

MOLÉCULA DERIVADA DA 2-PICOLILAMINA DA CLASSE DA 4-TIAZOLIDINONA INIBE A REPLICAÇÃO DO VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA (BVDV)

LAURA MORAIS NASCIMENTO SILVA¹; CLARISSA CAETANO CASTRO²;
ADRIANA MACHADO DAS NEVES²; RENATA NOBRE DA FONSECA²; ISABEL
SILVA WETZEL²; SILVIA DE OLIVEIRA HÜBNER³.

¹Universidade Federal de Pelotas – lmoraissns@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas

³Universidade Federal de Pelotas – silviaohubner@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Distribuído mundialmente, o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é relacionado a enfermidades em bovinos, ovinos, suínos e animais silvestres. Pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Pestivirus*, o BVDV tem genoma RNA e envelope lipoproteico (FLORES, 2007).

O desenvolvimento de fármacos antivirais que possam prevenir ou combater uma infecção é indispensável, porém, a disponibilidade desses compostos é escassa. Diversos estudos para o desenvolvimento de novas drogas de efeito antiviral têm sido realizados com base em substâncias naturais e sintéticas com o objetivo de determinar e caracterizar novos compostos que possam inibir o ciclo replicativo viral e, assim, servir como modelos para novas drogas, como as moléculas derivadas da classe das 4-tiazolidinonas. Esta classe de compostos é de grande interesse científico devido às suas propriedades químicas e atividades biológicas. Em seu estudo, CIHAN-ÜSTÜNDAĞ et al. (2016), descrevem seu efeito antiviral. Dessa maneira, é importante destacar os estudos de compostos derivados da 4-tiazolidinona com ação inibitória sobre a enzima transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) (SURYAWANSHI et al., 2017) e contra a RNA polimerase RNA do vírus da hepatite C (HCV) (KÜÇÜKGÜZEL et al., 2013), alvos para o desenvolvimento de medicamentos contra essas doenças.

Este trabalho tem como objetivo demonstrar a atividade antiviral *in vitro* da molécula denominada V28, derivada da classe das 4-tiazolidinonas frente ao BVDV.

2. METODOLOGIA

Cultivo de células

Células MDBK (Madin-Darby bovine kidney) foram mantidas em meio essencial mínimo (E-MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), penicilina e estreptomicina (Sigma-Aldrich, USA), e anfotericina B (Cristália, Brasil) a 37 °C em uma estufa contendo 5% de CO₂.

Síntese da molécula

A molécula V28, derivada da classe da 4-tiazolidinonas foi obtida pelo LaQuiABio (Laboratório de Química Aplicada a Bioativos) de acordo com a metodologia descrita pelo grupo de pesquisa do Dr. Cunico (MARQUES et al., 2014). A molécula foi diluída em dimetilsulfóxido e estocada a 4°C até o momento da utilização (CASTRO, 2016).



Avaliação da citotoxicidade

O ensaio foi realizado em microplaca de poliestireno com 96 cavidades, em quadruplicada, e repetido três vezes. Após 24 horas, foram adicionadas diferentes concentrações da V28 (3 a 24 $\mu\text{g/mL}$) sobre o tapete celular. As viabilidades celulares foram mensuradas pelo ensaio de MTT após 72 horas de incubação. As leituras das densidades ópticas foram quantificadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. As concentrações não tóxicas consideradas foram as que permitiram uma viabilidade celular maior que 90% quando comparadas com o controle (células não tratadas). A partir do ensaio foi determinada a maior concentração não citotóxica da molécula.

Avaliação da atividade antiviral

A avaliação da atividade antiviral da molécula foi realizada comparando a diferença entre o título viral nas células não tratadas e tratadas com a V28 na maior concentração não citotóxica. Os títulos virais foram calculados pelo método de diluição limitante (BEHRENS e KÄRBER, 1935) e expressos como dose infectante a 50% do tecido celular em 100 μL (TCID₅₀/100 μL) após 72 horas de incubação a 37 °C. O ensaio foi realizado em triplicata.

Determinação de ação sobre a replicação do RNA viral

Células MDBK foram inoculadas com BVDV a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 1 e, após 1 h a 37 °C o inóculo foi removido e as células lavadas com E-MEM. Células não tratadas e infectadas foram recuperadas a cada 2 h (1, 3, 5, 7, 9 e 11 h pós-infecção) e as amostras estocadas a - 70°C até posterior titulação. Assim foi determinada a curva de crescimento do BVDV em células MDBK. Em paralelo, a tiazolidinona V28 foi adicionada nos diferentes tempos após a infecção (1, 3, 5, 7, 9 e 11 h pós-infecção). As culturas foram incubadas por até 24 horas após a infecção, quando o sobrenadante foi coletado e titulado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração não citotóxica da molécula V28 em células MDBK foi de 12 $\mu\text{g/mL}$ (>93% de viabilidade celular). Essa concentração foi utilizada para avaliar a atividade anti-BVDV. A determinação da citotoxicidade exercida pela molécula da classe das 4-tiazolidinonas é essencial para o desenvolvimento dos estudos da atividade deste composto contra o BVDV.

A partir das titulações realizadas foi observado inibição na produção de partículas virais na presença da molécula V28 quando da comparação com o controle (ausência da molécula). Na presença da V28 houve um decréscimo de 77,6% nos títulos virais (de 10^{3,25} para 10^{2,6} TCID₅₀/100 μL)

Analisando a curva de crescimento do BVDV em células MDBK, foi possível observar uma redução significativa no título quando a molécula V28 foi adicionadas entre 1 a 5 h pós-infecção (Figura 1). Máximo de PI (100%) foi detectado quando a molécula V28 foi adicionada 1 h pós-infecção. Nos períodos entre 3 e 5 h houve redução entre 68 a 90% (p<0,01). Não houve redução no crescimento viral quando a molécula foi adicionada a partir de 7 h pós infecção, quando comparado com a curva controle (Figura1).

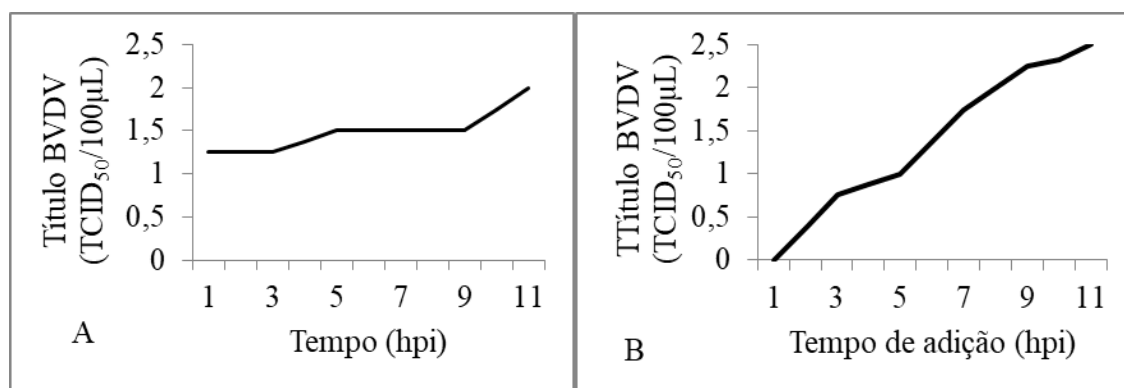


Figura 1. Efeito da moléculas V28 sobre o crescimento do BVDV. (A) Curva de crescimento one-step do BVDV. Células MDBK foram infectadas com BVDV a um MOI de 1, e nos tempos indicados (1, 3, 5, 7, 9 ou 11 hpi), foi determinado o título viral (TCID₅₀/100μl). (B) Efeito de diferentes tempos de adição da molécula V28 sobre a curva de crescimento do BVDV. Células MDBK foram infectadas com MOI de 1 com BVDV e após 1, 3, 5, 7, 9 ou 11 h foi adicionada a molécula V28.

A continuação da realização de estudos complementares para maiores esclarecimentos do potencial antiviral das moléculas poderá permitir o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas contra agentes infecciosos.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos indicam atividade anti-BVDV da molécula V28 e atuação na fase inicial da infecção celular pelo BVDV, no período de síntese do RNA e enzimas virais, antes da montagem e egresso.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CASTRO, C.C de. **Avaliação da atividade antiviral do peptídeo P34 e moléculas da classe da 4-tiazolidinona frente a vírus de importância veterinária**. 117f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

CIHAN-ÜSTÜNDAĞ, G.; GÜROSOY, E.; NAESENS, L.; ULUSOY-GÜZELDEMIRCI, N.; ÇAPAN, G. Synthesis and antiviral properties of novel indole based thiosemicarbazides and 4-thiazolidinones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.24, n2, p240-246, 2016.

MARQUES, H.G; KUNZLER, A.; BARENO, V.D.O.; DRAWANZ, B.B.; MATELLOTO, H.G.; LEITE, F.R.M.; NASCIMENTO, G.G.; NASCENTE, P.S.; SIQUEIRA, G.M.; CUNICO, W. Antifungal activity of 3-(heteroaryl-2-ylmethyl) thiazolidinone derivatives. **Medicinal Chemistry**, v.10, p.355-360, 2014.

FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM, 2007.

KÜÇÜKGÜZEL, I.; SATILMIS, G. GURUKUMAR, K.R.; BASU, A.; TATAR, E.; NICHOLS, D.B.; TALELE, T.T.; KAUSHIK-BASU, N. 2-Heteroaryl-imino-5-arydene-4-thiazolidinones as a new class of non-nucleoside inhibitors of HCV NS5B polymerase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.64, p 74-80, 2013.



SURYAWANSHI, Rahul et al. Evaluation of 4-thiazolidinone derivatives as potential reverse transcriptase inhibitors against HIV-1 drug resistant strains. **Bioorganic Chemistry**, v. 71, p. 211-218, 2017.