

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE LIPOSSOMAS CONTENDO DERIVADO DA ROSA DE BENGALA B

Sara Calzavara Polido (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Victória Carolina Genesini, André Henrique dos Santos, Tania Ueda Nakamura (Orientador). E-mail: ra129650@uem.br
E-mail: vigenesini28@gmail.com E-mail: ra109734@uem.br 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; Nanopartículas contendo Rosa de Bengala; atividade fotodinâmica

RESUMO

O vírus Herpes simples tipo 1 (HSV-1) é um vírus envelopado de DNA fita dupla, que leva a um quadro caracterizado por lesões orofaciais avermelhadas. Seu tratamento é comumente realizado com fármacos análogos de nucleosídeos, como o aciclovir. No entanto, o uso indiscriminado vem causando o surgimento de cepas do HSV-1 resistentes ao aciclovir, havendo assim a necessidade da busca de novos fármacos para o tratamento das infecções causadas pelo HSV-1. Os sistemas lipossomais já são utilizados na indústria farmacêutica como transportadores de fármacos, promovendo uma liberação controlada das substâncias. A Rosa de Bengala B (RB) é um corante utilizado na indústria alimentícia e que apresentou resultados promissores contra bactérias e na morte de células tumorais, no entanto, suas propriedades farmacológicas são limitadas devido a sua forma hidrofílica, característica que impacta de forma negativa na sua captação celular e biodistribuição. Tendo em vista o alto potencial fotodinâmico da RB, um derivado mais hidrofóbico (RBDEC) foi incorporado em vesículas lipossomais, assim, o objetivo deste trabalho foi comparar a atividade biológica (atividade antiviral e a citotoxicidade *in vitro*) dos lipossomas contendo o derivado da Rosa de Bengala B (RBDEC) na presença e na ausência da luz. O sistema lipossomal, contendo o RBDEC associado à terapia fotodinâmica, mostrou-se mais efetivo do que o derivado puro no ensaio de citotoxicidade. Para a atividade antiviral, concentrações abaixo de CC_{50} deverão ser testadas.

INTRODUÇÃO

O Herpes simples tipo 1 (HSV-1) pertence à família Herpesviridae e a subfamília Alphaherpesvirinae. É um vírus envelopado de DNA dupla fita, causador de infecção que comumente causa lesões orofaciais avermelhadas com presença de vesículas e que pode ou não ser acompanhada de febre, a soro prevalência é estimada em aproximadamente 65-90% da população mundial (KUMAR et al,

2016).

A infecção primária acontece pelo contato entre mucosas de um indivíduo que apresenta lesões com um sadio e o vírion migra através dos axônios até a base dos gânglios dos neurônios, onde tende a permanecer em estado latente. A reativação da infecção pode ocorrer sob condições de estresse ou por comprometimento do sistema imune. O principal tratamento anti-herpético empregado é realizada com análogos de nucleosídeos, como o Aciclovir (ACV), cujo mecanismo de ação ocorre após a fosforilação pela timidina quinase (tanto viral como celular), quando se torna ativo, e dessa forma, funciona como substrato da DNA polimerase viral e ao ser adicionado à fita de DNA, causando bloqueio na replicação do HSV-1. Contudo, mutações podem afetar o tratamento devido ao surgimento de cepas resistentes. Atualmente, não há tratamento suficientemente eficaz para eliminar o vírus do organismo, ocasionando episódios recorrentes de infecção (WHITLEY; ROIZMAN, 2001). Devido a este fato, há a necessidade de busca por novas substâncias anti-herpéticas.

Os sistemas lipossomais são biodegradáveis, possuem baixa toxicidade ao organismo, podem ser utilizados como transportadores de fármacos, e quando melhorados são capazes de fornecer proteção contra a degradação (AOKI et al., 1997). Assim, a Rosa de bengala B (RBB) é um corante hidrossolúvel que possui quatro átomos de iodo na estrutura xantênica e quatro átomos de cloro ligados ao anel benzênico. Possui baixo custo, ampla disponibilidade e é utilizada na indústria alimentícia japonesa desde 1973. Na terapia fotodinâmica, apresentou bons resultados inativando bactérias causadoras de problemas odontológicos e na morte de células tumorais (GIANOTTI et al, 2014). Entretanto, seu uso é limitado devido a sua tendência hidrofílica. A fim de aprimorar seu efeito, modificações em sua estrutura com objetivo de torná-la mais hidrofóbica foram realizadas, e estudos já demonstraram que derivados modificados desta forma, como o éster butílico de Rosa Bengala (RBBUT) têm efeito potencializado (PELLOSI et al., 2013).

Desta maneira, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito citotóxico, atividade antiviral e atividade fotodinâmica *in vitro* do sistema lipossomal misto DPPC/F127 incorporados com RBDEC, derivado da RBB, ainda mais hidrofóbico que o RBBUT.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo celular, vírus e nanopartículas.

As amostras de Nanopartículas vazias (NV) ou contendo o derivado de Rosa de Bengala (NRBDEC) foram preparadas e fornecidas pela doutoranda Ana Claudia Pedrozo da Silva, sob responsabilidade do prof. Dr. André Luiz Tessaro da UFTPR de Apucarana e conservadas em temperatura ambiente. Os ensaios de citotoxicidade e atividade antiviral foram realizados em células Vero cultivadas em DMEM e suplementadas com 10% de SFB (soro fetal bovino). As culturas foram mantidas em estufa úmida a 37 Cº com tensão de 5% de CO₂, em garrafas plásticas de cultura de células. Os subcultivos das células foram realizados conforme

recomendação da ATCC (*American Type Culture Collection*). Amostras de HSV-1 (Herpes simples – tipo 1) cepa KOS foram propagadas em monocamadas células VERO preparadas conforme acima descrito. A suspensão de vírus obtida foi quantificada, separada em alíquotas em criotubos e armazenadas a -20 °C até o momento do uso.

Ensaio de citotoxicidade

Nas monocamadas de células VERO formadas em placas de 24 poços foram adicionadas as amostras: RBDEC ou NV ou NRBDEC nas concentrações de 5 µM, 2,5 µM e 1,125 µM. O controle de células recebeu somente DMEM. Após incubação das placas a 24 h a 37 °C e 5% de CO₂, uma das placas foi exposta à luz por 20 minutos enquanto a outra permaneceu envolvida em papel alumínio por todo o período de incubação. A viabilidade foi avaliada pelo método de Azul de Tripán. O meio foi retirado e então foram adicionados 100 µL de tripsina, após 3 min adicionou-se 150 µL de DMEM contendo 10% de SFB para a ressuspensão das células. Então, foram adicionados, 150 µL de uma solução 0,4% de Azul de Tripán. Após 2 min foi realizada a contagem diferencial de células utilizando Câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio ótico comum, considerando um total de 250 células.

Atividade antiviral

Duas placas de 24 poços com monocamada de células VERO foram infectadas com suspensão de HSV-1 (60-80 UFP/poço) durante 1 h a 37°C. Após a lavagem com PBS foram tratadas com diferentes concentrações das amostras preparadas em meio DMEM. Uma placa foi exposta à luz por 20 minutos, enquanto a outra foi mantida no escuro pelo mesmo período. Ao fim do período de incubação, as monocamadas de células infectadas foram lavadas com PBS e acrescentou-se DMEM com 0,5% de carboximetilcelulose em todos os poços e incubadas durante 72 h a 37°C em atmosfera úmida a 5% CO₂. As células foram fixadas com formaldeído 10% e coradas com solução de Cristal violeta 0,5%. As placas de lise foram contadas e realizou-se o cálculo da porcentagem de inibição de placas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos ensaios de citotoxicidade foram testadas amostras de RBDEC, NV e NRBDEC, em várias concentrações, e a concentração tóxica para 50% das células (CC₅₀) foi determinada e os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Determinação da citotoxicidade do RBDEC (derivado da Rosa de Bengala) incorporada às nanopartículas.

Amostra	CC ₅₀ (µM)	
	Luz	Escuro
Derivado da RB (RBDEC)	1,5	> 5,0

Nanopartículas vazias (NV)	> 5,0	> 5,0
Nanopartículas com RBDEC (NRBDEC)	0,1	> 5,0

As amostras de nanopartículas contendo o derivado de RB foram mais tóxicas às células na presença de luz quando comparadas às amostras da substância pura (não incorporada). Os ensaios de atividade antiviral, encontram-se em andamento.

CONCLUSÕES

As nanopartículas contendo o derivado de Rosa de Bengala apresentaram efeito tóxico sobre as células VERO em concentração 10 vezes menor do que o derivado de Rosa de Bengala puro na presença de luz, mostrando que a incorporação da RBDEC nas nanopartículas potencializa a ação biológica. Portanto, os ensaios de atividade antiviral com as NRBDEC e NV em andamento, estão sendo realizados em concentrações inferiores a 0,1µM.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Universidade Estadual de Maringá (PIBIC) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

AOKI, H. et al. Effects of positive charge density on the liposomal surface on disposition kinetics of liposomes in rats. **International journal of pharmaceutics**, 1997, v. 156, n.2, p. 163-174.

GIANOTTI, E. et al. An efficient Rose Bengal based nanoplatfom for photodynamic therapy. **Chemistry**, 2014, v.20, p.10921–10925.

KUMAR, S. P.; CHANDY, M. L.; SHANAVAS, M.; KHAN, S.; SURESH, K. V. Pathogenesis and life cycle of herpes simplex virus infection-stages of primary, latency and recurrence. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology**, 2016, v. 28, p. 350-353.

PELLOSI, D. S. et al. Evaluation of the Photodynamic Activity of Xanthene Dyes on Artemia salina described by Chemometric Approaches. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 2013, v. 85, p. 1267–1274.

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