

## DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTIVIRAL *IN VITRO* DE ESTRUTURA DIBENZILIDENOCETONA A3 (C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>NO).

André Henrique Dos Santos (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Dyenefer Pereira Fonseca (Coorientadora), Tania Ueda Nakamura (Orientadora), e-mail: tunakamura@uem.br

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

**Área:** Farmácia

**Subárea do conhecimento:** Farmacognosia

**Palavras-chave:** Herpes simples tipo 1, dibenzilidenocetona A3 (DBC A3), mecanismo de ação.

### Resumo:

O Herpes simples tipo 1 (HSV-1) é um vírus envelopado de DNA fita dupla, amplamente difundido entre a população mundial. Além de ser causador de lesões vesiculares orofaciais, pode levar a quadros mais graves com encefalite viral. Até o momento, não há cura para pacientes infectados, sendo o tratamento atual realizado com análogos de nucleosídeos, como o aciclovir. Entretanto, a seleção de cepas virais resistentes torna necessária a busca por novos tratamentos. A dibenzilidenocetona A3 (DBC A3) é um derivado da dibenzilidenocetona (DBC), estrutura derivada dos curcuminóides e chalconas, que em ensaios preliminares apresentou atividade anti-HSV-1. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo a determinação do possível mecanismo de ação *in vitro* da DBC A3, por diferentes estratégias que retratam as fases da infecção viral, pelo método de redução de placas de lises. Os resultados mostraram que a DBC A3 exerce atividade antiviral nas etapas iniciais do ciclo de multiplicação do HSV-1, nas fases de adsorção e penetração. Dessa forma, a ação da DBC A3 pode estar relacionada à sua ligação/bloqueio dos receptores celulares, impedindo que ocorra a adsorção, e conseqüentemente a penetração do HSV-1 nas células.

### Introdução

O Herpes simples tipo 1 (HSV-1), pertencente à família *Herpesviridae*, é um vírus envelopado de DNA fita dupla, amplamente difundido na população mundial (SMITH, 2012). A infecção causada pelo HSV-1 normalmente ocorre na mucosa oral, causando lesões avermelhadas, com presença de vesículas. Em geral, as lesões desaparecem em poucos dias, entretanto pode evoluir para quadros mais graves, como encefalite viral e ceratite estromal (WHITLEY; ROIZMAN, 2001). Quanto ao tratamento, o fármaco de

escolha é o aciclovir (ACV), contudo, o uso contínuo e indiscriminado pode favorecer a seleção de cepas resistentes, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Dessa forma, faz-se necessária a busca por outras substâncias para a terapia herpética (WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

As Dibenzilidenocetona (DBC) são estruturas derivadas dos curcuminóides e chalconas (DIN et al., 2018). Apresentam potencial efeito anti-inflamatório, antioxidante, citotóxico e anti-HSV-1 (LEE et al., 2009). Ensaios de atividade antiviral realizados por nosso grupo de pesquisa mostraram que a dibenzilidenocetona A3 (DBC A3 - C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>NO) apresenta atividade anti-HSV-1. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o mecanismo de ação antiviral do DBC A3 *in vitro*.

## **Materiais e métodos**

### *Cultivo celular e de vírus*

Os experimentos foram realizados em células VERO, cultivadas em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas em estufa úmida a 37°C, com 5% de tensão de CO<sub>2</sub>. Nos ensaios de atividade antiviral foi utilizado suspensões virais de HSV-1, cepa KOS, em concentrações correspondentes a 40-60 unidades formadoras de placas (UFP).

### *Efeito sobre a adsorção*

Monocamada de células VERO foram previamente formadas em placas de 24 poços. Cada poço foi lavado com PBS e adicionado uma mistura contendo: suspensões virais (HSV-1, cepa KOS, 40-60 UFP/poço), mais as diluições do DBC A3. Em sequência, as placas foram incubadas a 4°C por 1h (geladeira). Ao término da incubação, os poços foram lavados com PBS e adicionado 1mL de DMEM e CMC 0,5% e incubados por 72h em estufa úmida a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Ao final, a monocamada foi fixada com formaldeído 10%, coradas com cristal violeta 0,5% e realizou-se o cálculo da porcentagem de inibição de placas.

### *Efeito sobre a adsorção e penetração*

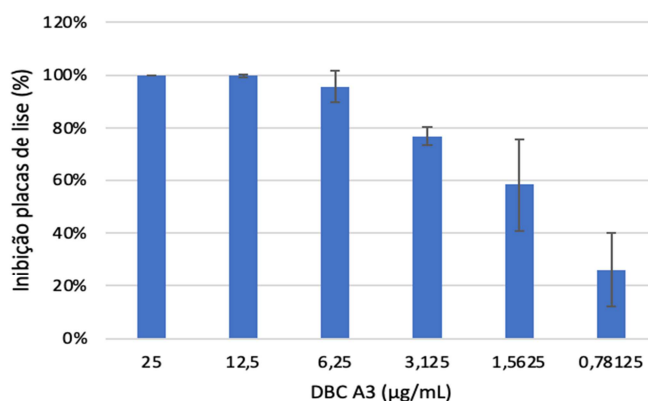
O protocolo para verificar a adsorção e penetração é semelhante ao de adsorção (item anterior), diferindo apenas na primeira etapa do processo. Onde, após adicionar a mistura contendo a suspensão viral (HSV-1, cepa KOS, 40-60 UFP/poço) e as diferentes diluições da DBC A3, as placas foram incubadas em estufa úmida a 37 °C por 1h, 5% tensão de CO<sub>2</sub>, e, não mais, a 4°C. Tal mudança se dá porque em 4°C a partícula viral é capaz apenas de adsorver à superfície celular e à 37°C ela consegue adsorver e penetrar na célula.

### *Tratamento das células antes da infecção viral (Profilático)*

Monocamadas de células VERO, formadas previamente em placas de 24 poços, foram lavadas com PBS e tratadas com diferentes concentrações de DBC A3. Nos poços referentes ao controle de célula e de vírus foram adicionados apenas DMEM e incubou-se a placa por 24h em estufa úmida a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>. Após, as placas foram lavadas com PBS e infectadas com 300 µl de suspensão viral (40-60 UFP/poço). Nas mesmas condições, incubou-se a placa por 1h. Em seguida, lavou-se os poços com PBS e adicionou-se 1 mL de DMEM e CMC 0,5%. As placas foram incubadas por 72h em estufa úmida 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>, fixada, corada e realizou-se a contagem de placas de lise.

### Resultados e Discussão

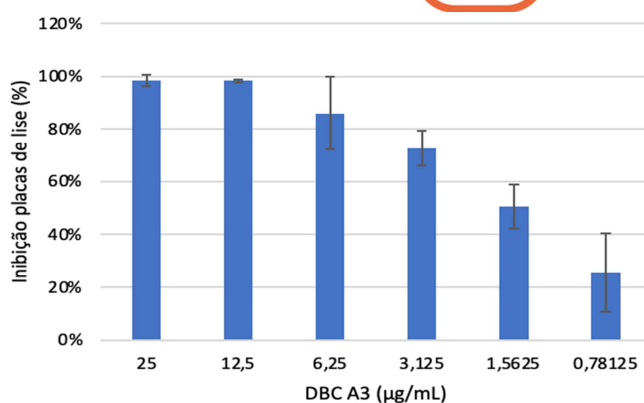
No ensaio de adsorção, o DBC A3 foi capaz de inibir completamente a formação de placas de lise em concentrações maiores que 10 µg/mL, com EC<sub>50</sub> (concentração efetiva de 50%) de 1,4 ± 0,4 µg/mL (**Figura 1**). A adsorção é a primeira etapa do ciclo de multiplicação viral, é nessa etapa em que o HSV-1 ancora-se nas células, através da ligação entre suas proteínas de superfície e os receptores celulares, sendo essencialmente uma ligação ligante-receptor. Sendo assim, sem a adsorção viral a infecção não é possível.



**Figura 1** – Efeitos do DBC A3 na inibição da adsorção do HSV-1 em células VERO, frente a diferentes concentrações de DBC A3 (µg/mL) de três experimentos independentes (adsorção). EC<sub>50</sub> (concentração efetiva de 50%) = 1,4 ± 0,4 µg/mL.

A etapa subsequente é a penetração, onde ocorre à internalização do nucleocapsídeo, via endocitose mediada por receptor, ou fusão do envelope viral com a membrana plasmática. Na **Figura 2** nota-se uma acentuada redução na formação das placas de lise, com EC<sub>50</sub> de 1,5 ± 0,3 µg/mL, evidenciando a forte atuação da DBC A3 nas etapas iniciais do ciclo de replicação do HSV-1.

Quanto ao ensaio profilático, não houve atividade anti-HSV-1 do DBC A3 nessa estratégia, mostrando que o composto não atua de forma profilática.



**Figura 2** – Efeitos do DBC A3 na inibição da adsorção e penetração do HSV-1 em células VERO, frente a diferentes concentrações de DBC A3 (µg/mL) de três experimentos independentes (adsorção e penetração). EC<sub>50</sub> (concentração efetiva de 50%) = 1,5 ± 0,3 µg/mL.

## Conclusões

Até presente momento, nossos resultados mostraram que a DBC A3 exerce atividade nas fases iniciais da replicação viral. Portanto, a ação do DBC A3 pode estar relacionada com a sua ligação/bloqueio das proteínas de superfície viral os receptores celulares, impedindo que ocorra a adsorção e, conseqüentemente, a penetração viral.

## Agradecimentos

Agradeço principalmente a Dyenefer P. Fonseca, pela paciência e ensinamentos para a execução dos experimentos. Também a Prof<sup>a</sup> Tania Ueda-Nakamura pelos conselhos e apoio. Ao apoio financeiro do CNPq.

## Referências

DIN, Z.U. et al. **Symmetrical and unsymmetrical substituted 2,5-diarylidene cyclohexanones as anti-parasitic compounds.** European Journal of Medicinal Chemistry, v.155, p.596-608, 2018.

LEE, K.H. et al. **Synthesis and biological evaluation of curcumin-like diarylpentanoid analogues for anti-inflammatory, antioxidant and anti-tyrosinase activities.** Europe Journal of Medicinal Chemistry, v.44, p.3195-3200, 2009.

SMITH, G. **Herpesvirus Transport to the Nervous System and Back Again.** Annual Review of Microbiology, v.66, p.153–176, 2012.

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