

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA DIBENZILIDENOCETONA A3 NA ULTRAESTRUTURA DAS CÉLULAS VERO INFECTADAS COM HERPES SIMPLES TIPO 1

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

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

Área: Farmácia

Subárea do conhecimento: Farmacognosia

Palavras-chave: Herpes simples tipo 1, dibenzilidenocetona A3 (DBC A3),
microscopia eletrônica.

Resumo:

O Herpes simples tipo 1 (HSV-1) é um vírus envelopado de DNA fita dupla, amplamente difundido entre a população mundial. O HSV-1 geralmente causa lesões vesiculares orofaciais autolimitadas, mas pode evoluir para quadros mais graves como encefalite viral. O tratamento das lesões é geralmente realizado com análogos de nucleosídeos, como o aciclovir, porém não há cura para pacientes infectados, sendo comum a recorrência. Assim, o uso frequente dos antivirais causa a seleção de cepas virais resistentes tornando necessária a busca por novas alternativas de tratamento. Um derivado da dibenzilidenocetona (DBC A3), estrutura derivada dos curcuminóides e chalconas, apresentou em ensaios preliminares atividade anti-HSV-1 nos estágios iniciais da replicação viral (adsorção e penetração), além de demonstrar atividade virucida. O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito do DBC A3 sobre as partículas virais, e na interação do HSV-1 com as células VERO, analisando a ultraestrutura das células infectadas pelos vírus, por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução e de transmissão. Os resultados mostraram que a DBC A3 é capaz de alterar a morfologia da partícula viral, danificando ou removendo completamente o envelope. Portanto, podemos sugerir que a DBC A3 causa danos ou remoção do envelope do HSV-1 dificultando ou impedindo a interação vírus-célula hospedeira.

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 inicia-se pelo contato direto entre um indivíduo sadio, com epitélio lesionado, e secreções de indivíduos infectados contendo o vírus, que constitui a infecção primária. Posteriormente o HSV-1 pode estabelecer latência nos gânglios

trigeminais. Em geral, as lesões desaparecem em poucos dias, entretanto pode evoluir para quadros mais graves, como ceratite estromal e encefalite viral, podendo ser fatal. 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 - C₂₁H₂₁NO) apresenta atividade anti-HSV-1 nos estágios iniciais da replicação viral. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a atividade do DBC A3 sobre as partículas virais, e na interação do HSV-1 com as células VERO, analisando a ultraestrutura das células infectadas pelos vírus, por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução e de transmissão.

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 CO₂. Quanto ao vírus, foram utilizadas suspensões virais de HSV-1, cepa KOS, em concentrações correspondentes a 40-60 unidades formadoras de placas (UFP/mL).

Propagação e concentração de partículas virais

Células VERO cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB), e mantidas em incubadora úmida a 37 °C e 5% de CO₂ por 72 h, foram inoculadas com HSV-1 (cepa KOS) previamente produzido e titulado, até destruição de aproximadamente 90% das células, depois, o meio foi coletado, centrifugado e adicionado em monocamada de células VERO até destruição de aproximadamente 90% das mesmas. Após este período, o sobrenadante foi retirado e submetido à centrifugação a 3.000 rpm por 15 min, com o intuito de separar e descartar os debris celulares presentes no meio. Logo após, o sobrenadante foi retirado, filtrado e submetido à ultracentrifugação (Hitachi Koki Himac CP90WX) em 27.900 rpm por 60 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento obtido foi ressuspendido em aproximadamente 500µl do próprio meio, e utilizado para tratamento com DBC e processamento para análise em microscópio eletrônico de varredura e de transmissão.

Análise de partículas virais tratadas com DBC por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV)

Para análise em microscópio eletrônico de transmissão (MET), concentrações do EC₅₀ (concentração efetiva de 50%) 2 µg/mL e EC₉₀ (concentração efetiva de 90%) 3 µg/mL de DBC foram adicionados às amostras de suspensão viral obtidas anteriormente e incubadas por 1h a 37 °C. Um controle sem tratamento foi incluído. Em seguida, as amostras foram adicionadas a grades de cobre, e submetidas à contrastação negativa com ácido fosfotúngstico 2%. Após secagem, as amostras foram analisadas ao microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1400. Adicionalmente, as partículas virais também foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV). Para isso, as amostras obtidas por ultracentrifugação tratadas e não-tratadas foram ressuspensas em meio DMEM e aderidas em lamínulas de vidro previamente tratadas com poli-L-lisina. Após, foram fixadas com paraformaldeído 2,5%, metalizadas com ouro e analisadas em um microscópio eletrônico de duplo-feixe FEI Scios.

Resultados e Discussão

Na análise das partículas virais tratadas com EC₅₀ (2 µg/mL) e EC₉₀ (3 µg/mL) de DBC por MEV em comparação com o controle não tratado, aparentemente houve alterações na morfologia das partículas virais, mas não foram alterações muito evidentes. Contudo, houve uma grande diminuição no número de partículas nas amostras tratadas em relação ao controle.

Já na análise das partículas virais tratadas com EC₅₀ (2 µg/mL) e EC₉₀ (3 µg/mL) de DBC por MET em comparação com o controle não tratado, as alterações nas partículas virais foram mais evidentes, apresentando deformidades ou remoção total do envelope viral.

Morfologicamente o HSV-1 (KOS) é um vírus composto por DNA de fita dupla, capsídeo icosaédrico envolto por tegumento e envelope com glicoproteínas. Dentre essas glicoproteínas, cinco delas estão envolvidas no processo de entrada do vírus na célula hospedeira: gB, gC, gD, gH e gL. Ou seja, se a partícula viral tem seu envelope danificado ou removido há a perda dessas glicoproteínas que são fundamentalmente responsáveis pela adsorção e penetração da partícula à célula alvo, conseqüente o vírus perde a capacidade de adsorver e infectar a célula.

Conclusões

Nas análises das partículas virais por MEV e MET, foram evidenciadas deformidades ou remoção total do envelope das partículas virais. O efeito virucida do DBC, assim como a ação sobre a etapa de adsorção e adsorção/penetração demonstrado pelo ensaio de redução de placas no projeto anterior (SANTOS et al., 2021) pode ser conseqüência do efeito do DBC sobre a integridade do envoltório do HSV-1. Considerando que os seus receptores estão no envelope, o vírus perde a capacidade de adsorver às células e conseqüentemente, penetrar e completar o seu ciclo replicativo.

Agradecimentos

Agradeço principalmente a Prof.^a Tania Ueda Nakamura, pela paciência e ensinamentos para a execução dos experimentos. Também a Danielle L. Bidóia pelos conselhos e auxílio nas análises. Aos técnicos do COMCAP (Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa) e ao apoio financeiro do CNPq, FINEP e Fundação Araucária.

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.

SANTOS, A.H. et al. Determinação do mecanismo de ação antiviral *in vitro* de estrutura dibenzilidenocetona A3 (C₂₁H₂₁NO). *In*: ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2021, Maringá. **Resumos [...]**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2021. p. 3-4. Disponível em: <http://www.eaic.uem.br/eaic2021/anais/artigos/5142.pdf>. Acesso em: 19 ago. 2022.

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.