

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HSV-1 DE DERIVADOS N-METILPIRAZÓLICOS.

Sara Calzavara Polido (PIBIC/CNPq/FA/UEM), André Henrique Dos Santos, Tania Ueda Nakamura (Orientador). E-mail: ra129650@uem.br 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; Compostos heterocíclicos; citotoxicidade; atividade antiviral.

RESUMO

O vírus Herpes simples tipo 1 (HSV-1) é um vírus envelopado de DNA de dupla fita, que causa lesões orofaciais e é uma das infecções virais mais comuns globalmente. Ele pertence à família *Herpesviridae* e é transmitido pelo contato direto com indivíduos infectados. O tratamento geralmente utiliza análogos de nucleosídeos como o aciclovir, mas seu uso prolongado pode levar ao desenvolvimento de cepas resistentes, especialmente em pacientes imunocomprometidos. Assim, há uma necessidade de novas substâncias antivirais. Este estudo avaliou a citotoxicidade e a atividade anti-HSV-1 de compostos heterocíclicos do grupo dos pirazóis 1,3,4 trissubstituídos em culturas celulares VERO, usando o método colorimétrico do MTT. De sete compostos testados, um mostrou proteção eficaz contra a infecção por HSV-1, sugerindo que ele pode ser um candidato promissor para novos tratamentos antivirais.

INTRODUÇÃO

O Herpes simples tipo 1 (HSV-1), um vírus pertencente à família *Herpesviridae*, apresenta como genoma DNA fita dupla protegido por um capsídeo de simetria icosaédrica e envolvido por um envelope de natureza lipoproteica. A doença se manifesta geralmente como lesões muco cutânea localizadas na boca e na face, com presença de vesículas que tendem a desaparecer completamente em cerca de 10 a 14 dias (Santos. et al., 2021).

A capacidade de latência do HSV-1 nas células neuronais faz com que o vírus permaneça por toda a vida em alguns indivíduos, cujas recidivas além de causar incômodos frequentes representam fontes de contaminação e disseminação do vírus na comunidade. Com isso, há necessidade de buscar fármacos anti-herpéticos alternativos eficazes e seguros.

Os compostos heterocíclicos apresentam uma grande importância, pois diversos fármacos exibem ao menos um anel heterocíclico em sua composição, representando mais de 85% das estruturas químicas biologicamente ativas comercializadas (Jampilek, 2019). O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade anti-HSV-1 de compostos heterocíclicos do grupo dos pirazóis 1,3,4 trissubstituído *in vitro*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo celular, vírus e compostos

Sete compostos derivados de *N*-metilpirazóis 3,4-dissubstituídos foram sintetizados e fornecidos pelo Laboratório de Síntese de Heterocíclicos SINTHET, pela aluna de doutorado Julia Poletto, coordenado pela Profa. Dra. Fernanda Andréia Rosa. Os ensaios de citotoxicidade e atividade antiviral foram realizados em células Vero cultivadas em DMEM e suplementadas com SFB (soro fetal bovino). As culturas foram mantidas conforme recomendação da ATCC (*American Type Culture Collection*). Amostras de HSV-1 (cepa KOS) foram propagadas em monocamadas de células VERO preparadas conforme a ATCC. 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

A partir de uma monocamada de células VERO foi preparada a suspensão celular em DMEM com SFB, que foi distribuída nos poços de uma placa de 96 poços e incubada a 37 °C durante 24h. As células foram lavadas com PBS (tampão fosfato salino) e diluições seriadas (1000 a 1,25 µg/mL) dos compostos foram adicionadas aos poços. A placa foi incubada por 72 h, a 37 °C. Após a incubação, os poços foram lavados com de PBS, e, posteriormente, adicionado solução de MTT, exceto no branco, seguido de incubação por 4 h ao abrigo da luz, em estufa 37 °C. Em seguida, o MTT foi removido e adicionado DMSO (dimetilsulfóxido) em todos os poços. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de ELISA (*Enzyme-Linked*

Immunosorbent Assay), em 570 nm. Foram realizados pelo menos 3 experimentos independentes.

Atividade antiviral

Monocamadas de células VERO preparadas em placas de 96 poços e infectadas com a suspensão de HSV-1 (cepa KOS) TCID₅₀, exceto nos poços destinados ao controle de células, onde foram adicionados DMEM, e incubadas por 1h, 37 °C, 5% CO₂. Sobre as monocamadas infectadas foram adicionadas as concentrações dos compostos preparados em DMEM, em triplicata. A placa foi incubada a 37°C durante 72h. A viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico do MTT. Os resultados considerados representam a média de 3 experimentos independentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade, revelados pelo método colorimétrico do MTT, quando comparados, os compostos menos tóxicos às células foram os de número 1 e 6 (Fig 1).

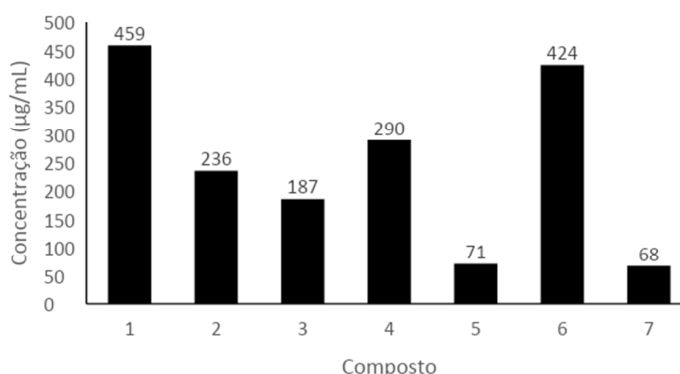


Figura 1 – Resultados do ensaio de citotoxicidade dos compostos heterocíclicos realizados em cultura de células VERO, cuja viabilidade foi revelada pelo método colorimétrico do MTT. Os valores apresentados representam a concentração do composto capaz de matar 50% das células VERO (CC₅₀).

Os resultados dos ensaios realizados para verificar a atividade antiviral demonstrou que apenas o composto 1 foi capaz de proteger as células Vero contra a infecção viral (Tabela 1).

Tabela 1 – Atividade antiviral. Determinação da Concentração efetiva capaz de proteger 50% (EC₅₀) das células VERO contra a infecção de HSV-1 cepa KOS.

Composto	1	2	3	4	5	6	7
EC ₅₀ (µg/mL)	43,5	>100	>100	>100	>100	>100	>100

O composto 1 foi capaz de proteger 50% das células VERO contra a infecção por HSV-1, sendo a concentração efetiva (EC₅₀) igual a 43,5 µg/mL. As demais amostras não apresentaram atividade até a concentração máxima testada (100µg/mL) e, portanto, consideramos que estas não apresentam atividade antiviral, pois uma EC₅₀ acima deste valor é considerada muito alta para substâncias puras. Esta análise é respaldada pelos valores do índice de seletividade (IS) obtidos para as demais amostras (< 1,0), sendo que a amostra 1 apresentou IS igual a 10,6.

CONCLUSÕES

Dentre os sete compostos analisados, apenas o composto 1 foi capaz de proteger 50% das células VERO quando infectadas pelo HSV-1, sendo cerca de 10 vezes mais ativo sobre o HSV-1 do que sobre as células hospedeiras. Estes resultados indicam que o composto 1 apresenta atividade anti-HSV-1 *in vitro*.

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. À Prof.a Tania Ueda Nakamura pelos ensinamentos, paciência e compreensão durante a execução do trabalho. Ao André Henrique dos Santos no auxílio à realização dos experimentos e à Dra. Valéria Aquilino Barbosa pelo auxílio com os compostos.

REFERÊNCIAS

JAMPILEK, J. Heterocycles in medicinal chemistry. **Molecules**, v. 24, n. 21, p. 3839, 25 out. 2019.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D.; COUCEIRO, J. N. S. S. **Virologia humana**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021. 746 p.