ÁREA DE SUBMISSÃO: BIOENSAIOS – BE11

**DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS REDUZEM CARGA DE
ZIKV EM CÉLULAS VERO**S.M.C. GONÇALVES¹; M.R.P. GALDINO²; M.J.B.M. RÊGO¹;
R.F.O. FRANÇA³; M.G.R. PITTA¹¹ Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Recife, PE.² Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Recife, PE.³ Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz, Departamento de Virologia, Recife, PE.

E-mail para contato: sayonara_123_6@hotmail.com

RESUMO – Como a literatura mostra, os derivados tiazolidínicos (TZDs) possuem atividade contra diversos vírus, entre eles: o vírus da chikungunya e da hepatite B, sendo assim, avaliamos o potencial efeito antiviral dos derivados Tiazolidínicos (GQ103, GQ106, GQ138, GQ140, JB3, JB11 e JB13) contra o ZIKV. Testamos a citotoxicidade dos derivados TZDs em células VERO através do método MTT. A dose dos derivados variou de 10 à 300µM. A cloroquina foi usada como droga controle. A viabilidade celular se manteve superior a 60%. A partir desses resultados, calculamos o IC₅₀ e determinamos a dose que seria utilizada para avaliar a carga viral. Infectamos as células VERO com o ZIKV e 2 horas após a infecção, tratamos essas células com os derivados e suas respectivas doses por 48 e 72 horas. Após esse período retiramos o sobrenadante, extraímos o RNA e avaliamos a carga viral, através do ensaio de RT-qPCR. O derivado GQ140 e JB3 nas doses de 300 e 50µM respectivamente se mostraram promissores agentes anti ZIKV, apresentando expressiva redução do número de cópias de RNA viral. Mais ensaios precisam ser realizados, afim de comprovar esses achados.

PALAVRAS CHAVE: ZIKV, derivados tiazolidínicos, agentes antivirais.

ABSTRACT - As literature shows, thiazolidine derivatives (TZDs) have the activity against several viruses, among them: chikungunya virus and hepatitis B, thus, we evaluated the potential antiviral effect of thiazolidine derivatives (GQ103, GQ106, GQ138, GQ140, JB3, JB11 and JB13) against ZIKV. We tested the cytotoxicity of TZDs in VERO cells by the MTT method. One dose of the derivatives ranged from 10 to 300 µM. Chloroquine was used as a control drug. A cell viability remained higher than 60%. From the calculated results or IC₅₀ and determines a dose that is used to assess a viral load. We infected as VERO cells with ZIKV and 2 hours after an infection, we treated these cells with the derivatives and their respective doses for 48 and 72 hours. After this time, we removed the supernatant, extracted the RNA and evaluated a viral load, through

the RT-qPCR assay. The derivative GQ140 and JB3 at the doses of 300 and 50 μ M, respectively, are shown to be promising anti-ZIKV agents, with an expressive reduction in the number of viral RNA copies. Further trials need to be performed in order to prove these findings.

KEY WORDS: ZIKV, thiazolidin derivatives, antiviral agents.

1. INTRODUÇÃO

O Zika vírus (ZIKV) é uma emergente arbovirose da família Flaviviridae, a qual inclui Dengue, Febre do Nilo Ocidental e Febre Amarela. A transmissão do ZIKV ocorre por picadas de mosquitos do gênero *Aedes*, em especial a espécie *Aedes aegypti* (HAMEL et al., 2015). Ademais recentemente foi confirmado que os culicídeos também são vetores de transmissão do zika vírus (ALIOTA et al. 2016).

Em relatório elaborado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) foram apresentados novos compostos já disponíveis no mercado (antiparasitários e antivirais) potenciais para o tratamento do ZIKV como a amodiaquina, cloroquina, ribavirin, interferon α , BCX4430 (Biocryst, EUA), NITD008 e GS-5734 (GILEAD, EUA) e anticorpos monoclonais (OMS, 2016). Os estudos com estes agentes terapêuticos estão em diferentes fases de desenvolvimento, desde os ensaios preliminares até estudos de fase clínica.

As tiazolidinodionas (TZDs), também conhecidas como glitazonas, são ligantes do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gamma (PPAR γ), um receptor nuclear que regula a ativação de uma série de genes específicos. Foi descrito na literatura por Jadav et al. (2015) a atividade de derivados tiazolidínicos contra o vírus chikungunya. Neste estudo, cinco compostos apresentaram ação antiviral in vitro em concentrações micromolar. O docking molecular realizado sugere que os compostos agem possivelmente inibindo uma protease do vírus chikungunya (JADAV et al., 2015).

A rosiglitazona apresentou efeito supressor dose-dependente sobre a replicação do vírus da hepatite B (HBV) in vitro em um estudo realizado por WAKUI et al. (2010). A TZD utilizada no estudo promoveu diminuição do DNA viral e dos intermediários replicativos em sobrenadante de cultura de células, mas teve um efeito maior nos intermediários replicativos intracelulares do HBV (WAKUI et al., 2010).

MANVAR et al. (2015) descreveram na literatura a atividade de híbridos contendo o anel tiazolidínico. Os compostos testados no estudo se apresentaram como inibidores da RNA-polimerase do vírus da dengue, uma proteína que desempenha papel crucial na replicação do vírus (MANVAR et al., 2015). Um outro estudo realizado por NITSCHKE et al. (2013) apresentou híbridos tiazolidínicos com ação inibidora da protease do vírus da dengue in vitro, que é um alvo promissor para o desenvolvimento de drogas antivirais (NITSCHKE et al., 2013). Conclui-se que as tiazolidinas são uma promissora classe de fármacos para o tratamento de pacientes portadores de ZIKAV, uma vez que há relatos na literatura que seus derivados possuem atividade imunomoduladora e antiviral.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Cultura de Células VERO

As células da linhagem de rim de macaco verde africano (VERO) foram cultivadas em garrafa de cultura T75 contendo meio DMEM suplementados com 10% de Soro

Bovino Fetal a 2% de Penicilina/Estreptomicina e mantidas em estufa de CO₂ 5 % a 37°C.

Ensaio de Citotoxicidade dos derivados tiazolidínicos em células VERO

As células foram plaqueadas na concentração de 104 células/100 µl em placas de 96 poços. Os novos derivados foram adicionados nas doses de 1 à 300µM e como controle negativo a cloroquina foi utilizada nas doses de 1 à 100µM. As placas foram mantidas em estufa de CO₂ 5% à 37°C por 72 horas. Após as 72 horas, foi adicionado 20µL da solução de MTT (0,5mg/mL), e incubado por 3 horas na estufa. Em seguida, foi adicionado 130µl da solução de SDS à 20% para dissolução do precipitado. A absorbância foi lida em espectrofotômetro de placa a 570nm (BioTek EL808), após 24 horas.

Infecção de ZIKV em células VERO

As células VERO foram plaqueadas em uma concentração de 1×10^4 em placas de 96 poços e mantidas em estufa de CO₂ 5 % a 37°C durante 24 horas. Após o período de incubação os sobrenadantes foram recolhidos e as células foram infectadas com o ZIKV em um MOI de 0.1, as placas foram mantidas em estufa de CO₂ 5% à 37°C. Após 2 horas, o inóculo foi retirado dos poços e foram adicionados os derivados tiazolidínicos (GQ103, GQ106, GQ138, GQ140, JB3, JB11 e JB13) e a cloroquina, nas respectivas doses: 30, 300, 40, 300, 50, 250, 50 e 100µM. As placas foram mantidas em estufa de CO₂ 5% à 37°C por 48 e 72 horas. Após esse período os sobrenadantes foram coletados e armazenados à -80°C para posterior extração de RNA.

Extração de RNA viral

O RNA viral dos sobrenadantes foram extraídos utilizando o kit QIAMP RNA (QIAGEN), seguindo as instruções do fabricante. O RNA extraído foi armazenado a -80°C para posterior ensaio de RT-qPCR.

Multiplex RT-qPCR para ZIKA

As amostras foram analisadas em duplicata, incluindo os controles negativo e positivo. Por se tratar de PCR Multiplex dois conjuntos de primers e sondas foram usados numa mesma reação. Sendo, um conjunto de primers/sondas marcada com fluoróforo HEX para detecção de ZIKV. Em um tubo tipo eppendorff foi montado o mastermix contendo todos os componentes da reação, EXCETO Amostra RNA, de acordo com as instruções do fabricante.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio de Citotoxicidade dos derivados tiazolidínicos em células VERO

Foram realizados 3 experimentos independentes. Os derivados TZDs apresentaram os valores de IC₅₀ correspondentes: GQ103 (30µM), GQ106 (300µM), GQ138 (40µM), GQ140 (300µM), JB3 (50µM), JB11 (250µM), JB13 (50µM) e Cloroquina (100µM). (Figura 1).

Figura 1 – Ensaio de MTT para avaliar a citotoxicidade dos derivados TZDs. Os compostos foram usados nas doses de 10, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 μ M. A cloroquina foi testada nas doses de 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 e 100 μ M.

Conforme mostra a figura 1, os derivados e cloroquina foram testados através do ensaio de MTT, afim de avaliar a citotoxicidade desses sobre as células VERO. Após o ensaio foram calculados os respectivos IC₅₀, utilizando o programa OriginPro 8.

Carga Viral

O ensaio de RT-qPCR foi realizado afim de, avaliar a carga viral dos derivados TZDs e cloroquina sobre as células VERO infectadas com o ZIKV.

Figura 2 – Ensaio de RT-qPCR. Cópias de RNA viral, após tratamento com os derivados e cloroquina e suas determinadas doses.

Conforme mostra a figura 2, a carga viral foi avaliada pelo ensaio de RT-qPCR. A partir do IC₅₀ obtido através do ensaio de MTT, as doses dos derivados e da cloroquina foram selecionadas e testadas para avaliar se esses seriam capazes de reduzir o número de cópias virais com 48 e 72 horas de tratamento após a infecção. Todos os compostos reduziram o número de cópias virais com 48 horas de tratamento, tendo um aumento com 72 horas. Isso nos mostra que os derivados têm a capacidade de diminuir a replicação viral nos estágios iniciais da infecção. O composto GQ140 na dose de 300 μ M, teve uma ação antiviral melhor do que a cloroquina no tempo de 48 horas. O derivado JB3 na dose de 50 μ M, chama atenção

por reduzir a carga viral quase que 20 vezes mais, do que a cloroquina na dose de 100 μ M nos tempos de 48 e 72 horas de tratamento.

4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, observamos que os derivados GQ140 e JB3 parecem ser promissores agentes contra o ZIKV. Mais estudos precisam ser realizados afim de, comprovar tal ação.

5. REFERÊNCIAS

ALIOTA, M. T.; PEINADO, S. A.; OSORIO, J. E.; BARTHOLOMAY, L. C. *Culex pipiens* and *Aedes triseriatus* Mosquito Susceptibility to Zika Virus. *Emerg Infect Dis.*, v. 22, n. 10, 2016.

CUZZOCREA, S.; PISANO, B.; DUGO, L.; IANARO, A.; MAFFIA, P.; PATEL, N. S.; DI PAOLA, R.; IALENTI, A.; GENOVESE, T.; CHATTERJEE, P. K.; DI ROSA, M.; CAPUTI, A. P.; THIEMERMANN, C. Rosiglitazone, a ligando f the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, reduces acute inflammation. *Eur J Pharmacol*, v. 483, n. 1, p. 79-93, 2004.

FRÖHLICH, E.; WAHL, R. Chemotherapy and Chemoprevention by Thiazolidinediones. *BioMed Research International.*, p.14, 2015.

JADAV, S. S.; SINHA, B. N.; HILGENFELD, R.; PASTORINO, B.; LAMBALLERIE, X.; JAYAPRAKASH, V. Thiazolidone derivatives as inhibitors of chikungunya virus. *European Journal of Medicinal Chemistry.*, v. 89, p. 172-178, 2015.

JIANG, C.; TING, A. T.; SEED, B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*, v. 391(6662), p. 82-6, 1998.

MANVAR, D.; KÜÇÜKGÜZEL, I.; ERENŞOY, G.; TATAR, E.; DERYABASOGULLAR, G.; REDDY, H.; TALELE, T. T.; CEVIK, O.; KAUSHIK-BASU, N. Discovery of conjugated thiazolidinone-thiadiazole scaffold as anti-dengue virus polymerase inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, p. 743-747, 2015.

MARX, N.; FROELICH, J.; SIAM, L.; ITTNER, J.; WIERSE, G.; SCHMIDT, A.; SCHARNAGL, H.; HOMBACH, V.; KOENIG, W. Antidiabetic PPAR γ -activator rosiglitazone reduces MMP-9 serum levels in type 2 diabetic patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, v. 23, p. 283–288, 2003.

NITSCHKE, C.; SCHREIER, V. N.; BEHNAM, M. A.; KUMAR, A.; BARTENSCHLAGER, R.; KLEIN, C. D. Thiazolidinone-peptide hybrids as dengue virus protease inhibitors with antiviral activity in cell culture. *J Med Chem.*, v. 56, n. 21, p. 8389-403, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Zika situation report, 30. Disponível em: <<http://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/30-june-2016/en/>> Acesso em 04/07/2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Disponível em: <<http://www.who.int/csr/research-and-development/zika-rd-pipeline.pdf>> Acesso em 04 de julho de 2016.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE / ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Zika - Epidemiological Report Brazil. June 2016. Washington, D.C.: OPAS/OMS, 2016.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE (OPAS). 2015. Epidemiological update. Zika virus infection. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_doc_view&Itemid=270&gid=32021&lang=en>. Acesso em: 03 de julho de 2016.