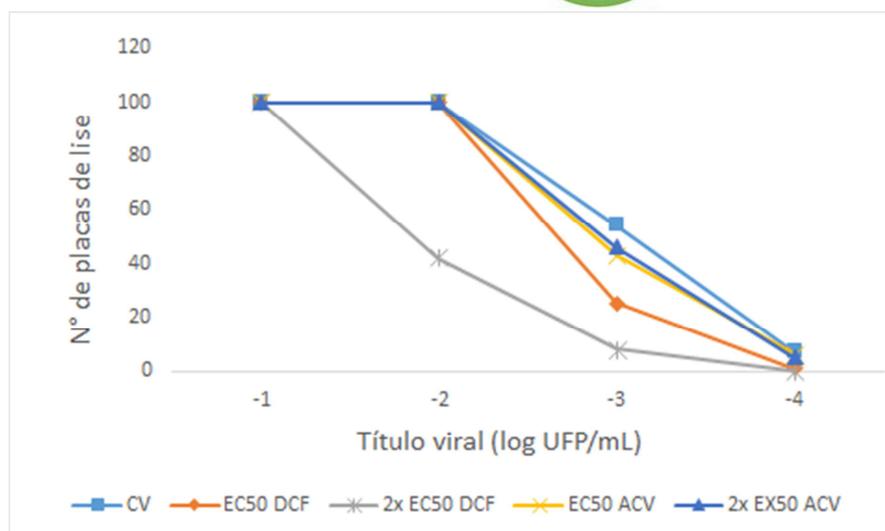


Figura 2: Diminuição do número de placas de lise do MOI de 0,1 do vírus HSV-1 (cepa KOS) para os fármacos.

Conclusões

A atividade antiviral do diclofenaco na presença de concentrações virais maiores (MOI 1) foi melhor do que em concentrações virais menores (MOI 0,1), demonstrando que com uma maior quantidade de partículas virais disponíveis, o fármaco possui uma melhor ação. Baseado nos resultados obtidos, a metodologia adotada utilizará o MOI de 1 para o experimento de disseminação intercelular.

Agradecimentos

Agradeço a Dyenefer Pereira, pela paciência, atenção e esclarecimento para a execução deste trabalho. Assim como, ao apoio financeiro recebido dos órgãos de fomento FA e CNPq.

Referências

- DAVIES, N. M., ANDERSON K.E. Clinical Pharmacokinetics of Diclofenac. Therapeutic insights and pitfalls. **Clinical Pharmacokinetics**, v.33, p.184–213, 1997.
- GORDON, Y. J.; ARAULLO-CRUZ, T.; ROMANOWSKI, E. G. The Effects of Topical Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs on Adenoviral Replication. **Archives of Ophthalmology**, v.116, p.900-905, 1998.
- WHITLEY, R. J.; ROIZMAN, B. Herpes simplex virus infections. **Lancet**, v. 357, p.1513-1518, 2001.