

2.12.99 – Microbiologia.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DA PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS CONTRA O VÍRUS CHIKUNGUNYA EM FIBROBLASTOS SINOVIAIS HUMANOS *IN VITRO*

Grazielle L. Coelho^{1*}, Stephannie J. M. de Souza², Jamile Taniele-Silva³, Elane C. dos Santos², João Pedro M. Cavalcante², Káthia D. Galvão⁴, Júlia de A. Brandão⁵, Ticiano G. do Nascimento⁶, Leticia Anderson⁷, Ênio J. Bassi⁸

1. Estudante do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da UFAL (ICBS-UFAL)
2. Estudante do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF-UFAL)
3. Estudante do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS-UFAL)
4. Estudante do Instituto de Ciências Farmacêuticas da UFAL (ICF-UFAL)
5. Estudante do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM-UFAL)
6. Professor do Instituto de Ciências Farmacêuticas da UFAL (ICF-UFAL)
7. Professora do Centro Universitário CESMAC
8. Professor do ICBS-UFAL – Setor de Imunologia e Virologia/Orientador

Resumo

O vírus Chikungunya (CHIKV) causa uma infecção caracterizada por uma artralgia que pode persistir por meses até anos para qual ainda não há antivirais específicos para o seu tratamento. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiviral da Própolis Vermelha de Alagoas (PVA) contra o CHIKV em fibroblastos sinoviais humanos (HFLS) *in vitro*. Inicialmente, a concentração máxima não tóxica (CMNT) do extrato hidroalcolólico (EH) da PVA para os HFLS foi determinada (=100 µg/ml). Na avaliação da atividade antiviral, onde os HFLS foram infectados com o CHIKV e tratados por 48h, detectou-se uma inibição viral de 61,46 e 37,24% nas concentrações de 100 e 50 µg/ml de PVA. Além disso, a atividade antiviral foi confirmada por citometria de fluxo intracelular, onde o tratamento com EH da PVA reduziu a percentagem de HFLS positivos para o CHIKV de 48,95% (não tratado) para 5,7% (tratamento = 100 µg/ml). Assim, a PVA apresentou uma promissora atividade antiviral contra o CHIKV *in vitro*.

Autorização legal: Não se aplica.

Palavras-chave: Antivirais; Arbovirose; Alfavírus.

Apoio financeiro: CNPq; UFAL; FAPEAL.

Trabalho selecionado para a JNIC: UFAL.

Introdução

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um alfavírus artrítogênico pertencente à família Togaviridae, que causa uma doença febril aguda que pode evoluir para uma fase crônica cujo principal sintoma é uma poliartralgia que pode persistir por meses ou anos (VAN AALST et al., 2017). Estudos prévios observaram que fibroblastos dermais e sinoviais, monócitos e células dendríticas podem ser infectados por este vírus (PHUKLIA et al., 2013; SOURISSEAU et al., 2007).

Os fibroblastos sinoviais são células constituintes da membrana sinovial, sendo responsáveis pela manutenção da homeostase articular, e em casos patológicos, participam da modulação da inflamação, através da secreção de citocinas (BARTOK; FIRESTEIN, 2010). Sabe-se que fibroblastos sinoviais são susceptíveis à infecção pelo CHIKV (PHUKLIA et al., 2013; SUKKAEW et al., 2018) podendo estar relacionados ao processo patogênico da infecção pelo CHIKV. No entanto, os mecanismos envolvidos na interação vírus-célula hospedeira e o desenvolvimento da síndrome reumática crônica ainda não foram completamente elucidados.

Apesar de ser um grande problema de saúde pública, ainda não existem antivirais específicos para o CHIKV licenciados para o tratamento desta arbovirose. Assim, estudos que busquem a descoberta de novos agentes biológicos com atividade antiviral contra este vírus são de extrema importância, destacando-se os compostos de origem natural, como a própolis.

A Própolis Vermelha de Alagoas (PVA) é uma resina natural produzida por abelhas *Apis mellifera* através do exudato de plantas *Dalbergia ecastophyllum*, que apresenta diversas atividades biológicas como bactericida, anti-fúngica, anti-oxidante e antiviral (BUENO-SILVA et al., 2016; ORSI et al., 2017; REGUEIRA et al., 2017; SILVA-BELTRÁN et al., 2020). Assim, diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antiviral do extrato hidroalcolólico (EH) da PVA contra o CHIKV em fibroblastos sinoviais humanos (HFLS, do inglês "*human fibroblast-like synoviocytes*) *in vitro*.

Metodologia

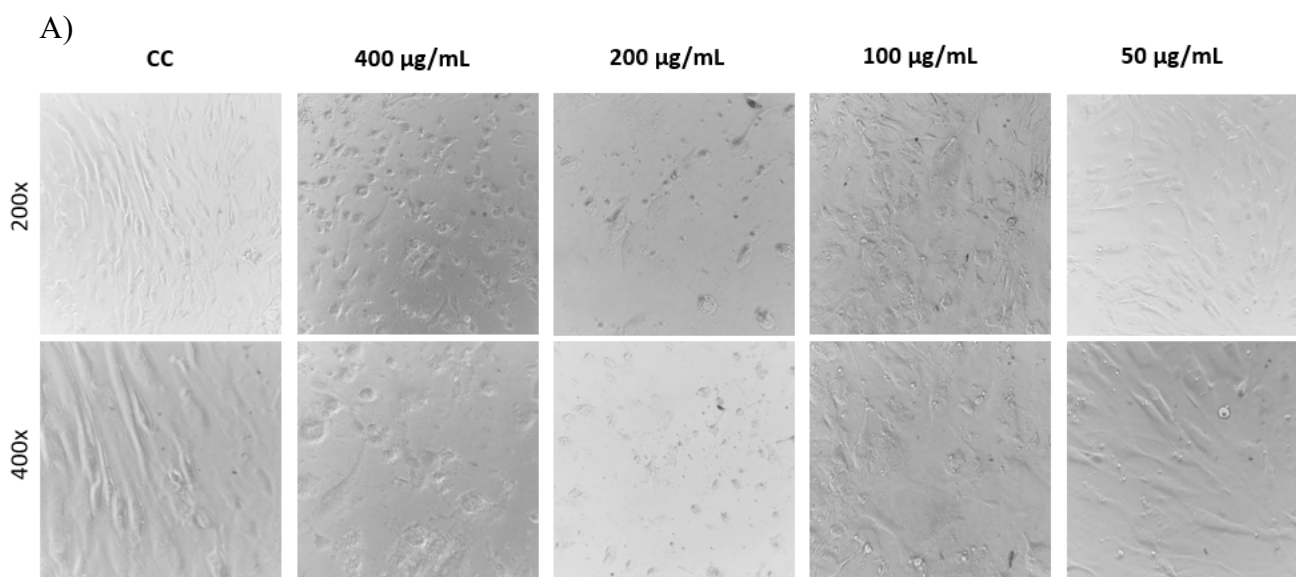
O extrato hidroalcoólico da PVA foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento (ICF/UFAL). Para a determinação da concentração máxima não tóxica (CMNT), foi realizado um ensaio de citotoxicidade por colorimetria, onde o EH da PVA foi diluído em meio de cultivo DMEM Low 10% SFB, 1% PSA e 1% L-Glutamina, adicionado na monocamada de HFLS (Cell Applications, Inc.), em concentrações de 3,1 a 400 µg/ml, seguido de incubação por 48h, a 37°C e 5% CO₂. Após esse período, foi adicionada uma solução de MTT (Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazólio, Sigma-Aldrich) na monocamada celular seguido de incubação por 3h. Ao fim do período de incubação, o sobrenadante foi removido e adicionado dimetil-sulfóxido (DMSO) por 15 minutos, para solubilização dos cristais de formazan. Em seguida, a absorbância de cada poço foi mensurada através do leitor de microplaca TP Reader (ThermoPlate®), no comprimento de onda de 492 nm. Com os dados de absorbância, foram determinadas as viabilidades celulares de cada concentração testada, a CMNT e a CC50 (concentração testada na qual obtém-se 50% de viabilidade celular).

Após determinação da CMNT, foram realizados ensaios de pós-tratamento, que consistem na infecção do CHIKV (MOI 0.5) nas monocamadas confluentes de HFLS, com adsorção durante 2h. Após o período de adsorção, o sobrenadante foi removido e a monocamada foi lavada com tampão fosfato (PBS). O EH diluído de forma seriada a partir da CMNT foi adicionado à monocamada de HFLS e incubado por 48h. Ao fim desse período, a viabilidade celular foi obtida através da técnica de MTT, conforme realizado no ensaio de citotoxicidade, para o cálculo da porcentagem de inibição viral.

A análise da porcentagem de células infectadas pelo CHIKV *in vitro* após o tratamento com o EH da PVA foi determinada por citometria de fluxo intracelular. Assim, 48h após o tratamento, as células foram fixadas e permeabilizadas utilizando-se os tampões do kit BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences) de acordo com recomendações do fabricante. Posteriormente, as células foram submetidas a marcação intracelular com o anticorpo monoclonal anti-CHIKV (Thermo Scientific) durante 1h a 4°C, seguido de incubação com um anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado ao AlexaFluor 488 (Molecular Probes) por 1h a 4°C. A aquisição das amostras foi realizada no citômetro de fluxo BD FACSCanto II. Os dados obtidos foram analisados através do software FlowJo para determinação da porcentagem de células positivas para o CHIKV. As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 6 sendo aplicado o teste t Student ou ANOVA sendo o $p \leq 0,05$ considerado significativo.

Resultados e Discussão

Buscando-se avaliar a atividade antiviral da PVA em fibroblatos sinoviais infectados com CHIKV, primeiramente foi avaliado a citotoxicidade deste extrato de origem natural em células HFLS. Inicialmente, os ensaios de citotoxicidade mostraram que o EH da PVA foi citotóxico nas concentrações de 400 e 200 µg/ml para as células HFLS, onde observou-se, através de microscopia óptica, a mudança da morfologia celular alongada e fusiforme (ROSENGREN; BOYLE; FIRESTEIN, 2007) para células arredondadas, sendo parte das células desprendidas da superfície de cultivo (Figura 1A). Este resultado foi confirmado pelo ensaio de citotoxicidade por MTT, onde as concentrações de 400 e 200µg/ml do EH da PVA diminuíram a viabilidade celular (Figura 1B).



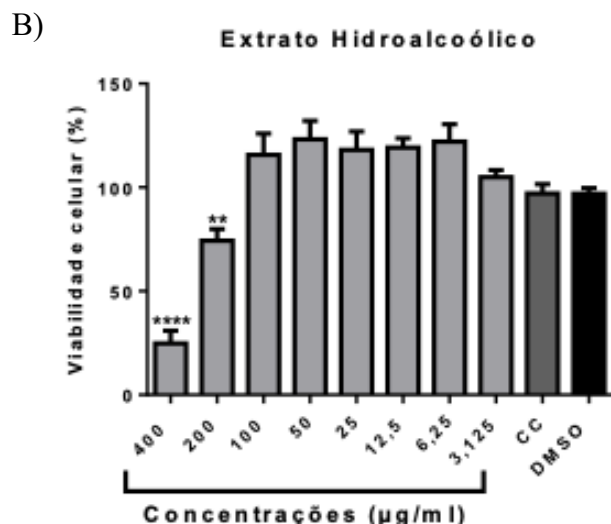


Figura 1. Ensaio de citotoxicidade do extrato hidroalcoólico da PVA em HFLS após 48h. A) Visualização das alterações morfológicas celulares por microscopia óptica. Alterações morfológicas evidentes podem ser visualizadas nas maiores concentrações testadas. B) Gráfico representativo de análise da média das percentagens de viabilidade celular \pm SEM avaliada por ensaio de citotoxicidade por MTT (** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$ vs. controle DMSO).

A CMNT obtida para o EH da PVA em HFLS foi de 100 $\mu\text{g/ml}$. Em um estudo prévio, verificou-se que a CMNT de um extrato de PVA em células de rim de macaco (Vero E6) foi 125 $\mu\text{g/ml}$ (SIMONI et al., 2018), corroborando assim, com o resultado obtido no presente estudo. A análise de regressão não linear utilizando os valores obtidos no ensaio de citotoxicidade, apontou o valor de CC50 de 218,5 $\mu\text{g/ml}$.

Estudos prévios mostraram que os HFLS são infectados pelo CHIKV e com isso podem ter um papel no processo da artralgia (PHUKLIA et al., 2013; SUKKAEW et al., 2018). Assim, no presente estudo os HFLS foram utilizados para avaliação da atividade antiviral da PVA contra o CHIKV *in vitro*. Por meio de análise por microscopia óptica foi possível observar o efeito citopático nos HFLS decorrente da infecção viral (Figura 2A). No ensaio de pós-tratamento, a PVA nas concentrações de 100 $\mu\text{g/ml}$ e 50 $\mu\text{g/ml}$ reduziu o efeito citopático viral dos HFLS (Figura 2A). Além disso, o ensaio de citotoxicidade por MTT mostrou uma inibição viral significativa de 61,46 e 37,24% detectada nas concentrações de 100 e 50 $\mu\text{g/ml}$ de PVA, respectivamente (Figura 2B).

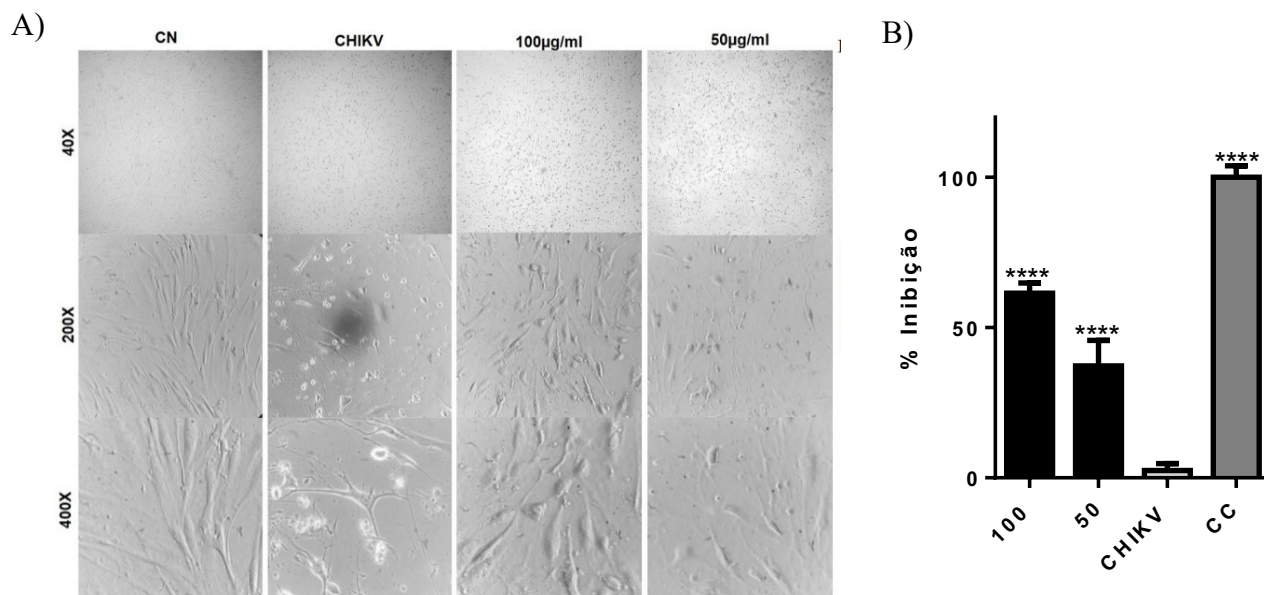


Figura 2. Avaliação da atividade antiviral do EH da PVA contra o CHIKV em HFLS *in vitro*. Os HFLS foram infectados com CHIKV MOI 0,5 no período de adsorção de 2h e incubados por 48h com as respectivas concentrações (100 e 50 $\mu\text{g/ml}$) do EH da PVA. A) Microscopia óptica demonstrando a redução do efeito citopático viral após tratamento com a PVA. (Magnitude: 40x, 200x e 400x). B) Gráfico representativo de análise da média das percentagens de inibição \pm SEM avaliada por ensaio de citotoxicidade por MTT (**** $p \leq 0,0001$ vs. controle não tratado/CHIKV).

A atividade antiviral observada no ensaio de citotoxicidade foi confirmada detectando-se a percentagem de células infectadas pelo CHIKV em análise de citometria de fluxo intracelular. Os dados mostraram que 48,95% dos HFLS (Figura 3) estavam infectados pelo CHIKV, e quando tratados com 100 $\mu\text{g/ml}$ do EH da PVA houve uma redução significativa de infecção viral, apresentando somente 5,70% das células positivas para a marcação viral intracelular.

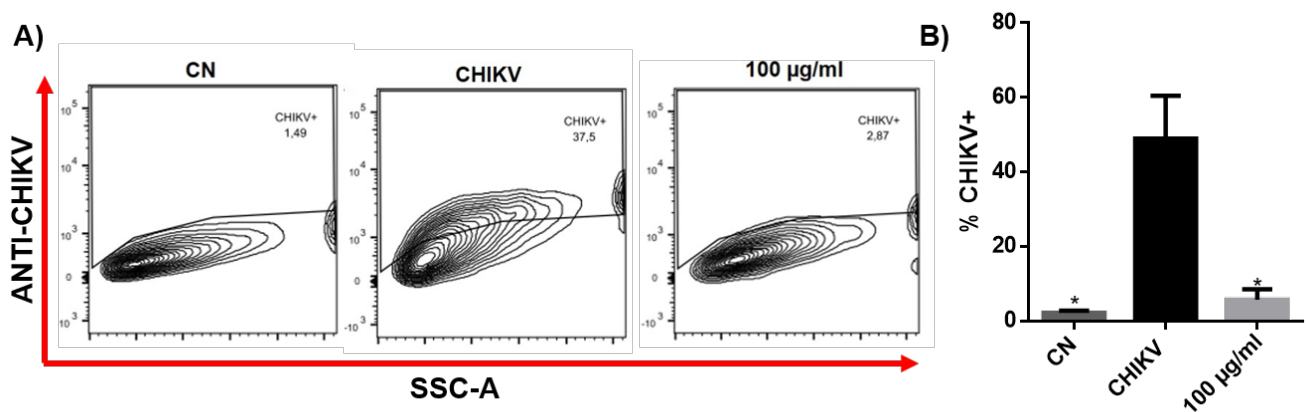


Figura 3. Citometria de fluxo da atividade antiviral da Própolis Vermelha de Alagoas em fibroblastos sinoviais humanos (HFLS). Os HFLS foram infectados com CHIKV MOI 0,5 e incubados por 48h com 100 µg/ml do extrato hidroalcoólico da PVA. A) Gráfico representativo da análise da citometria de fluxo com marcação intracelular anti-CHIKV demonstrando a redução na porcentagem de células positivas. B) Gráfico representativo da média das porcentagens de células infectadas \pm SEM (* $p \leq 0,05$ vs. controle não tratado/CHIKV).

Apesar de não haver estudos que descrevam a atividade da PVA contra o CHIKV, a eficácia antiviral da PVA foi descrita anteriormente contra outros vírus, como os herpesvirus suíno, bovino e equino (SIMONI et al., 2018). Além disso, a avaliação da composição da PVA demonstrou a presença do flavonóide naringenina (FREIRES; DE ALENCAR; ROSALEN, 2016), que foi descrita como promissor antiviral contra o CHIKV *in vitro* (AHMADI et al., 2016).

Conclusões

Em conclusão, uma promissora atividade antiviral da PVA contra o CHIKV foi detectada *in vitro* utilizando como modelo experimental a infecção de fibroblastos sinoviais humanos (HFLS). Estudos posteriores serão realizados para elucidar as moléculas bioativas presentes na PVA com atividade antiviral e o mecanismo de ação envolvido, contribuindo assim para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos de origem natural para esta arbovirose.

Referências bibliográficas

- AHMADI, Azin et al. Inhibition of chikungunya virus replication by hesperetin and naringenin. **RSC Advances** v. 6, n. 73, p. 69421–69430, 2016.
- BARTOK, Beatrix; FIRESTEIN, Gary S. *Fibroblast-like synoviocytes: Key effector cells in rheumatoid arthritis*. **Immunological Reviews**, 2010.
- BUENO-SILVA, Bruno et al. Main pathways of action of Brazilian red propolis on the modulation of neutrophils migration in the inflammatory process. **Phytomedicine** v. 23, n. 13, p. 1583–1590, 2016.
- FREIRES, Irlan Almeida; DE ALENCAR, Severino Matias; ROSALEN, Pedro Luiz. *A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2016.
- ORSI, RICARDO O. et al. Activity of Brazilian propolis against *Aeromonas hydrophila* and its effect on Nile tilapia growth, hematological and non-specific immune response under bacterial infection. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** v. 89, n. 3, p. 1785–1799, set. 2017.
- PHUKLIA, Weerawat et al. Osteoclastogenesis induced by CHIKV-infected fibroblast-like synoviocytes: A possible interplay between synoviocytes and monocytes/macrophages in CHIKV-induced arthralgia/arthritis. **Virus Research**, 2013.
- REGUEIRA, M.S. et al. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. **Food and Chemical Toxicology** v. 107, p. 572–580, set. 2017.
- ROSENGREN, Sanna; BOYLE, David L.; FIRESTEIN, Gary S. *Acquisition, Culture, and Phenotyping of Synovial Fibroblasts*. **Arthritis Research**. New Jersey: Humana Press, 2007. 135 v. p. 365–376.
- SILVA-BELTRÁN, Norma Patricia et al. Antiviral effects of Brazilian green and red propolis extracts on Enterovirus surrogates. **Environmental Science and Pollution Research** v. 27, n. 23, p. 28510–28517, ago. 2020.
- SIMONI, Isabela Cristina et al. In vitro antiviral activity of propolis and *Baccharis* sp. extracts on animal herpesviruses. **Arquivos do Instituto Biológico** v. 85, n. 0, ago. 2018.
- SOURISSEAU, Marion et al. Characterization of reemerging chikungunya virus. **PLoS Pathogens** v. 3, n. 6, p. 0804–0817, 2007.
- SUKKAEW, Apamas et al. Heterogeneity of clinical isolates of chikungunya virus and its impact on the responses of primary human fibroblast-like synoviocytes. **Journal of General Virology** v. 99, p. 525–535, 2018.
- VAN AALST, Mariëlle et al. Long-term sequelae of chikungunya virus disease: A systematic review. **Travel Medicine and Infectious Disease** v. 15, p. 8–22, 2017.