

PUCRS

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

MARGARITA ALEXANDRA PEÑA CORTÉS

**ANÁLISE DA CAPACIDADE ANTIVIRAL DE AZOESTILBENOIDES
FRENTE AO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO**

Porto Alegre
2017

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Margarita Alexandra P. Cortés

**ANÁLISE DA CAPACIDADE ANTIVIRAL DE AZOESTILBENOIDES
FRENTE AO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO**

Porto Alegre
2017

Margarita Alexandra P. Cortés

**ANÁLISE DA CAPACIDADE ANTIVIRAL DE AZOESTILBENOIDES
FRENTE AO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Dr. André Arigony Souto

Porto Alegre

2017

Ficha Catalográfica

C831a Cortés, Margarita Alexandra Peña

Análise da capacidade antiviral de azoestilbenoides frente ao vírus sincicial respiratório / Margarita Alexandra Peña Cortés . – 2017.

73 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. André Arigony Souto.

1. Azo compostos. 2. Vírus sincicial respiratório. 3. Atividade antiviral. 4. Doença do trato respiratório inferior. 5. Câncer de pulmão. I. Souto, André Arigony. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363

Margarita Alexandra P. Cortés

**ANÁLISE DA CAPACIDADE ANTIVIRAL DE AZOESTILBENOIDES
FRENTE AO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a Alessandra Hubner de Souza – ULBRA Canoas

Prof^a. Dr^a Ana Paula Duarte de Souza - PUCRS

Prof^a. Dr^a Fernanda Bueno Morrone - PUCRS

À minha avó Margarita Reyes (in memoriam) que me ensinou a temperar a vida com sabedoria.

À Maria Teresa e Juan Bautista por acreditarem que nunca é tarde para novos desafios.

Aos meus irmãos, Olga Nancy e João Francisco, pelo amor fraterno e companheirismo incondicional.

À todos aqueles que mesmo distantes estão presentes nos momentos decisivos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. André Arigony Souto, por me incentivar a trilhar este caminho mesmo antes de pensar em percorrê-lo. Suas provocações construtivas foram fundamentais neste processo.

Aos meus colegas de laboratório e companheiros nos momentos de alegria, angústia e descoberta, Priscylla Volkart, Vladimir da Luz, Bruno Adami e Juliana Baesso. Sem vocês este período não teria tantas histórias a serem contadas. À Karen Magnus pela amizade e disponibilidade em transmitir seus conhecimentos. MUITO OBRIGADA pela parceria e incentivo constante.

À Prof.^a Dr.^a Bárbara Nery Porto que abriu as portas do seu laboratório permitindo a realização deste trabalho. Aos colegas do laboratório 31- IPB, Krist, Deise, Gabriela, Leonardo, Magáli, Stéfanie, Tiago Fazolo, Rodrigo Gassen e Géssica obrigada pelos momentos de aprendizagem. À todos os colegas do IPB que nas horas do cafezinho proporcionaram momentos filosóficos e de muitas risadas.

Aos meus colegas de curso que de uma forma especial e única contribuíram para tornar esta jornada inesquecível, Fernanda Subtil, Henrique Dias, Elisa Feller da Silva, Pedro Vargas e Jéssica Soares. Ao PPGBCM, à coordenação e ao corpo docente pela oportunidade da convivência em um ambiente acolhedor. À Zingara, uma grande incentivadora ao longo deste caminho.

Às professoras Dr.^a Fernanda Morrone, Dr.^a Ana Paula Duarte e Dr.^a Alessandra Hubner agradeço pelas contribuições pertinentes que enriqueceram ainda mais este trabalho.

Aos grandes amigos Maria Vilda, Mario, Bruna e Camilo por compreenderem as horas de ausência e a falta dos encontros gastronômicos.

Às minhas amigas do coração Laura Freitas, Bruna Spohr e Cristina Bordignon, obrigada por estarem sempre presentes e por entenderem a minha ausência nos nossos encontros.

Nestes dois últimos anos conheci grandes nutricionistas e mulheres maravilhosas que com seu carinho e apoio os momentos mais difíceis desta jornada se tornaram leves e alegres: Patricia, Nathamy, Neiva e Suelen meu MUITO OBRIGADA, gurías!!!

Palavras não são suficientes para expressar meu enorme agradecimento à meus pais Maria Teresa e Juan Bautista e aos meus irmãos Olga Nancy e João Francisco pelo apoio incondicional e pela alegria de viver. Minha gratidão eterna por existirem e serem quem são.

“Caminante, son tus huellas el camino y nada más; caminante, no hay camino, se hace camino al andar. Al andar se hace camino, y al volver la vista atrás se ve la senda que nunca se há de volver a pisar. Caminante, no hay camino, si no estelas em la mar.”

Antonio Machado

“Que é, pois, o tempo? Quem poderá explicá-lo clara e brevemente? Quem o poderá apreender, mesmo só com o pensamento, para depois nos traduzir por palavras o seu conceito? E que assunto mais familiar e mais batido nas nossas conversas do que o tempo? Quando dele falamos, compreendemos o que dizemos. Compreendemos também o que nos dizem quando dele nos falam. O que é, por conseguinte, o tempo? Se ninguém me perguntar, eu sei; se o quiser explicar a quem me fizer a pergunta, já não sei.”

Santo Agostinho (354-430 d.C.)

RESUMO

O vírus sincicial respiratório (VSR) é um agente viral altamente contagioso e o mais comum nas doenças respiratórias do trato inferior sendo uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em crianças, idosos e imunodeprimidos. O tratamento inclui terapia de suporte e ribavirina. Contudo, as terapias antivirais são caras, difíceis de administrar e não são comprovadamente eficazes. O objetivo deste estudo foi investigar *in vitro* a atividade antiviral de três azocompostos sintetizados a partir da alteração estrutural do estilbeno modificado do resveratrol em células MRC-5 e A549 frente à infecção pelo VSR. Foram avaliados o efeito sobre a viabilidade celular, a concentração inibitória, a redução do efeito citopático e o efeito virucida dos compostos REDRESV 01, REDRESV 02 e REDRESV 03 utilizando-se a técnica de MTT. Os dados mostraram que REDRESV 01 é mais citotóxico para as duas linhagens apresentando IC_{50} 58,6 μ M (MRC-5) e 17,43 μ M (A549). Por apresentarem valores de IC_{50} maiores seguiu-se o estudo apenas com os compostos REDRESV 02 (MRC-5 = 87,58 μ M e A549 = 40,73 μ M) e REDRESV 03 (MRC-5 = 150,1 μ M e A549 = 43,44 μ M). Os resultados indicaram que as baixas porcentagens de inibição da replicação viral pelos compostos testados não foram promissoras na pesquisa de novos fármacos antivirais uma vez que estes não foram capazes de manter um número significativamente viável de células durante a infecção. No entanto, no tratamento pós-infecção os compostos REDRESV 02 e REDRESV 03 mostraram seletividade na concentração de 20 μ M para a célula tumoral (A549) quando infectada. Os dois compostos diminuíram cerca de duas vezes mais a viabilidade da célula A549 infectada quando comparados com o controle viral. Os compostos também mostraram um possível efeito virucida o que pode ser um indicativo que além destes terem um efeito citotóxico para as células tumorais eles ainda podem inativar as partículas circulantes quando estas células estiverem infectadas. Apesar dos compostos terem apresentado resultados promissores para o tratamento de pacientes oncológicos infectados com VSR novos estudos devem ser realizados para investigar outros tipos de vírus e outros tipos de câncer, bem como, os mecanismos envolvidos nesse processo.

Palavras-chave: Azo compostos. Vírus sincicial respiratório. Atividade antiviral. Doença do trato respiratório inferior. Câncer de pulmão.

ABSTRACT

Respiratory syncytial virus (RSV) is a highly contagious viral agent and the most common respiratory diseases of lower tract being one of the major causes of morbidity and mortality in children, elderly and immunocompromised. Treatment includes supportive therapy and ribavirin. However, antiviral therapies are expensive, difficult to administer and are not proven to be effective. The aim of this study was to investigate *in vitro* the antiviral activity of three azo compounds synthesized from the structural alteration of the modified resveratrol stilbene in MRC-5 and A549 cells against RSV infection. The effect of compounds REDRESV 01, REDRESV 02 and REDRESV 03 on cell viability, inhibitory concentration, cytopathic reduction activity and virucidal activity were evaluated by MTT assay. Data showed that REDRESV 01 is cytotoxic for both cell lines showing IC₅₀ 58.6µM (MRC-5) and 17.43µM (A549). The study was followed only with the compounds REDRESV 02 (MRC-5 = 87.58µM and A549 = 40.73µM) and REDRESV 03 (MRC-5 = 150.1µM and A549 = 43.44µM) because of the higher IC₅₀ values. Data indicated that the low percentages of inhibition on viral replication were not promising in the search for new antiviral drugs since compounds tested were not able to maintain a significantly viable number of cells during infection. However, in post-infection treatment REDRESV 02 and REDRESV 03 showed selectivity at concentration of 20 µM for the tumor cell (A549) when infected. Both compounds decreased viability twice of the infected A549 cell as compared to the viral control. Compounds also showed a possible virucidal activity which may indicate besides having a cytotoxic effect on tumor cells they may still inactivate the circulating particles when cells are infected. Although the compounds have shown promising results for the treatment of cancer patients infected with RSV new studies should be conducted to investigate other types of virus and other types of cancer, as well as the mechanisms involved in this process.

Keywords: Azo compounds. Respiratory syncytial virus. Antiviral activity. Lower respiratory tract disease. Lung cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura do Vírus Sincicial Respiratório Humano	17
Figura 2 - Organização Genômica do VSR, proteínas e suas funções	18
Figura 3 - Fusão do Vírus Sincicial Respiratório humano à célula hospedeira	20
Figura 4 - Estrutura geral do estilbenos	26
Figura 5 -Conformações isoméricas dos azobenzenos.....	27
Figura 6 - Novos azoestilbenoides sintetizados	28
Figura 7- Curva dose-resposta e cinética da concentração de MRC-5 e A549.....	36
Figura 8 - Curva dose-resposta da concentração do VSR em 72h	37
Figura 9 - Curva dose-resposta e cinética da concentração de Triton X-100.....	38
Figura 10 -Curva de viabilidade celular comparativa entre A549 e MRC-5.....	39
Figura 11 - Gráfico da viabilidade celular da Ribavirina	40
Figura 12 - Gráfico da atividade antiviral dos compostos- tratamento pré-infecção..	42
Figura 13 - Gráfico da atividade antiviral dos compostos - tratamento 0h.....	43
Figura 14 - Gráfico da atividade antiviral dos compostos - tratamento pós-infecção	44
Figura 15 - Gráfico da capacidade virucida dos compostos	45
Tabela 1 - Concentração inibitória e Índice de Seletividade dos compostos.....	41

LISTA DE SIGLAS

ACC - Agente da Coriza do Chimpanzé
APP - Academia Americana de Pediatria
BVA - Bronquiolite Viral Aguda
CEA - Células Epiteliais das Vias Aéreas
DEMEM - *Dulbecco modified Eagle's Minimal Essential Medium*
DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
DO – Densidade ótica
DTRI - Doenças do Trato Respiratórias Inferior
ECP- Efeito citopático
FDA - *Food and Drug Administration*
IRA - Infecção Respiratória Aguda
IS - Índice de Seletividade
MPVh - Metapneumovírus Humano
OMS – Organização Mundial da Saúde
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PFU - Unidade formadora de placa
QTD - Quantidade
RESV – Resveratrol
SFB - Soro Fetal Bovino
SUS – Sistema Único de Saúde
TCTH - Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas
TRI – Trato Respiratório Inferior
VSR - Vírus Sincicial Respiratório Humano
VPIh - Vírus da Parainfluenza Humana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO HUMANO	15
1.1.1 Estrutura e Organização Genômica do VSR	16
1.1.2 Mecanismo de Infecção do VSR	19
1.2 BRONQUIOLITE	21
1.3 PNEUMONIA	22
1.4 TRATAMENTOS PARA INFECÇÃO POR VSR	24
1.5 AZOESTILBENOIDES	26
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4 ARTIGO ORIGINAL	31
5 MATERIAIS E MÉTODOS	32
5.1 REAGENTES E COMPOSTOS	32
5.2 CULTIVO CELULAR	32
5.3 CULTIVO E TITULAÇÃO DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO	33
5.4 ENSAIO COLORIMÉTRICO - MTT	33
5.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR	33
5.6 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA (IC50) E ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)	34
5.7 AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DO EFEITO CITOPÁTICO	34
5.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO VIRUCIDA	35
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
6 RESULTADOS	36
6.1 PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO	36
6.1.1 Concetração das Linhagens Celulares MRC-5 e A549	36
6.1.2 Concetração do Vírus Sincicial Respiratório	37

6.1.3 Concentração do Triton X-100	37
6.2 Efeito na viabilidade celular dos azocompostos	38
6.3 Concentração Inibitória (IC50) e Índice de Seletividade dos compostos.....	40
6.4 Redução do efeito citopático	41
6.5 Efeito virucida dos compostos	44
7 DISCUSSÃO	46
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
ANEXO	62

1 INTRODUÇÃO

As infecções respiratórias são apontadas como a maior causa de mortalidade de crianças e adolescentes no mundo. Em 2013, foram registrados 7,7 milhões de óbitos de meninos e meninas até 19 anos. Dos quais, pelo menos 6,28 milhões de mortes ocorreram na primeira infância (0 a 5 anos), sendo as doenças do trato respiratório inferior (DTRI) a principal causa de óbito dessa população.^{1,2}

As DTRIs podem acometer indivíduos de todas as idades, no entanto, tornam-se graves principalmente em bebês prematuros e bebês com problemas de saúde subjacentes, adultos com doenças cardíacas e pulmonares, imunodeprimidos e idosos.^{3,4} Dentre elas, destacam-se a bronquiolite e a pneumonia como as responsáveis pelo aumento de consultas, internações hospitalares (particularmente em serviços de pediatria) e pelas causas de morte nos grupos de risco.⁴

No Brasil, em 2011, foram registrados 15,3 óbitos infantis por 1000 nascidos vivos, dos quais 5,3% foram causados por infecção respiratória aguda (IRA) em menores de 5 anos de idade.⁵ Em 2008, 5,2% de crianças menores de 5 anos morreram por infecções respiratórias na região sul do país.⁵

A incidência das IRAs variam de acordo com diversos fatores como condições ambientais, idade, histórico de tabagismo, estado nutricional, imunidade, condições clínicas individuais e características patogênicas, incluindo modos de transmissão, transmissibilidade, fatores de virulência e carga microbiana.^{3,7}

Devido ao poder de propagação rápida, as IRAs, continuam sendo consideradas uma emergência de saúde pública de preocupação internacional e foram incluídas, desde a década de 60, entre os três principais problemas de saúde pública da infância, junto com as doenças diarréicas e a desnutrição.^{4,8}

Na maioria das vezes as IRAs tem etiologia viral, mas em alguns casos a presença de bactérias pode estar associada, como é o caso da pneumonia. Entre os vírus presentes, principalmente nas DTRIs, destacam-se o vírus Sincicial Respiratório Humano (VSR), o vírus da Parainfluenza Humana (VPIh) I, II, e III, Influenza A e B, Adenovírus, e o Metapneumovírus Humano (MPVh).^{4,9,10}

1.1 VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO HUMANO

Em 1955, no *Walter Reed Army Institute of Research*, Washington DC - Estados Unidos, Morris e colaboradores isolaram pela primeira vez o VSR a partir de chimpanzés que apresentavam tosse, espirro e secreção nasal purulenta, sinais clínicos comuns a doenças respiratórias agudas. Diante disto, o agente isolado foi denominado Agente da Coriza do Chimpanzé (ACC).¹¹

Estudos realizados por Chanok e colaboradores e Chanok e Finberg, ambos em 1957, relataram o isolamento de um vírus semelhante em crianças que apresentavam DTRI severa. A partir de então, o nome ACC foi substituído por Vírus Sincicial Respiratório humano para designar sua origem humana, sua afinidade pelo trato respiratório e sua capacidade de produzir sincícios em cultura celular.¹¹

No Brasil, o vírus foi isolado pela primeira vez por Candeias (1967)¹² em crianças com quadro respiratório agudo, internadas no Hospital Infantil Menino Jesus na cidade de São Paulo. Desde então o VSR tem sido reconhecido mundialmente como o agente viral mais comum nas doenças respiratórias na infância e principal causa nos casos de bronquiolite e pneumonia em crianças menores de 1 ano de vida sendo o pico de incidência entre os 2 e 3 primeiros meses de vida.¹³⁻¹⁵

A sazonalidade do VSR depende da região e do clima, apresentando diferença entre o início e duração conforme as condições ambientais.¹⁶ Em zonas de clima temperado, o vírus circula durante o outono e inverno, em associação com temperaturas mais baixas e aumento da umidade.¹⁷

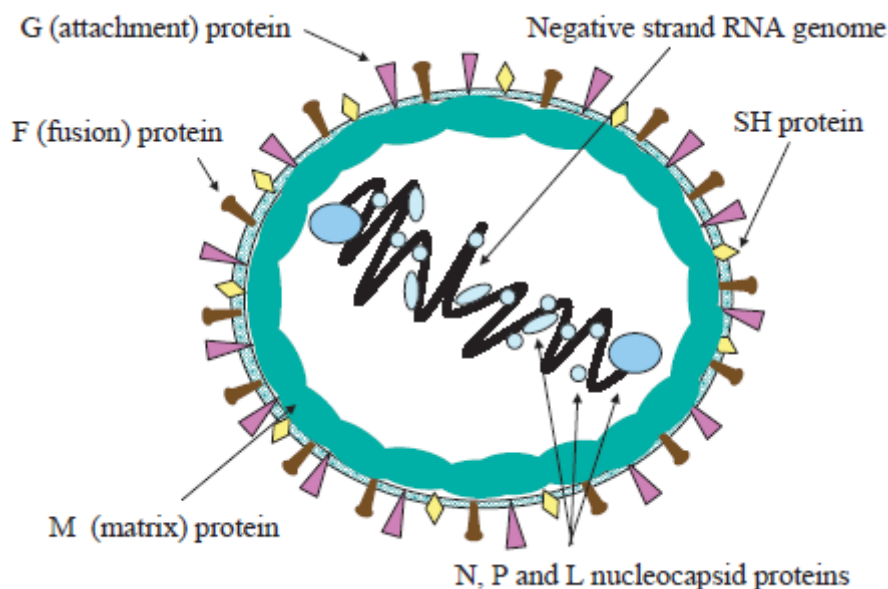
1.1.1 Estrutura e Organização Genômica do VSR

O Vírus Sincicial Respiratório humano é um *Pneumovírus* pertencente a família *Paramyxoviridae*. É um vírus envelopado, não segmentado dotado de genoma de RNA de fita simples de polaridade negativa processando a transcrição do seu genoma no sentido reverso (3'→5'). Contém 15.200 nucleotídeos e 10 genes que codificam 11 proteínas.¹⁸⁻²¹

As partículas virais são compostas por um nucleocapsídeo e por um envelope lipoprotéico, derivado da membrana plasmática da célula hospedeira. Sua superfície possui três glicoproteínas: a proteína de ligação ao receptor celular (G), a proteína de fusão (F) e a proteína hidrofóbica pequena (*small hydrofobic; SH*). As

glicoproteínas F e G estão intimamente relacionadas com a proteína de matriz (M) localizada na camada interna do envelope viral (Figura 1).^{18,20}

Figura 1 - Estrutura do Vírus Sincicial Respiratório Humano



Fonte: HACKING E HULL (2002)²⁰

Nota: As partículas virais do VSR consistem de um nucleocapsídeo dentro de um envelope lipídico. A bicamada lipídica é derivada da membrana plasmática do hospedeiro e contém glicoproteínas de superfície transmembrana.

São nove as proteínas estruturais que são codificadas pelo VSR, como segue: (i) proteína F, encontra-se inserida no envelope viral sendo responsável pela fusão, penetração e formação de sincícios, determinando desta forma características estreitamente associadas ao efeito citopático do vírus; (ii) proteína G, é responsável pela adesão do vírus à célula hospedeira; (iii) proteína SH, é uma proteína integral de membrana, inserida no envelope viral, hidrofóbica e viroporina que desempenha um papel importante na formação de canais de membrana facilitando desta forma a liberação das partículas virais²². Sua função ainda não está bem estabelecida, mas, estudos recentes tem sugerido que esta proteína tenha um efeito antiapoptótico^{23,24}; (iv) proteína M, é uma proteína de matriz; interna à partícula viral, tendo como função promover a associação do nucleocapsídeo com o envelope viral nascente²¹; (v) proteína M2, é uma proteína traduzida em duas proteínas, M2-1 e M2-2 que desempenham papel fundamental na modulação do ciclo de replicação do vírus. A proteína M2-1 integra o complexo proteico responsável pela transcrição do RNA do

VSR enquanto que a proteína M2-2 regula a passagem de transcrição para replicação do RNA viral^{21,24}; (vi) proteínas N, P e L são proteínas do nucleocapsídeo, responsáveis pela replicação do RNA viral. A proteína N forma o nucleocapsídeo sendo uma proteína estrutural essencial para o processo de transcrição; a proteína P é uma fosfoproteína que atua como chaperonina para a forma solúvel da proteína N e pode ser considerada um co-fator para a polimerase viral após sua fosforilação; a proteína L é a polimerase viral, componente do complexo RNA polimerase dependente de RNA.²⁵

O VSR codifica duas proteínas não estruturais e suas funções estão associadas ao mecanismo de evasão imune. Estudos recentes tem demonstrado que estas proteínas são capazes de inibir a apoptose prematura das células hospedeiras.²⁴

A organização genômica do VSR, suas proteínas e respectivas funções estão ilustradas na Figura 2:

Figura 2 - Organização Genômica do VSR, proteínas e suas funções

Genome	Protein	Function
3'		
NS1	NS1 } NS2 }	Non-structural proteins: anti-interferon α and β activity
NS2		
N	N	Nucleocapsid protein: Nucleoprotein essential for transcriptional activity
P	P	Nucleocapsid protein: Phosphoprotein essential for transcriptional activity
M		
SH	M	Matrix protein: viral assembly
G	SH	Small hydrophobic protein: function unknown
F	G	Glycoprotein: viral attachment to the cell
	F	Fusion protein: viral entry and syncytia formation
M2	M2	M2-1: transcription elongation factor M2-2: regulation of viral transcription
L	L	Nucleocapsid protein: RNA polymerase
5'		

Fonte: : HACKING E HULL (2002)²⁰

Nota: O VSR é dotado de um genoma de RNA de fita simples com 15.200 nucleotídeos e 10 genes que codificam 11 proteínas. A transcrição é iniciada a partir da extremidade 3' com apenas uma fração da polimerase passando para o gene seguinte. Isto cria um gradiente de atenuação de transcrição com a distância a partir do local de início da transcrição que reflete a abundância relativa requerida das proteínas codificadas.

1.1.2 Mecanismo de Infecção do VSR

O VSR é altamente contagioso e pode ser transmitido pelo contato direto ou indireto com secreções nasais ou orais de pessoas infectadas ou através do aerosol formado a partir de espirros e tosse que deixam gotículas virais no ar, ou através do contato com essas gotículas através do nariz, boca ou olhos. O período de incubação da doença é em média de 5 dias podendo persistir o quadro de infecção pelo período de uma a três semanas.²⁶

Estudos sugerem que o vírus pode permanecer em superfícies não porosas (ex: bancadas) por 6h, nas luvas de borracha por 90 minutos ou na pele por 20 minutos, justificando a higienização das mãos como a principal medida para evitar a transmissão do VSR além de evitar o contato com pessoas que estejam infectadas.^{27,28}

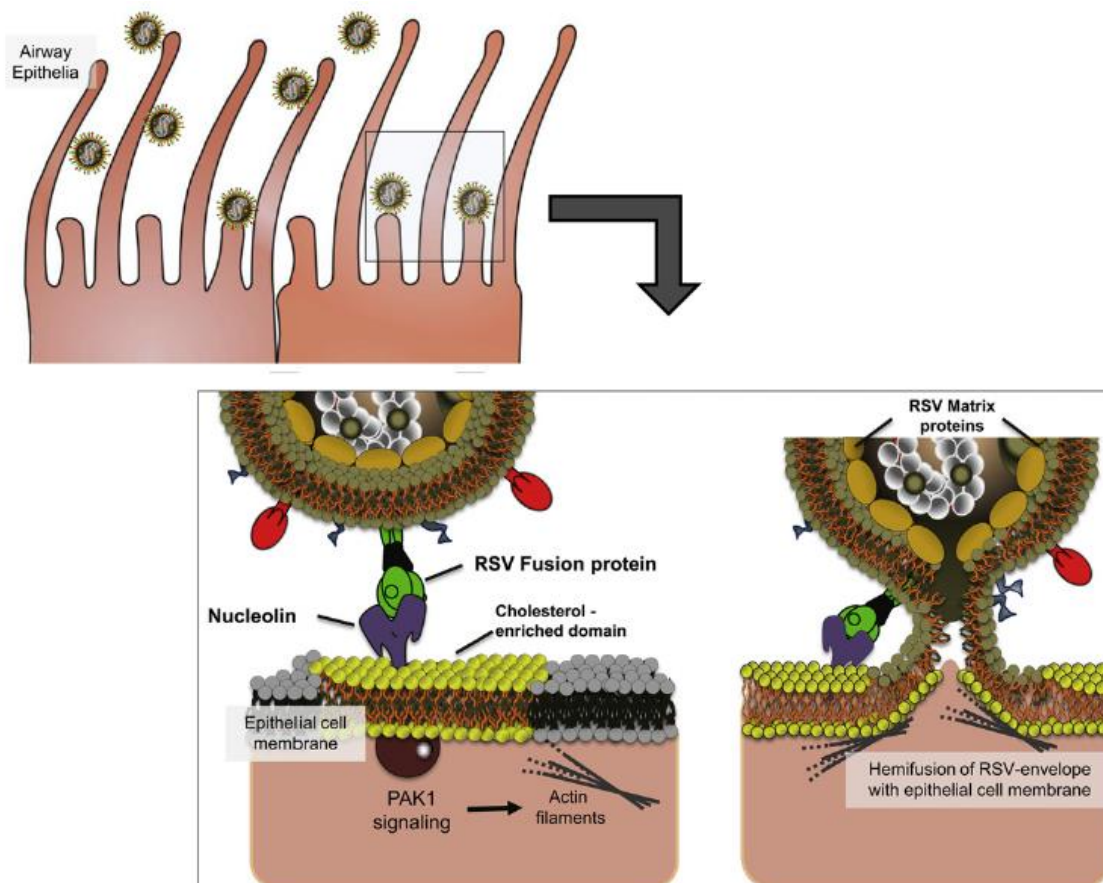
A infecção inicia pela multiplicação do vírus nas células epiteliais das vias aéreas (CEA) propagando-se até o trato respiratório inferior, provavelmente através de aspiração de secreções infectadas, mas pode se espalhar de célula a célula através da fusão de suas membranas, causando infecções respiratórias agudas (IRA) e ainda bronquiolite e pneumonia.²⁹ Além das CEAs, alguns estudos referem que outras células podem ser infectadas como é o caso dos macrófagos alveolares (MØA) e células denticricas.^{24, 30, 31}

A proteína G liga o vírus à CEA e este se funde com a membrana da célula e entra no citoplasma após a proteína M ser clivada por enzimas proteolíticas da célula infectada. Se o precursor não for clivado não ocorrerá nenhuma atividade de fusão, a penetração do virion não ocorrerá e a partícula de vírus é incapaz de iniciar a infecção. A fusão pela proteína ocorre em pH neutro do meio extracelular, permitindo a liberação do nucleocapsídeo viral diretamente para dentro da célula.³²

As proteínas F e G ligam-se primeiro ao sulfato de heparano da superfície celular e sulfato de condroitina B de CEAs. Esta ligação primária permite que a proteína F ligue-se com a nucleolina (receptor funcional do VRS na célula hospedeira)¹⁹ na membrana celular. Após essas interações desencadeia-se um sinal intracelular dependente de Pak-1, o citoesqueleto e os filamentos de actina então são reorganizados permitindo a fusão do envelope viral à membrana plasmática.

Desta forma, o VSR pode liberar seu material genético para o citoplasma da célula hospedeira (Figura 3) iniciando assim a replicação do material genético e a tradução de suas proteínas. Todo o processo de síntese ocorre no citoplasma da célula.¹⁹

Figura 3 - Fusão do Vírus Sincicial Respiratório humano à célula hospedeira



Fonte: Lay et al (2013)¹⁹

Nota: Inicialmente as proteínas F e G do VSR ligam-se ao sulfato de heparano de superfície celular e ao sulfato de condroitina B de células epiteliais de via aérea (CEA). Esta ligação primária permite que a proteína F se ligue à nucleolina, a qual está incorporada em microdomínios lipídicos ricos em colesterol nas microvilosidades e cílios primários da superfície apical das CEA. Estas interações desencadeiam um sinal dependente de Pak-1 ocorrendo a reorganização do citoesqueleto e dos filamentos de actina permitindo a fusão do envelope viral à membrana plasmática.

Uma vez que o RNA tenha sido replicado e a tradução das proteínas tenha ocorrido, estas são translocadas para a porção apical da célula para montagem da nova partícula viral. O envelope do vírus é formado pela membrana da célula hospedeira. A liberação do vírion ocorre por brotamento a partir de 12h pós-infecção (pico em 24h), permanecendo até a morte celular por esgotamento, o que pode variar de 30 a 48h.³³ A replicação do vírus resulta em destruição de células epiteliais (necrose), infiltração de células inflamatórias (macrófagos, eosinófilos, neutrófilos e

linfócitos T), edema broncoalveolar, produção excessiva de muco, e oclusão de algumas vias aéreas podendo levar a quadros de pneumonia e bronquiolite.³⁴⁻³⁶

Os métodos geralmente utilizados para a detecção do VSR são cultura de células, sorologia, imunofluorescência direta, testes imunocromatográficos, e amplificação do ácido nucléico através da técnica de *real time* PCR (qPCR), este último considerado padrão ouro. A detecção do VSR é realizada a partir do aspirado nasofaríngeo do paciente.^{37,38}

Pacientes imunocomprometidos e idosos frequentemente têm baixas concentrações virais além de poder apresentar secreção intermitente do vírus dependendo do grau de imunossupressão, no entanto, estes pacientes podem apresentar períodos mais longos de excreção viral.³⁹

1.2 BRONQUIOLITE

Definida como uma infecção respiratória aguda de etiologia viral, a bronquiolite, compromete as vias aéreas de pequeno calibre (bronquíolos) através de um processo inflamatório agudo culminando em um quadro respiratório obstrutivo de diferentes intensidades. É caracterizada pelo aumento de secreção de muco, edema e necrose do epitélio da mucosa, associada ou não a broncoespasmo, com sintomatologia de obstrução das vias aéreas inferiores.^{35, 40}

É a infecção de vias aéreas inferiores mais frequente nos dois primeiros anos de vida, sendo uma das principais causas de hospitalização de lactentes (0-2 anos) mundialmente. Geralmente ocorre nos meses de outono e inverno. Crianças menores de 6 meses ou que apresentem fatores de risco como história de prematuridade, baixo peso ao nascer, doença pulmonar crônica, cardiopatia congênita, malformação de vias aéreas superiores, síndrome de Down, fibrose cística e imunodeficiências estão sujeitos a desenvolver um quadro de bronquiolite severa levando a hospitalização e em alguns casos ao óbito.^{35,37,41}

O principal agente etiológico é o VSR embora outros vírus possam levar a essa condição, como o influenza vírus, metapneumovírus, bocavírus, rinovírus, adenovírus. Alguns casos podem apresentar presença de um ou mais vírus concomitantemente sem, no entanto, a coinfeção representar aumento na gravidade da doença.^{35,37,40,42} Os mecanismos envolvidos na severidade da bronquiolite causada pelo VSR ainda não estão totalmente esclarecidos. Recentes

estudos sugerem uma associação entre crianças que foram hospitalizadas com quadro de bronquiolite viral aguda por VSR severa com o desenvolvimento de asma e sensibilização a alergias após os sete anos de vida e até mesmo na idade adulta.^{43,44}

No Brasil, estudos demonstraram que dos 64% de pacientes hospitalizados com bronquiolite viral aguda (BVA) 31,9% apresentaram o vírus VSR como responsável e a co-infecção viral ocorreu em 40% dos casos de BVA sendo o rinovírus, o vírus, mais comum depois do VSR.^{45,46}

O diagnóstico da bronquiolite está baseado em dois aspectos principais: (i) achados clínicos após exame físico e avaliação da história clínica do paciente; (ii) etiologia da doença para evitar uso inadequado de antibióticos e redução do risco de infecção hospitalar.

O tratamento da doença é focado na terapia de suporte, independente da etiologia viral. Não existe, até o presente momento, vacina e nem tratamento eficazes para combater a infecção por VSR. Segundo as recomendações da *American Academy of Pediatrics* (2014)⁴⁷ não é recomendado o uso de epinefrina, glicocorticoides e β_2 - agonistas de curta duração em crianças com bronquiolite e deve-se manter a hidratação e a alimentação e/ou amamentação em quantidades adequadas conforme o grau de severidade da doença. Em casos severos de bronquiolite ou naqueles associados com fatores de risco pré-existentes sugere-se o uso da ribavirina (antiviral) ou palivizumab (anticorpo monoclonal).

1.3 PNEUMONIA

A pneumonia representa um grave problema de saúde pública uma vez que apresenta altas taxas de hospitalização e mortalidade entre idosos, indivíduos imunodeprimidos, transplantados e aqueles que apresentam doença crônica cardiopulmonar. Em adultos o VSR é igualmente reconhecido como o agente causador da pneumonia e das exacerbações de doenças crônicas pulmonares ou cardíacas.^{48,49}

Durante o inverno a situação pode se agravar atingindo principalmente idosos institucionalizados ou os que vivem em lares, embora, aqueles idosos residentes na comunidade também sejam acometidos, porém em menor escala. Nos países

desenvolvidos a maior incidência dos casos de hospitalização ocorrem em idosos acima de 65 anos sendo esta a primeira causa de morte nessa faixa etária.⁵⁰⁻⁵²

Essa enfermidade é caracterizada por uma inflamação ou infecção dos pulmões que afeta as unidades de troca de gás como bronquíolos terminais, respiratórios, alvéolos e interstício pulmonar. Geralmente é adquirida por aspiração de secreções infectadas das vias aéreas superiores, embora, as vias hematogênica e por contiguidade possam ocorrer em algumas situações.⁵³

Os mecanismos pelos quais a incidência de casos graves aumenta na população idosa não são bem conhecidos. Alguns estudos sugerem que a presença de uma doença cardíaca ou pulmonar crônica subjacente, a imunossupressão devido à própria idade, maior susceptibilidade para aspiração e residir em uma instituição social possam estar relacionadas a esse aumento na incidência.⁵⁰

Estima-se que mundialmente ocorram 199.000 óbitos/ano decorrentes de pneumonia por VSR⁵⁴. No Brasil, segundo o Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (SUS), foram 681.828 internações por pneumonia no ano de 2012 dos quais 50.134 ocorreram no Rio Grande do Sul apresentando maior predominância do sexo masculino.⁵⁵

O diagnóstico da pneumonia baseia-se na presença de sintomas de doença aguda do trato respiratório inferior (tosse e um ou mais dos seguintes sintomas: expectoração, falta de ar e dor torácica), achados focais no exame físico do tórax e manifestações sistêmicas (confusão, cefaleia, sudorese, calafrios, mialgias e temperatura superior a 37,8°C), os quais são corroborados pela presença de uma opacidade pulmonar nova detectada por radiografia do tórax.⁵⁵

O tratamento para idosos com pneumonia pode ser terapia de suporte (fluídos e oxigênio) ou terapia antiviral específica dependendo das condições do paciente. Broncodilatadores e corticosteróides podem ser administrados em adultos com asma ou doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e evidência de broncoespasmo. O uso de antibióticos pode ser prudente em pessoas infectadas com VSR que apresentem patógenos bacterianos isolados a partir da expectoração.⁵⁰

Nos pacientes imunocomprometidos com sintomas de DTRI deve ser sempre considerada a terapia antiviral específica, uma vez que as taxas de mortalidade são elevadas, especialmente entre os receptores de Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas (TCTH).⁵⁰

1.4 TRATAMENTOS PARA INFECÇÃO POR VSR

Terapia de Suporte

Esta terapia consiste em manter hidratação – oral ou intravenosa – limpeza da obstrução nasal com solução salina ou aspiração profunda (pacientes hospitalizados). A nutrição via oral deve ser sempre encorajada, em caso de lactentes a amamentação não deve ser suspensa. Nutrição enteral (sonda nasogástrica) e suspensão da amamentação podem ser necessárias em pacientes com risco de aspiração. A ventilação mecânica é considerada naqueles indivíduos com insuficiência respiratória e / ou apnéia grave.⁵⁶⁻⁵⁹

Ribavirina

A ribavirina é um análogo de guanósina, um antiviral de amplo espectro contra o VSR que age através de múltiplos mecanismos entre eles a inibição da síntese de DNA e RNA limitando assim a transcrição viral. É um medicamento liberado pela agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamento em crianças com doença grave associada ao VSR, no entanto, deixou de ser recomendado pela Academia Americana de Pediatria (AAP) devido a evidências insuficientes de sua eficácia.^{58,59}

O uso deste medicamento é, igualmente, recomendado em pacientes imunocomprometidos, principalmente aqueles submetidos ao TCTH que apresentem infecção respiratória por VSR. Nesses casos, o vírus sofre replicação contínua por meses após o início da infecção resistindo aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Não há estudos que comprovem a eficácia de ribavirina em idosos.^{13, 57}

Palivizumab

É um anticorpo monoclonal humanizado composto de 95% de sequências de aminoácidos humanos e 5% de murinos que tem como alvo a glicoproteína de fusão (proteína F) de superfície do VSR. Age através da neutralização e inibição da fusão do VSR, fornecendo imunidade passiva.³⁹ A agência americana FDA e a agência Europeia de Medicamentos aprovaram seu uso para imunoprofilaxia em crianças de

alto risco (lactentes e crianças com doença pulmonar crônica, com história de parto prematuro - 35 semanas de gestação ou menos -, ou com doença cardíaca congênita hemodinamicamente significativa) uma vez que previne e/ou reduz o período de hospitalização por VSR.^{13,58-60} A terapia profilática com palivizumabe não é recomendada em adultos.

Apesar de sua eficácia comprovada é um medicamento de custo elevado tornando-se, desta forma, uma alternativa de custo ineficiente para evitar períodos curtos de hospitalização e número reduzido de hospitalizações mais longas, especialmente na ausência de evidência de benefício significativo a longo prazo e nenhum efeito mensurável sobre as taxas de mortalidade. Diante disso, a AAP restringiu sua administração apenas para as crianças do grupo de risco elevado.⁶⁰

Novas terapias antivirais específicas e novas classes de antivirais estão sendo desenvolvidas para o tratamento das DTRI por VSR. A maioria das novas terapias anti-VSR focam em moléculas pequenas com atividade antiviral e mecanismos diferentes de ação. Soma-se a isso o interesse no desenvolvimento de vacinas para a prevenção do VSR.⁶¹ Em 2015, a Organização Mundial da Saúde (OMS), criou grupos de trabalho estratégicos focando o desenvolvimento de intervenções preventivas e eficazes que incluem: (i) a imunização materna / passiva para prevenir a doença por VSR em crianças com menos de 6 meses; (ii) a imunização pediátrica para prevenir a doença por VSR em bebês e crianças pequenas, uma vez que a proteção favorecida pela imunização materna diminui nessa faixa etária.⁶²

São inúmeras as pesquisas que estão sendo desenvolvidas na busca por novos agentes antivirais com impacto na prevenção e/ou no tratamento das DRTIs por VSR. Estudos tem demonstrado que a manipulação precoce da microbiota intestinal de prematuros com o uso de prebióticos/probióticos podem reduzir infecções respiratórias virais⁶³. Elementos antioxidantes como a curcumina⁶⁴ e o resveratrol (RESV)⁶⁵ tem sido, igualmente, elencados como possíveis candidatos no tratamento antiviral. Os efeitos e os mecanismos antivirais do RESV estão sendo investigados em vírus como influenza⁶⁶, vírus metapneumonia humana⁶⁷ e VSR⁶⁸.

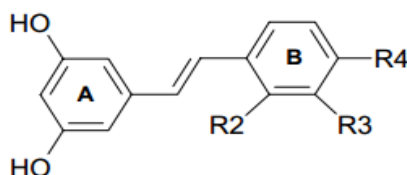
Além dos estudos realizados com o RESV outras moléculas têm sido estudadas pelos seus benefícios à saúde humana como é o caso dos azos compostos. Recentemente o grupo de pesquisa do Laboratório de Química de Produtos Naturais da PUCRS sintetizou 5 novos azoestilbenoides os quais estão sendo testados para diferentes fins terapêuticos como antitumoral, antileishmania e bactericida⁶⁹⁻⁷².

1.5 AZOESTILBENOIDES

Os polifenóis são caracterizados quimicamente por uma variedade de biomoléculas que contêm um ou mais grupos hidroxilas ligadas a um ou mais anéis aromáticos. Podem ser divididos em vários grupos de acordo com a sua estrutura química, tais como, flavonoides, lignanas e estilbenos.⁷¹

Os estilbenos possuem dois anéis aromáticos que são substituídos (Figura 4), em A por dois grupos hidroxilas na posição meta e em B por grupos hidroxilas ou metoxilas nas posições orto, meta e/ou para. São 1,2-diariletenos e integrantes do grupo dos polifenóis, sendo o RESV o membro mais abundante da família.⁷²

Figura 4 - Estrutura geral do estilbenos



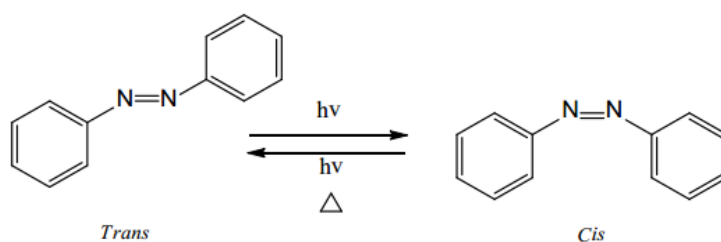
R2	R3	R4	Estilbeno
H	H	H	Pinosilvina
H	H	OH	Resveratrol
OH	H	OH	Hidroxi-resveratrol
H	OH	OH	Piceatanol
H	OH	OCH ₃	Rapontigenina

Fonte: HERMAN (2003)⁷²

Os azo compostos são produtos químicos que apresentam grupo funcional R-N=N-R'. Quando os grupamentos R e R' são anéis fenila, são chamados de azobenzenos. Estes apresentam duas conformações isoméricas (Figura 5), sendo uma cis e a outra trans (mais estável à luz e temperatura ambiente).⁷³ Caracterizam-se principalmente pela capacidade de fotoisomerização, alternando da conformação

trans para cis na presença de luz pela absorção de um fóton e, no sentido inverso, pela relaxação térmica.⁷⁴

Figura 5 -Conformações isoméricas dos azobenzenos



Fonte: Adaptado de Slokar YM, 1998⁷⁵

Os azo compostos são amplamente utilizados como corantes em indústrias têxteis, alimentícias, cosméticas e eletrônicas⁷⁶, como removedores de metais no tratamento de águas residuais⁷⁷ e na área biomédica. A importância biológica dos azo compostos é reconhecida pela sua utilização como anti-neoplásico, antibiótico, anti-sépticos e outros agentes quimioterapêuticos.⁷⁸

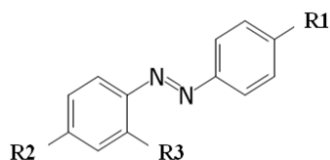
Estudos recentes demonstraram que análogos do RESV sintetizados a partir da modificação de substituintes em ambos os anéis, um pela fusão de benzeno e outros dois pela fusão de um anel heterocíclico não alteraram a dupla ligação entre eles e apresentaram atividade antineoplásica, vasodilatadora e anti-tirosinase. O aumento dos efeitos anti-tirosinase, bem como antioxidante e outras atividades foram relatadas para o azo-oxiresveratrol e o azo-resveratrol.⁷⁹

Além desses análogos, outros azo compostos estão envolvidos em numerosas reações biológicas como a inibição de DNA, RNA e síntese de proteínas, carcinogênese e fixação de nitrogênio.⁸⁰

Em 2013, o grupo de Piotto *et al*⁸¹, sintetizou derivados de pequenos azobenzenos com atividade antibacteriana e antifúngica. Os compostos sintetizados foram comparados com antimicrobianos estilbenos, sendo que os azo compostos mostraram maior atividade antifúngica e antibacteriana, com menor toxicidade o que aumenta o interesse do uso terapêutico dos azo compostos embora ainda não esteja bem elucidado o seu mecanismo de ação.

Em estudo realizado pelo nosso grupo foi proposta a alteração estrutural de estilbeno modificado do resveratrol (substituição da ligação dupla entre carbonos pela dupla entre nitrogênios) com o objetivo de avaliar a atuação dos novos azoestilbenoides sintetizados como agentes antineoplásicos em comparação com o Resveratrol.⁶⁹ Os compostos sintetizados estão representados abaixo, diferenciados pelos grupamentos presentes nas posições R1, R2 e/ou R3 (Figura 6). Estes demonstraram possuir atividade antiproliferativa em menores concentrações, serem seletivos para a linhagem cancerígena testada e manterem sua atividade em longo período de tempo (72 horas), sugerindo que não geraram resistência na linhagem celular B16F10.⁶⁹

Figura 6 - Novos azoestilbenoides sintetizados



AZO COMPOSTO	R1	R2	R3	MASSA MOLECULAR (g)
REDRESV 01	OH	OH	OH	230
REDRESV 02	OAc	OH	OH	272
REDRESV 03	OAc	OAc	OAc	355

Fonte: BAESSO (2015)⁶⁹

Diante da evidência que o resveratrol tem atividade antiviral⁶⁶⁻⁶⁸ nossa hipótese é que os azoestilbenoides apresentem atividade antiviral. Deste modo propomos analisar *in vitro* a capacidade antiviral dos azoestilbenoides REDRESV 01, REDRESV 02 e REDRESV 03, sintetizados pelo Laboratório de Química de Produtos Naturais da PUCRS⁶⁹⁻⁷², frente ao vírus sincicial respiratório em células saudáveis e neoplásicas.

2 JUSTIFICATIVA

O Vírus Sincicial Respiratório é um dos principais agentes de infecção nas doenças do trato respiratório inferior. Casos de infecção por VSR afetam principalmente prematuros, imunodeprimidos e idosos ocasionando um aumento nas taxas de hospitalização e óbitos. Mais de 90% dos casos de óbitos associados ao VSR ocorrem em países de baixa e média renda.⁶²

O tratamento atual da infecção por VSR é baseado em terapia de suporte uma vez que não existe, até o presente momento, vacina e nem tratamento eficazes para combater a infecção. O antiviral existente, Ribavarina, deixou de ser indicado para crianças pela *American Academy of Pediatrics*, e a prevenção com Palivizumabe (anticorpo monoclonal) é de custo elevado para o paciente, para a família e para o Sistema Público de Saúde limitando sua administração. Diante desta realidade, busca-se hoje alternativas de tratamento eficazes, de custo reduzido e que contemple todos os grupos de risco.

Tendo em vista que não foram encontrados na literatura até o presente momento estudos que tenham investigado a ação antiviral de um azoestilbenóide frente ao vírus sincicial respiratório visamos, a partir do presente estudo, contribuir com o estudo de alternativas no tratamento da infecção por VSR.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a capacidade antiviral *in vitro* de azoestilbenoides frente ao vírus sincicial respiratório em células saudáveis e neoplásicas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Investigar o efeito dos azoestilbenoides sobre a viabilidade celular;
- 2- Avaliar a capacidade inibitória da replicação viral dos azoestilbenoides;
- 3- Avaliar a capacidade virucida dos azoestilbenoides;

Obs: Neste trabalho foram utilizadas células MRC-5 (linhagem celular de pulmão normal) e A549 (linhagem celular de carcinoma de pulmão) em todos os experimentos.

4 ARTIGO ORIGINAL

O seguinte artigo está de acordo com as normas da revista *International Biological Chemistry – De Gruyter*¹, para a qual foi submetido.

1

Synthesis and *in vitro* Biological Activity of Azo Compounds on Respiratory Syncytial Virus Infection

Margarita A.P. Cortés^{1*}, Karen Magnus^{1*}, Bárbara N. Porto^{2a}, André A. Souto^{1§}

¹ Department of Pure Chemistry, School of Chemistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul - PUCRS, Porto Alegre, 90619900, Brazil.

² Laboratory of Clinical and Experimental Immunology, Infant Center, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul – PUCRS, Porto Alegre, 90619900, Brazil

^a Centre for the Study of Complex Childhood Diseases (CSCCD), Hospital for Sick Children, SICKKIDS, Toronto, ON M5G 0A4, Canadá. (present address).

*Margarita A.P. Cortés and Karen Magnus contributed equally to this work as first authors.

§Corresponding author: André A. Souto. Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul – PUCRS. Department of Pure Chemistry, School of Chemistry. Av. Ipiranga, 6681 – prédio 12A- Phone: +55 51 3320.3545 - Porto Alegre, 90619900, Brazil. E-mail: arqony@puers.br.

Running Title: Activity of Azo Compounds on Respiratory Syncytial Virus

ABSTRACT

The human syncytial virus is considered one of the causes for increased morbidity and mortality in adults with cancer. We evaluated *in vitro* biological activity of azo compounds synthesized in our laboratory against human respiratory syncytial virus. Cytotoxicity and virucidal activity of the compounds were evaluated by MTT assay. Compounds **1a** and **1b** showed tumor cell selectivity and virucidal activity against the virus. Acetylated azo compounds appear to be promising for the development of new drugs for the treatment of hRSV infection in cancer patients, and further research is needed to deepen these findings.

Keywords: A549; antiviral; cancer; virucidal; hRSV; MRC-5.

¹ Fator de Impacto 2018: 3,014 / CAPES: Qualis B1 (Quadriênio 2013-2016).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 REAGENTES E COMPOSTOS

Os azostilbenoides (Figura 6) foram sintetizados e fornecidos pelo Laboratório de Química de Produtos Naturais da Faculdade de Química da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)⁶⁹⁻⁷². Soluções estoques dos compostos foram preparadas com 0,015g do composto diluídos em 400µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e posteriormente armazenados a -20C° até serem utilizados.

A Ribavirina foi diluída em água deionizada de alta pureza - MilliQ (Millipore, Bedford, MA, USA), alíquotada e armazenada a -20°C.

Foram usados os seguintes reagentes: brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT- Life Technologies) meio de cultura Dulbecco Modified Eagle's Minimal Essential Medium (DMEM - Sigma-Aldrich), Soro Fetal Bovino (SFB - Gibco), Triton X-100 (Sigma-Aldrich) e Dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma-Aldrich). A cepa A-2 do vírus sincicial respiratório (VSR) foi doada pelo Dr. Fernando Polack - Fundación Infant/Argentina.

5.2 CULTIVO CELULAR

Foram utilizadas células MRC-5 (ATCC® CCL-171™), linhagem celular de fibroblastos de pulmão fetal humano como uma célula de pulmão normal, e células A549 (ATCC® CCL-185™), linhagem celular de carcinoma de pulmão que apresenta características epiteliais do tipo II⁸² e é suscetível à infecção por VSR^{83,84}. Foram utilizadas células do estoque do Laboratório de Imunologia Clínica e Experimental (PUCRS), armazenadas a -80°C, descongeladas e mantidas na cultura a 37°C com 5% de CO₂ em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Para os ensaios as células foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer, plaqueadas na concentração de 5x10³/poço (Figura 7) em placa de 96 poços e mantidas por 24h a 37°C sob atmosfera de CO₂ a 5%.

5.3 CULTIVO E TITULAÇÃO DO VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO

Para a propagação e titulação do vírus foram utilizadas células Vero (ATCC® CCL-81™), linhagem celular de rim de macaco verde africano. As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e incubadas a 37°C com 5% de CO₂ em garrafas de 75cm² até atingirem 70% de confluência.

A monocamada foi infectada com cepa A-2 de VSR e observada durante 2 a 3 dias até atingirem o efeito citopático (ECP). As células foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet celular lisado por choque térmico, aliquotado e congelado a -80C°.

O título viral foi determinado através do método de contagem de placas e expresso através do número de unidades formadoras de placas/mL (PFU/mL). Para os experimentos foi usada a concentração de 5x10⁴ PFU/mL. Esta concentração foi escolhida por ser a concentração que reduziu a viabilidade celular em 50% (Figura 8). Os compostos serão considerados capazes de reverter o efeito citopático do vírus se reverterem essa inibição do crescimento celular.

5.4 ENSAIO COLORIMÉTRICO - MTT

Para avaliar o efeito dos azostilbenoides sobre a viabilidade celular de células MRC-5 e A549 foi realizado ensaio colorimétrico com MTT. Após o tratamento 100µl do sobrenadante foi delicadamente retirado e adicionado 40µl da solução de MTT (5mg/ml). As células foram incubadas por 4 horas a 37°C com 5% de CO₂. O meio foi totalmente aspirado e adicionado 120µl de DMSO.

A densidade óptica (DO) foi determinada utilizando leitor de placas (EZ Read 400 Microplate Reader - Biochrom) a um comprimento de onda de 570/650nm.

5.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR

Células A549 e MRC-5 foram plaqueadas a uma densidade de 5x10³ células/poço, em placas de 96 poços e incubadas a 37°C sob atmosfera de CO₂ a 5% por 24h (conforme protocolo descrito no item 5.2). O meio de cultura foi retirado e acrescentado 200µL de meio novo (DMEM 10% de SFB) contendo 0,2µl de

diferentes concentrações (5µM, 10µM, 20µM, 40µM, 80µM, 160µM) dos compostos REDRESV 01, REDRESV 02 e REDRESV 03. Após a adição dos compostos as células foram incubadas por 24h, 48h e 72h a 37°C sob atmosfera de CO₂ a 5% e submetidas ao ensaio de MTT.

DMSO (0,2µl) foi utilizado como controle do veículo em uma concentração de 0,1% por poço. Como controle negativo foi utilizado somente meio de cultura. Foi utilizado como controle positivo Triton X-100 0,01% (Figura 9).

Para avaliar o efeito da Ribavirina sobre a viabilidade celular, as células foram plaqueadas conforme descrito acima e adicionado 0,2µl de diferentes concentrações do fármaco (5µM, 10µM, 20µM, 40µM, 80µM, 160µM). Após 72h de incubação a 37°C sob atmosfera de CO₂ a 5% foi realizado o ensaio de MTT.

5.6 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA (IC₅₀) E ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)

A dose capaz de inibir 50% da viabilidade celular (IC₅₀) foi calculada utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0. O índice de seletividade (IS) foi determinado através da divisão do valor da IC₅₀ na linhagem de fibroblastos pelo valor da IC₅₀ nas células neoplásicas (IS=IC₅₀ MRC-5 / IC₅₀ A549)⁸⁵.

5.7 AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DO EFEITO CITOPÁTICO

Células A549 e MRC-5 foram plaqueadas e incubadas durante 24 horas como previamente descrito. Para todos os ensaios descritos a seguir foram utilizados os compostos REDRESV 02 E REDRESV 03 nas concentrações de 5µM, 10µM, 20µM. A Ribavirina foi utilizada como controle positivo na concentração de 10 µM. As concentrações dos compostos e da ribavirina foram escolhidas por serem as concentrações que mantiveram as células viáveis em aproximadamente 100%.

Primeiramente, as células foram pré-tratadas com os compostos nas concentrações citadas durante 24h a 37°C e 5% de CO₂. Após o tratamento o meio foi retirado, as células lavadas com PBS 1x e as células infectadas durante 2h com 5x10⁴ PFU/mL de VSR, em meio livre de SFB. O meio de infecção foi retirado e novo meio (DMEM 10% SFB) adicionado.

O efeito dos compostos durante a infecção foi avaliado adicionando-se os compostos ou ribavirina juntamente com o vírus, durante as 2h de infecção.

Para avaliar o efeito dos compostos após a infecção, as células foram infectadas com 5×10^4 PFU/mL de VSR em meio livre de SFB. Após a infecção foi acrescentado meio DMEM 10% SFB contendo REDRESV 02, REDRESV 03 ou Ribavirina.

Em todos os protocolos as células foram incubadas por 72h a 37°C sob atmosfera de CO₂ a 5% e ensaio de MTT realizado conforme descrito anteriormente.

5.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO VIRUCIDA

Para avaliar a capacidade antiviral dos compostos através do efeito direto sobre a partícula viral foi feita uma mistura de VSR (5×10^4 pfu/mL) e compostos REDRESV 02 e REDRESV 03 (5µM, 10µM, 20µM) em meio DMEM livre de SFB incubando-se durante 1h⁸⁶ a 37°C sob atmosfera de CO₂ a 5%.

Células A549 e MRC-5 foram plaqueadas e incubadas durante 24 horas como previamente descrito. O meio de cultura foi retirado e as células lavadas com PBS 1x. Adicionou-se 200µl/poço do mix de vírus e composto. As células foram mantidas a 37°C sob atmosfera de CO₂ a 5% por 2h para infecção. O meio de infecção foi retirado e adicionado meio DMEM suplementado com 10% de SFB. As células foram mantidas por 72h a 37°C sob atmosfera de CO₂ a 5%.

Foi realizado o ensaio de MTT para avaliação da viabilidade como descrito anteriormente.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados utilizou-se o teste *t de Student* para amostras independentes, com o propósito de comparar as médias entre os grupos. Todos os dados foram analisados pelo software estatístico GraphPad Prism 5.0. Os dados foram expressos como média ± EPM (erro padrão da média). Foram considerados resultados estatisticamente significativos para valores $p \leq 0,05$.

6 RESULTADOS

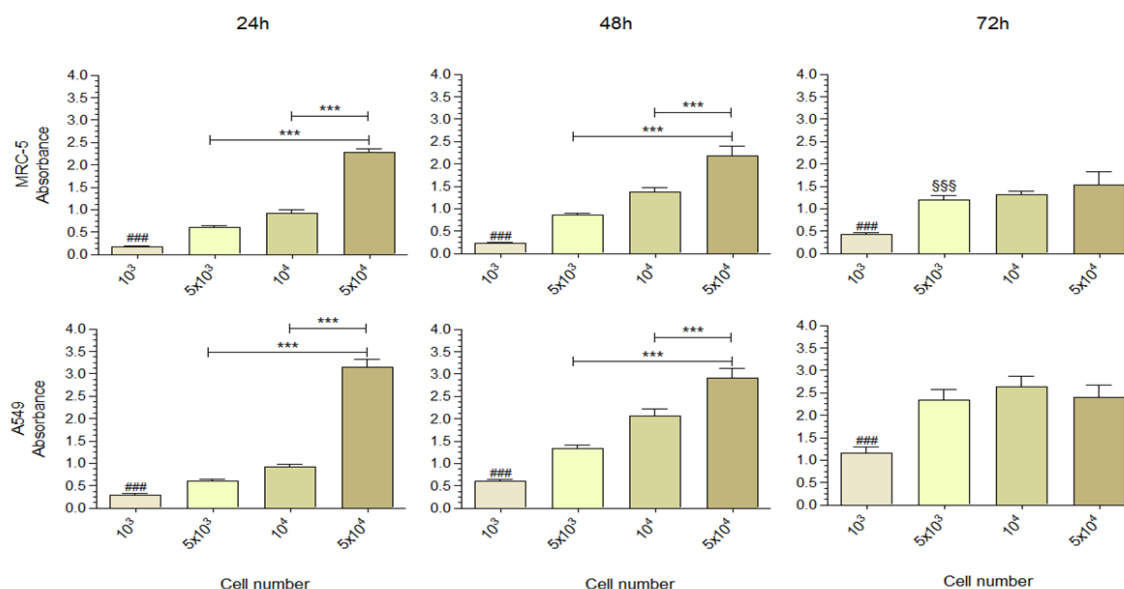
Para investigar *in vitro* as propriedades antivirais dos azoestilbenoides REDRESV 01, REDRESV 02 e REDRESV 03 frente ao VSR foi avaliado o efeito sobre a viabilidade celular, a concentração inibitória, a redução do efeito citopático e o efeito virucida dos compostos utilizando-se a técnica de MTT.

6.1 PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO

6.1.1 Concetração das Linhagens Celulares MRC-5 e A549

Para padronizar a concentração de células por poço a ser utilizada neste estudo foi feita uma curva dose-resposta e cinética da concentração das linhagens celulares MRC-5 e A549 (Figura 7). Para este estudo ficou estabelecido que a melhor concentração a ser utilizada para o plaqueamento das células é de 5×10^3 /poço.

Figura 7- Curva dose-resposta e cinética da concentração de MRC-5 e A549



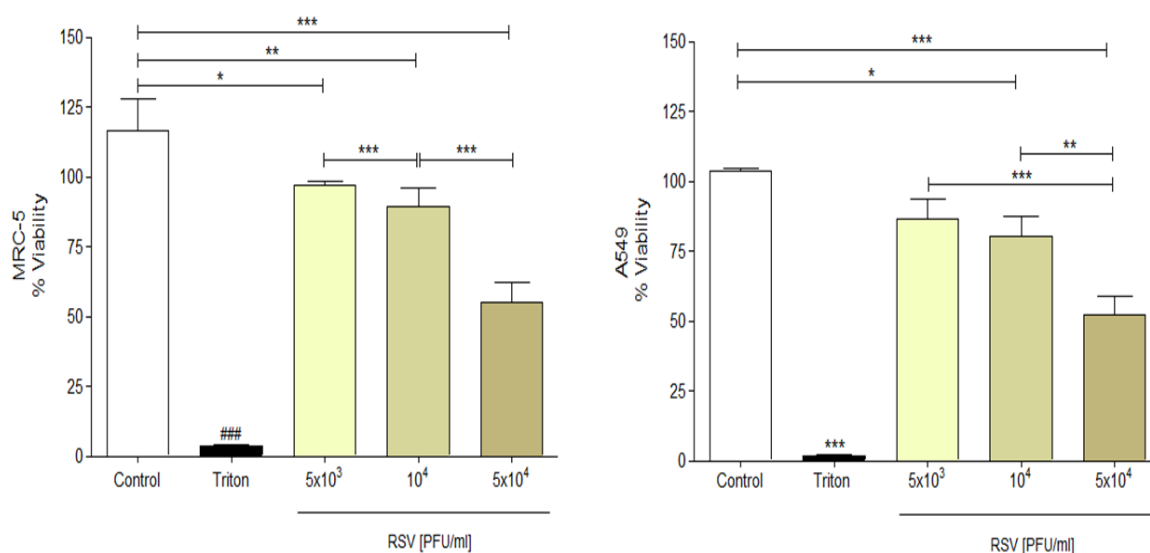
Curva dose-resposta e cinética da concentração de células MRC-5 e A549. Resultados expressos em média \pm EPM (erro padrão da média). Valores da análise da média entre grupos

$p \leq 0,05$ foram considerados significativos. Representativos de dois experimentos independentes em quadruplicata. ### diferente de todos os grupos. \$\$\$ diferente do 5×10^4 .

6.1.2 Concentração do Vírus Sincicial Respiratório

Com a finalidade de padronizar a concentração viral a ser utilizada foi realizada uma curva dose-resposta da concentração do vírus em 72h (figura 8). Foi escolhida para ser usada neste estudo foi a concentração de 5×10^4 PFU/mL por ser a concentração que reduziu a viabilidade celular em 50%.

Figura 8 - Curva dose-resposta da concentração do VSR em 72h

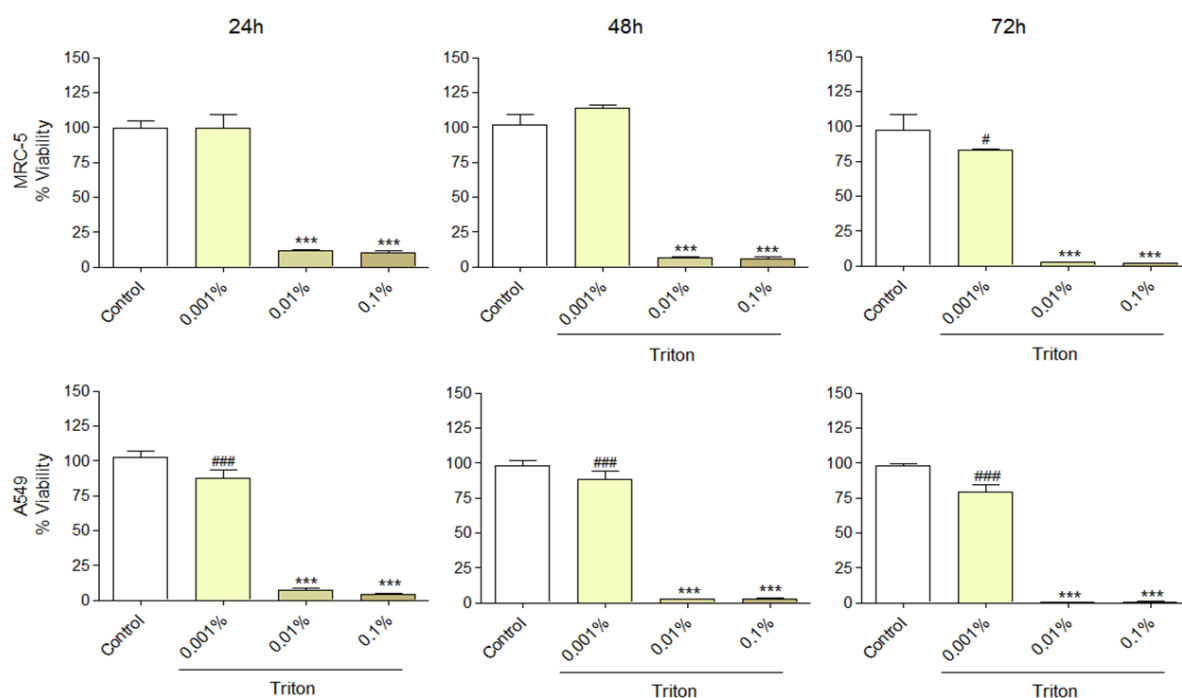


Curva dose-resposta da concentração do vírus em 72h. Resultados expressos em média \pm EPM (erro padrão da média). Utilizado teste *t student* no *software* GraphPad Prism 5.0. Valores da análise da média entre grupos $p \leq 0,05$ foram considerados indicativos de significância em relação ao controle. Representativos de dois experimentos independentes em triplicata.

6.1.3 Concentração do Triton X-100

Foi utilizado como controle positivo Triton X-100 e portanto foi feita uma curva dose-resposta e cinética da concentração a ser utilizada desse composto nos experimentos (Figura 9). Ficou estabelecido que a melhor concentração de Triton X-100 a ser utilizada neste estudo foi a concentração 0,01%.

Figura 9 - Curva dose-resposta e cinética da concentração de Triton X-100



Curva dose-resposta e cinética da concentração de Triton X-100. Resultados expressos em média \pm EPM (erro padrão da média) . Utilizado teste *t student* no *software* GraphPad Prism 5.0. Valores da análise da média entre grupos $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. Representativos de dois experimentos independentes em quadruplicata . ***diferente do controle e do grupo 0.001%. ### diferente do controle.

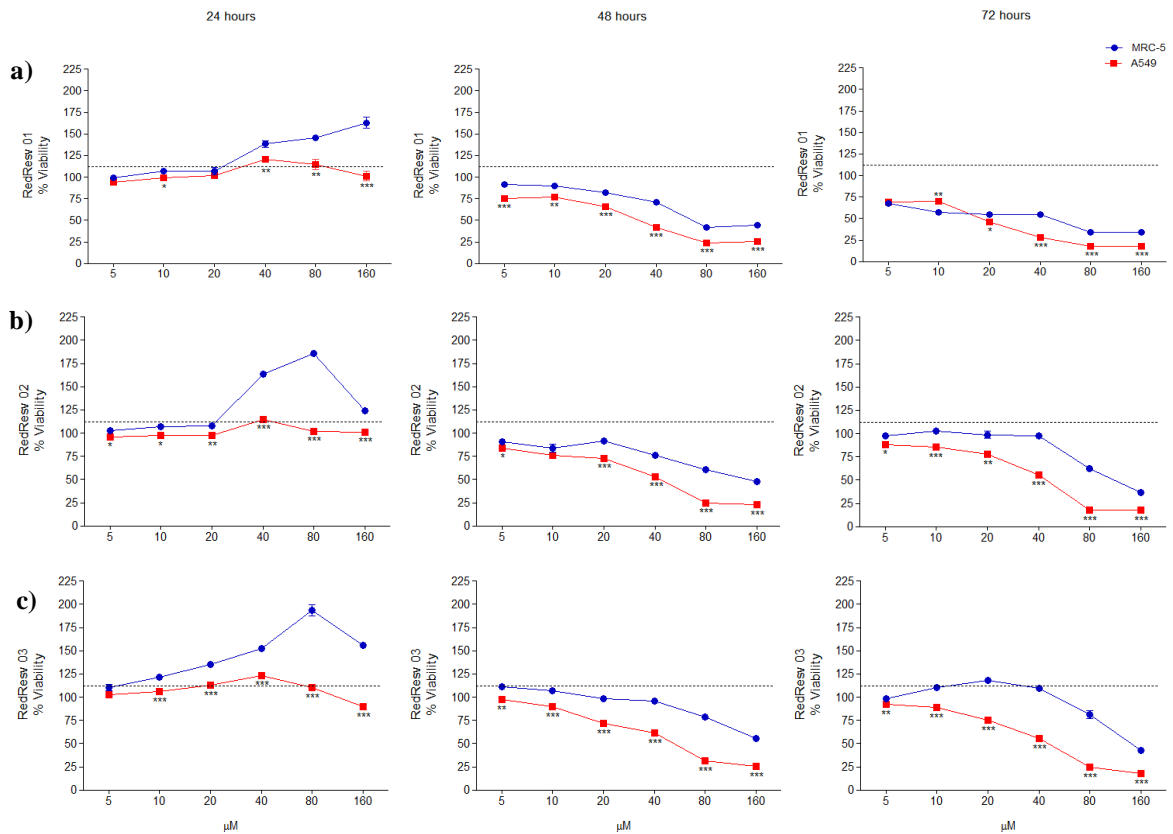
6.2 EFEITO NA VIABILIDADE CELULAR DOS AZOCOMPOSTOS

No ensaio de viabilidade celular as células foram submetidas a concentrações variadas (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M, 160 μ M) dos compostos durante 24h, 48h e 72h. Os três compostos não demonstraram toxicidade nas primeiras 24h. Os compostos REDRESV 02 e REDRESV 03 apresentaram baixa toxicidade nas células A549 e MRC-5 até a concentração de 20 μ M em 72h. No entanto, o composto REDRESV 01 mostrou ser tóxico a partir dessa concentração nas duas linhagens celulares (Figura 10).

A comparação da redução da viabilidade entre as duas linhagens de células com os três compostos pode ser vista na Figura 10. A linhagem de carcinoma de pulmão (A549) apresenta diferença significativa ($p \leq 0,0001$) quando comparada com

a célula normal (MRC-5) na presença dos três compostos e nos três tempos analisados.

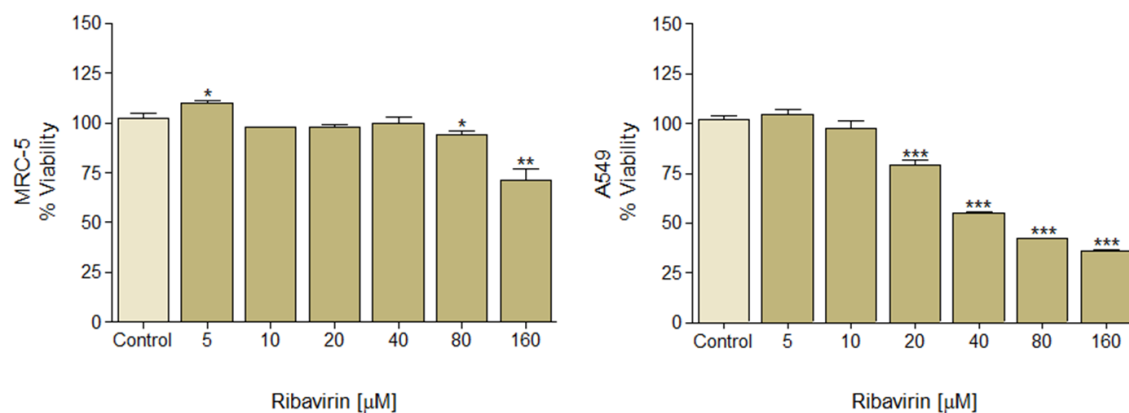
Figura 10 -Curva de viabilidade celular comparativa entre A549 e MRC-5



Curva de viabilidade celular comparativa entre A549 e MRC-5. (a) REDRESV 01. (b) REDRESV 02. (c) REDRESV 03. Barra de erro representam o EPM (erro padrão da média). Utilizado teste *t student* no *software* GraphPad Prism 5.0. Valores da análise da média entre grupos *** $p < 0.0001$ foram considerados significativos.

A viabilidade celular da ribavirina também foi avaliada uma vez que este é considerado o medicamento padrão no tratamento de VSR (Figura 11). A ribavirina mostrou diferença significativa ($p \leq 0,05$) na célula tumoral (A549) a partir da concentração de $20\mu\text{M}$ tornando-se mais tóxica para essa linhagem a medida que aumenta a sua concentração. A análise da viabilidade celular desse medicamento foi realizada nas mesmas concentrações usadas para os compostos e no tempo de 72 horas por ser o tempo padrão estabelecido para todos os experimentos.

Figura 11 - Gráfico da viabilidade celular da Ribavirina



Curva dose-resposta da Ribavirina em 72h. O tempo de 72h foi usado como tempo padrão para todos os experimentos. Resultados expressos em média \pm EPM (erro padrão da média). Representativos de dois experimentos independentes em quadruplicata.

6.3 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA (IC₅₀) E ÍNDICE DE SELETIVIDADE DOS COMPOSTOS

A concentração que inibe 50% da viabilidade celular (IC₅₀) foi determinada por regressão não linear utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0 para os três compostos (Tabela 1). Os compostos que apresentaram valores maiores de IC₅₀ foram o REDRESV 02 e REDRESV 03 tanto na célula normal quanto na tumoral. O composto REDRESV 01 apresentou IC₅₀ menor tanto para a célula tumoral quanto para a célula normal, sendo considerado citotóxico para as duas linhagens quando comparado com os outros compostos.

O índice de seletividade foi considerado significativo quando $\geq 2,0^{85}$. Os valores do IS indicam que os três compostos são mais ativos na linhagem de células neoplásicas (A549) do que nas células normais (MRC-5) (Tabela 1).

Tabela 1 - Concentração inibitória e Índice de Seletividade dos compostos

COMPOUND	IC ₅₀ [μM]		SI
	MRC-5	A549	
REDRESV 01	58,6	17,43	3,36
REDRESV 02	87,58	40,73	2,15
REDRESV 03	150.1	43,44	3,45

Valores de IC₅₀ dos compostos sintetizados nas células A549 e MRC-5 determinada através da análise de viabilidade celular em 72h. Índice de Seletividade foi calculado pela fórmula: $IS = IC_{50} \text{ MRC-5} / IC_{50} \text{ A549}$. Foi considerado significativo quando $IS \geq 2,0$. IC₅₀ = 50% da concentração inibitória; IS= Índice de Seletividade.

Na linhagem celular de carcinoma de pulmão (A549) a ribavirina apresentou valor de IC₅₀ 40,4 μM. No entanto, nas células de fibroblastos de pulmão fetal bovino (MRC-5) o medicamento somente apresentou efeito na redução da viabilidade celular a partir da concentração de 160 μM. Não foi possível calcular o IC₅₀ da ribavirina em concentrações $\geq 160 \mu\text{M}$.

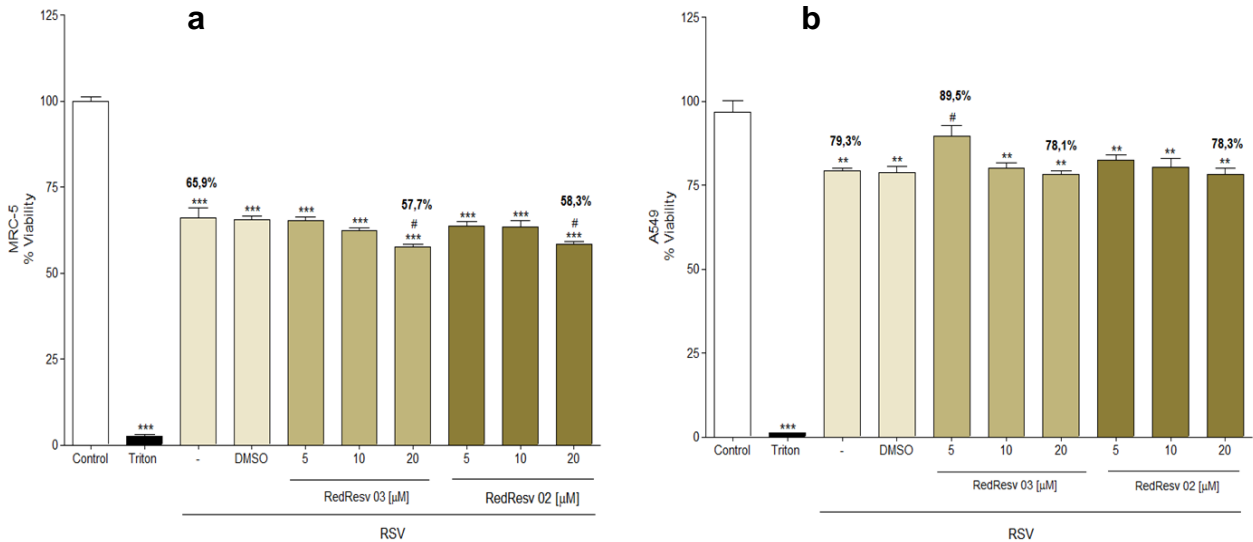
A partir deste resultado excluiu-se o REDRESV 01 do estudo por ter se mostrado o mais citotóxico entre os três compostos analisados. Foram escolhidos o REDRESV 02 e REDRESV 03 para continuar o estudo por serem menos citotóxicos para as duas linhagens testadas.

6.4 REDUÇÃO DO EFEITO CITOPÁTICO

Para avaliar o efeito antiviral dos azoestilbenoides optou-se pela técnica de avaliar a proteção contra a morte celular causada pelo vírus. As células foram pré-tratadas com o composto durante 24h antes da infecção, durante a infecção e após a infecção.

No tratamento pré-infecção (24h) os compostos REDRESV 02 e REDRESV 03 apresentaram diferença significativa na célula MRC-5 ($p \leq 0,05$) na concentração 20 μM quando comparado ao grupo viral (Figura 12).

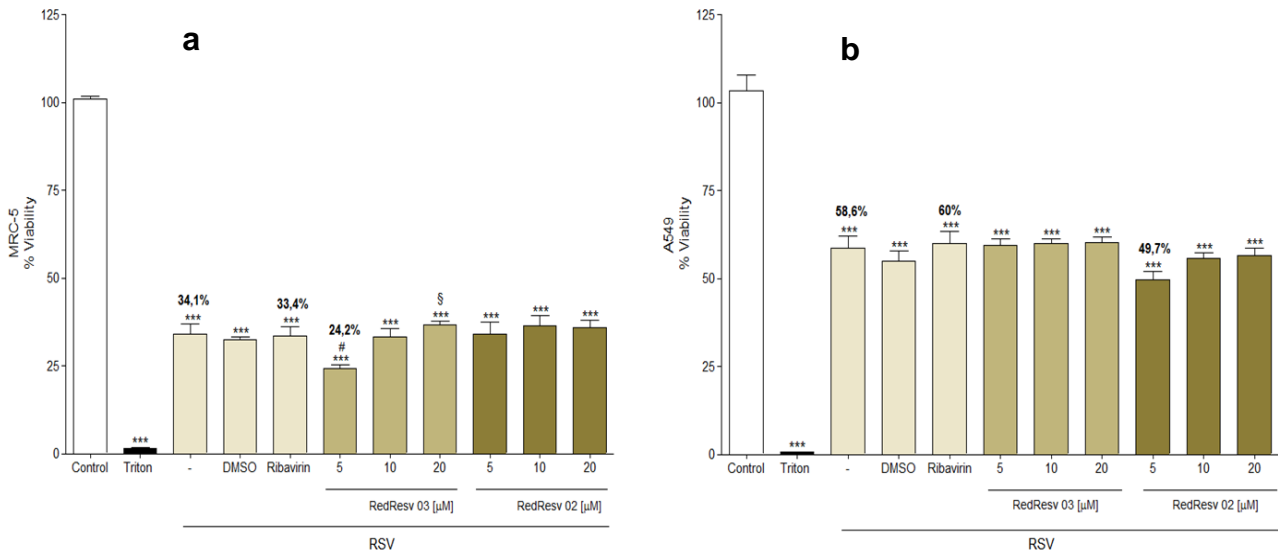
Figura 12 - Gráfico da atividade antiviral dos compostos- tratamento pré-infecção



Atividade antiviral - tratamento pré-infecção. Atividade antiviral avaliada através da redução do efeito citopático dos compostos REDRESV 02 e REDRESV 03 nas linhagens (a) MRC-5 e (b) A549 através do ensaio de MTT e referente à pré-infecção (24h). Resultados expressos em média \pm EPM (erro padrão da média). Representativos de dois experimentos independentes em quadruplicata.*** diferente do controle. # diferente dos grupos VSR e DMSO. Valores foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

Quando as células foram tratadas durante a infecção os resultados mostraram que o REDRESV 03 apresentou diferença significativa em relação a diminuição da viabilidade celular da linhagem MRC-5 na concentração 5 μ M quando comparado ao grupo viral e a ribavirina. Nas células A549 apenas o composto REDRESV 02 apresentou a mesma diferença e na mesma concentração (Figura 13).

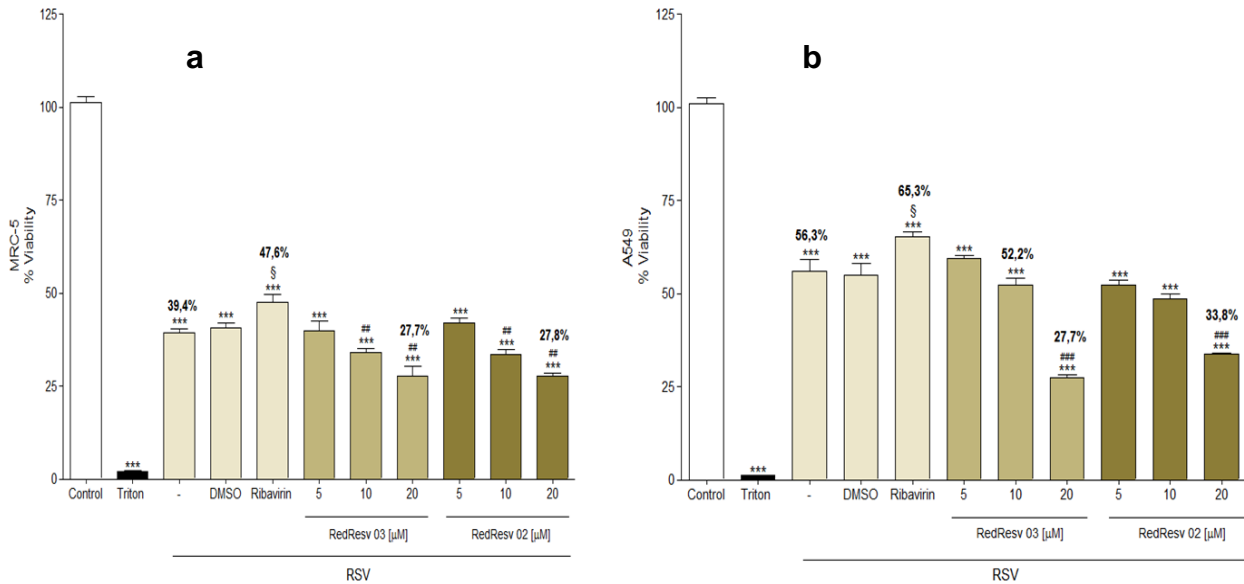
Figura 13 - Gráfico da atividade antiviral dos compostos - tratamento 0h



Atividade antiviral (0h). Atividade antiviral avaliada através da redução do efeito citopático dos compostos REDRESV 02 e REDRESV 03 nas linhagens **(a)** MRC-5 e **(b)** A549 através do ensaio de MTT e referente ao tratamento simultâneo à infecção (0h). Resultados expressos em média \pm EPM (erro padrão da média). Representativos de dois experimentos independentes em quadruplicada. *** diferente do controle; # diferente do VSR, DMSO e ribavirina; § diferente do DMSO.

Os resultados do tratamento pós-infecção demonstram que os compostos REDRESV 02 e REDRESV 03 na concentração 20 μ M, nas duas linhagens celulares, apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) com relação a diminuição da viabilidade celular quando comparado aos grupos VSR e ribavirina. A viabilidade celular da célula de carcinoma de pulmão (A549) infectada por VSR e tratada com o composto REDRESV 03 (20 μ M) diminuiu duas vezes mais quando comparada ao controle viral (Figura 14).

Figura 14 - Gráfico da atividade antiviral dos compostos - tratamento pós-infecção

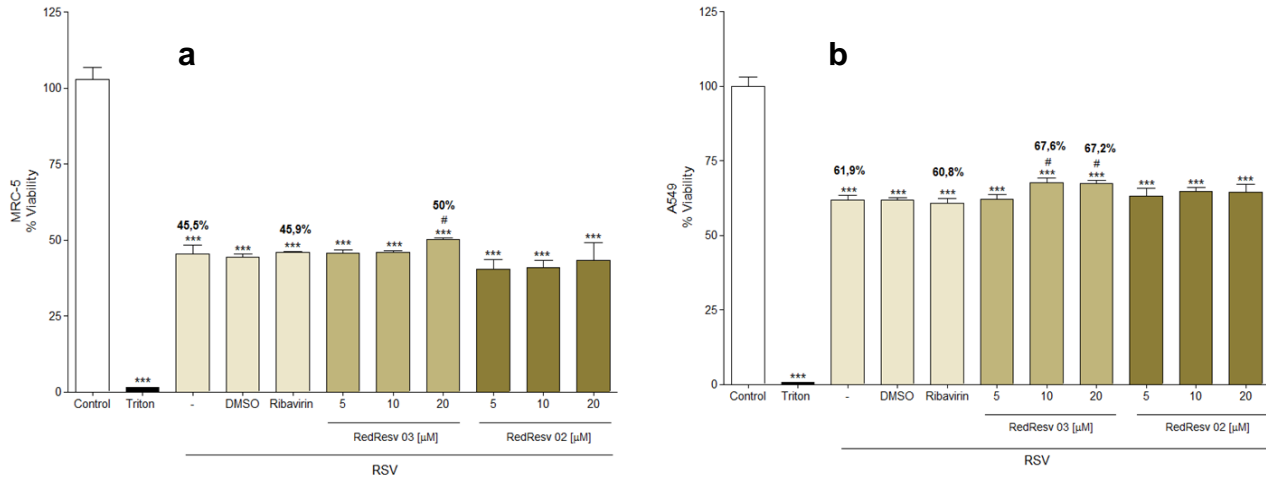


Atividade antiviral (pós-infecção). Atividade antiviral avaliada através da redução do efeito citopático dos compostos REDRESV 02 e REDRESV 03 nas linhagens (a) MRC-5 e (b) A549 através do ensaio de MTT e referente ao tratamento pós-infecção. Resultados expressos em média \pm EPM (erro padrão da média). *** diferente do controle; # diferente do VSR, DMSO e ribavirina; § diferente do DMSO.

6.5 EFEITO VIRUCIDA DOS COMPOSTOS

Para investigar se os compostos tem a capacidade de inativar as partículas do VSR um ensaio de avaliação do efeito virucida foi realizado. A figura 13 mostra que os compostos inativaram as partículas virais nas duas linhagens estudadas. O REDRESV 03, na célula A549, concentrações 10 μ M e 20 μ M, apresentou diferença ($p \leq 0,05$) com os grupos VSR e ribavirina. Da mesma forma, este composto apresentou diferença na concentração 20 μ M na célula normal. Este resultado sugere um possível efeito virucida do composto. A ribavirina por sua vez não mostrou atividade virucida quando comparada ao controle viral apresentando valores similares a este controle.

Figura 15 - Gráfico da capacidade virucida dos compostos



Capacidade virucida dos compostos nas linhagens MRC-5 e A549. (a) MRC-5. (b) A549. Resultados expressos em média \pm EPM (erro padrão da média). Representativos de dois experimentos independentes em quadruplicata. *** diferente do controle; # diferente do VSR, DMSO e ribavirina.

7 DISCUSSÃO

Diversos estudos tem sido realizados com o intuito de encontrar alternativas farmacológicas para o tratamento ou prevenção da infecção respiratória por VSR responsável pelas altas taxas de internações e mortalidade entre crianças e adultos no mundo todo⁶⁴⁻⁶⁸.

Azo compostos sintetizados de produtos naturais tem sido apontados como substâncias promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos uma vez que demonstraram importantes atividades antitumorais⁸⁷, antibacterianas⁸⁸ e antivirais⁸⁹. Nossa proposta neste estudo foi avaliar a ação antiviral de três azocompostos sintetizados a partir da alteração estrutural de estilbeno modificado do resveratrol⁶⁹ frente ao VSR.

Foram escolhidos dois tipos de célula para este estudo, uma célula normal de fibroblasto de pulmão (MRC-5) e uma célula epitelial de carcinoma de pulmão (A549). O VSR infecta a camada superficial do epitélio das vias aéreas e tem a capacidade de se espalhar pelas vias aéreas condutoras o que justifica o uso da linhagem A549⁸²⁻⁸⁴ neste trabalho.

A citotoxicidade dos compostos foi avaliada através de um ensaio de viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico de MTT. Ao comparar o crescimento das duas células, A549 e MRC-5, percebeu-se que houve uma interferência importante da viabilidade celular nas duas linhagens a partir das 48h. A diminuição da viabilidade de células é mais acentuada na linhagem de carcinoma de pulmão (A549) percebida já nas 24h iniciais a partir da concentração 40 μ M com os três azoestilbenoides. No entanto, em ambas as células o REDRESV 01 demonstrou diminuir a viabilidade celular mais do que os outros compostos. Esses resultados sugerem que as diferenças estruturais dos compostos sejam responsáveis por torná-lo mais ou menos tóxico.

O REDRESV 01 apresenta na sua estrutura três grupos hidroxilas sugerindo que o grupo hidroxila possa ser o responsável pelo efeito inibitório no crescimento das linhagens estudadas. Estudos anteriores demonstraram que grupos hidroxilas na posição C-3' potencializam significativamente a citotoxicidade da molécula⁹⁰. Para este estudo considerou-se que quanto maior o valor da concentração inibitória para 50% das células (IC₅₀) menos tóxico o composto é para a célula. Analisando os valores de IC₅₀ do REDRESV 01 nota-se que ele é mais citotóxico para as duas

linhagens estudadas, pois apresentou valores de IC₅₀ menores que os outros dois compostos.

Essa diferença entre o REDRESV 01 e os demais azoestilbenoides pode ocorrer devido ao REDRESV 02 ser um monoacetilado e o REDRESV 03 ser um composto triacetilado. Estudos recentes indicam que a modificação do grupo hidroxila por uma acetila pode modificar a estrutura da molécula deixando-a mais estável. A adição de um grupamento acetila na molécula deixa-a mais lipofílica tornando-a mais permeável à entrada pela membrana celular e menos disponível para biotransformação de fase II ou oxidação^{91,92}.

Com a finalidade de elucidar esse aspecto foi calculado o índice de seletividade dos três compostos o qual mostrou que todos são seletivos para a célula tumoral, sendo o REDRESV 02 o de menor valor de IS (2,15). Para este estudo considerou-se IS significativo quando $\geq 2,0$ ⁸⁵. Ao analisarmos a curva de viabilidade celular da ribavirina constatamos que este fármaco também demonstrou ser significativamente citotóxico para as células de carcinoma de pulmão (A549) resultado que corrobora com estudos anteriores. A ribavirina tem apresentado atividade antitumoral em várias células tumorais como é o caso das leucêmicas⁹³, do câncer de mama⁹⁴ e de glioblastoma⁹⁵.

A morte celular induzida pela infecção por VSR é um fator que contribui com a exacerbação do processo inflamatório o que pode piorar o quadro de bronquiolite. Neste estudo determinamos que se um composto fosse capaz de reverter a morte celular pelo vírus (Apêndice B) este teria sido capaz de reverter o efeito citopático viral. A fim de investigar a capacidade dos compostos de inibirem o efeito citopático do VSR foram realizados três testes em momentos diferentes da infecção viral (pré-infecção -24h, simultâneo e pós-infecção).

Nossos resultados indicaram que as baixas porcentagens de inibição da replicação viral apresentadas pelo REDRESV 02 e REDRESV 03 não foram promissoras na pesquisa de novos fármacos antivirais uma vez que os compostos não foram capazes de manter um número significativamente viável de células durante a infecção. Entretanto, no tratamento pós-infecção os compostos REDRESV 02 e REDRESV 03 na concentração 20 μ M mostraram seletividade para a célula tumoral (A549) quando infectada por VSR. Os dois compostos diminuíram cerca de duas vezes mais a viabilidade da célula A549 infectada quando comparados com o controle viral.

Este resultado sugere que o composto pode de alguma forma inviabilizar o crescimento celular de células tumorais infectadas o que pode vir a ser uma alternativa para o tratamento de pessoas com câncer infectadas pelo VSR. Estudos demonstraram que pacientes oncológicos pediátricos e adultos com neoplasias malignas hematológicas (leucemia, linfoma, e outros) são pacientes de alto risco para contrair infecções respiratórias causadas por vírus como o VSR, entre outros. As infecções respiratórias causadas por vírus são a maior causa de infecções relacionadas com a morbidade e mortalidade de pacientes em tratamento de câncer^{96,97,98}. Hipotetizamos que os compostos possam agir dessa mesma maneira em outros vírus de DNA ou RNA como por exemplo aqueles capazes de causar o desenvolvimento de alguns tipos de câncer (Epstein-Barr, papiloma humano, hepatite B, herpes humano-8, hepatite C e o vírus linfotrópico de células T humano tipo 1)^{99,100}.

Os compostos também mostraram um possível efeito virucida o que pode ser um indicativo que além dos compostos terem um efeito citotóxico para as células tumorais eles ainda possam inativar as partículas circulantes quando estas células estiverem infectadas. Os azos compostos apresentam similaridade em sua estrutura com estilbenos hidroxilados do resveratrol⁷⁹ neste sentido, estudo similar mostrou que o resveratrol tem efeito citotóxico em células tumorais (HL-60) e ação antiviral contra o vírus de DNA, poliomavirus, atuando durante a síntese de DNA viral¹⁰¹. Outro estudo mostrou que um análogo do resveratrol, o DHS (4,4 -dihydroxy-*trans*-stilbene), inibe o crescimento de células de carcinoma pulmonar de Lewis (LCC) sugerindo ser uma opção para o tratamento de câncer¹⁰².

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a atividade antiviral dos azoestilbenoides REDRESV 01, REDRESV 02 e REDRESV 03. Todavia, nossos resultados indicaram que as baixas porcentagens de inibição da replicação viral dos compostos não foram promissoras na pesquisa de novos fármacos antivirais uma vez que os compostos não foram capazes de manter um número significativamente viável de células durante a infecção.

Em contra partida, os compostos apresentaram capacidade de inibir o crescimento de células tumorais de pulmão quando infectadas por VSR o que pode vir a ser uma alternativa ao tratamento do câncer em indivíduos infectados com esse tipo viral. Além disso, os compostos mostraram uma leve atividade virucida o que pode auxiliar na inativação das partículas virais além de promover a morte de células tumorais.

Os azoestilbenoides foram sintetizados em nosso laboratório e não tinham sido testados com células de carcinoma de pulmão infectadas com VSR o que atesta o ineditismo deste trabalho.

Apesar dos compostos terem apresentado resultados promissores para o tratamento de pacientes oncológicos infectados com VSR novos estudos devem ser realizados para investigar se estes resultados se confirmam com outros tipos de vírus, como por exemplo os de DNA e com outros tipos de células tumorais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Global Burden of Disease Pediatrics Collaboration. Global and National Burden of Diseases and Injuries Among Children and Adolescents Between 1990 and 2013: Findings From the Global Burden of Disease 2013 Study. **JAMA Pediatr.**; v.170, n.3, p.267-287, Jan 2016. Disponível em: <http://archpedi.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=2481809>. Acesso em: 10 abr. 2016.
2. GBD 2013. Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet.**, v. 385, n.9963, p.117-171, jan. 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673614616822>. Acesso em: 10 abr. 2016.
3. HURK, Sylvia van Drunen Littel-van den; WATKISS, Ellen R. Pathogenesis of respiratory syncytial vírus. **Current Opinion in Virology**, v. 2, p. 300–305, feb. 2012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1879625712000247>. Acesso em 10 abr. 2016.
4. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Guidelines:** Infection prevention and control of epidemic- and pandemic-prone acute respiratory infections in health care. Genebra: WHO Press, 2014. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112656/1/9789241507134_eng.pdf?ua=1. Acesso em: 12 abr. 2016.
5. BRASIL. Ministério da Saúde. Rede Interagencial de Informações para a Saúde (RIPSA). **Proporção de óbitos por infecção respiratória aguda em menores de 5 anos de idade.** Brasília, [2012]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/c07.def>. Acesso em: 12 abr. 2016.
6. REDE INTERAGENCIAL DE INFORMAÇÃO PARA A SAÚDE (RIPSA). **Indicadores básicos para a saúde no Brasil:** conceitos e aplicações. 2. ed. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2008. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/tabdata/livroidb/2ed/apresent.pdf>. Acesso em: 12 abr. 2016.
7. FRASER, Christophe et al. Factors that make an infectious disease outbreak controllable. **PNAS**, Washington, v. 10, n. 16, p. 6146-6151, abr. 2004. Disponível

em: <http://www.pnas.org/content/101/16/6146.full.pdf>. 6146–6151. Acesso em: 12 abr. 2016.

8. YEHUDA, Benguigui. As infecções respiratórias agudas na infância como problema de saúde pública. **Bol. Pneumol. Sanit**, Rio de Janeiro, v.10, n. 1, p.13-22, jun. 2002. Disponível em: http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-460X2002000100003&lng=p. Acesso em: 12 abr. 2016.

9. LIM, Faye et al. Systematic review and meta-analysis of respiratory viral coinfections in children. **Respirology**, v. 21, n. 4, p. 648–655, mai. 2016. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/resp.12741/epdf>. Acesso em: 15 abr. 2016.

10. THOMAZELLI, Luciano M. et al. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in Southeast Brazil. **J. Pediatr.**, Rio de Janeiro, v.83, n.5, set./out. 2007 Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jped/v83n5/v83n5a05.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2016.

11. SCHIEBNER, Viera. The History Of Chimpanzee Coryza Agent (Renamed As Respiratory Syncytial Virus VSR) and Acute Respiratory Disease In Children. **Vaccination Council**, 2012. Disponível em: <http://www.vaccinationcouncil.org/wp-content/uploads/2012/03/contamination-Chimpanzee-coryza-agent.pdf> Acesso em: 15 abr. 2016.

12. Candeias José Alberto N. Isolamento de vírus respiratório sincicial em crianças com quadros respiratórios agudos. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.9, n.1, p.9:27-30, jan./fev. 1967.

13. PIEDIMONTE, Giovanni. VSR infections: State of the art. **Cleve Clin J Med**.v. 82, n. 11, suppl 1, p.13-8, nov. 2015. Disponível em: [http://www.ccjm.org/index.php?id=107953&tx_ttnews\[tt_news\]=447089&cHash=487f63ac5160c0262d61c21e47c31664](http://www.ccjm.org/index.php?id=107953&tx_ttnews[tt_news]=447089&cHash=487f63ac5160c0262d61c21e47c31664). Acesso em: 15 abr. 2016.

14. HALL, Caroline Breese; et al. The Burden of Respiratory Syncytial Virus Infection in Young Children. **N Engl J Med**; v.360, p.588-598, fev. 2009.

15. LANGLEY, G.F.; ANDERSON, L.J.. Epidemiology and prevention of respiratory syncytial virus infections among infants and young children. **Pediatr Infecti Dis J.**, v. 30, n.6, p.510-517, jun. 2011.

16. SLOAN, C.; MOORE, M.L.; HARTERT, T. Impact of pollution, climate, and sociodemographic factors on spatiotemporal dynamics of seasonal respiratory viruses. **ClinTransl Sci.**, v.4, n.1, p. 48-54, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3071158/pdf/nihms-261376.pdf> Acesso em: 15 abr. 2016.
17. PAYNTER, S. Humidity and respiratory virus transmission in tropical and temperate settings. **Epidemiol Infect.**, v.143, n.06, p. 1110-1118, abr. 2015. Disponível em: http://journals.cambridge.org/download.php?file=%2FHYG%2FHYG143_06%2FS0950268814002702a.pdf&code=75fcd6ba34dbb2d6bcc11dafcdd37ae9. Acesso em: 15 abr. 2016.
18. BAWAGE, Swapnil Subhash; et al. Recent Advances in Diagnosis, Prevention, and Treatment of Human Respiratory Syncytial Virus. **Advances in Virology**, v. 2013, set. 2013.
19. LAY, Margarita; et al. Advances in understanding respiratory syncytial virus infection in airway epithelial cells and consequential effects on the immune response **Microbes and Infection**, v. 15, p. 230-242, 2013.
20. HACKING, D.; HULL, J. Respiratory Syncytial Virus - Viral Biology and the Host Response. **J Infect.**; v.45, n.1, p.18-24, jul. 2002. Disponível em: http://ac.els-cdn.com/S0163445302910157/1-s2.0-S0163445302910157-main.pdf?_tid=a8299154-1d02-11e6-9d50-00000aacb361&acdnat=1463580973_45680194594212264f777494749b83ca. Acesso em: 19 abr. 2016.
21. EASTON, Andrew J.; DOMACHOWSKE, Joseph B.; ROSENBERG, Helene F. Animal Pneumoviruses: Molecular Genetics and Pathogenesis. **Clin Microbiol Rev.**, v.17, n.2, p.390–412, abr. 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC387412/>. Acesso em: 19 abr. 2016.
22. GAN, S.W.; et al. The small hydrophobic protein of the human respiratory syncytial virus forms pentameric ion channels. **J Biol Chem.**, v.287, n.29, p.24671-24689, jul. 2012.
23. FUENTES, S.; et al. Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein. **J Virol.**, v.81, n.15, p.8361-6, ago. 2007.
24. ESPINOZA, Janyra; et al. Modulation of host adaptive immunity by hVSR proteins. **Virulence**, v. 5, n.7, p. 740–751, out. 2014.

25. CANE P. **Respiratory Syncytial Virus**. [eBook Collection (EBSCOhost)]. 1 ed. Amsterdam: Elsevier Science; 2007.
26. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Respiratory Syncytial Virus** –VSR: transmission. Disponível em: <http://www.cdc.gov/VSR/about/transmission.htm>. Acesso em: 20 abr. 2016.
27. HALL, C.B.; DOUGLAS, R.G. Jr; GEIMAN, J.M. Possible Transmission by Fomites of Respiratory Syncytial Virus. **J Infect Dis.**, v.141, n.1, p. 98-102, jan. 1980.
28. SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA. Diretrizes para o manejo da infecção causada pelo vírus sincicial respiratório. **SBP**, 2011. Disponível em: http://www.sbp.com.br/pdfs/diretrizes_manejo_infec_VSR_versao_final1.pdf. Acesso em: 15 abr. 2016.
29. CORZO-LÓPEZ, Mylene; VALDÉS-RAMÍREZ, Odalys. El virus sincicial respiratorio humano: una panoram. **Revista CENIC**. Ciencias Biológicas, La Havana (Cuba), v. 44, n. 2, mai-ago, 2013.
30. RAVI, Laxmi Iyer; et al. A systems-based approach to analyse the host response in murine lung macrophages challenged with respiratory syncytial virus. **BMC Genomics**, v.14, n.190, 2013.
31. MIDULLA, F.; et al. Respiratory syncytial virus infection of human cord and adult blood monocytes and alveolar macrophages. **Am Rev Respir Dis.**, v. 140, n.3, p. 771-7, set. 1989.
32. AL JOHANI, Sameera; AKHTER, Javed. Virology and Molecular Epidemiology of Respiratory Syncytial Virus. In: MAHBOUB, Bassam H. Respiratory Disease and Infection - A New Insight. **InTech.**, fev. 2013. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/respiratory-disease-and-infection-a-new-insight/virology-and-molecular-epidemiology-of-respiratory-syncytial-virus-VSR->. Doi: 10.5772/53916. Acesso em: 16 abr. 2016.
33. SANTOS, Mariana Spadini, GIORNO, Eliana Paes de Castro. **Bronquiolite: diretrizes para o diagnóstico e tratamento**. São Paulo, Albert Einstein, 2015.
34. VILLENAVE, Remi; SHIELDS, M.D.; POWER, U.F..Respiratory syncytial virus interaction with human airway epithelium. **Trends Microbiol.**, v.21, n.5, p.238-44, may 2013. doi: 10.1016/j.tim.2013.02.004

35. MEISSNER, HC. Viral Bronchiolitis in Children. *Viral Bronchiolitis in Children N Engl J Med*; v.374, p.62-72, jan 2016. Doi: 10.1056/NEJMra1413456.

36. HOFFMAN, Scott J.; LAHAM, Federico R., POLACK, Fernando P. Mechanisms of illness during respiratory syncytial virus infection: the lungs, the virus and the immune response. **Microbes Infect**, v.6, n. 8, p. 767-772, may 2004. doi:10.1016/j.micinf.2004.03.010

37. BARALDI, E; EL MAZLOUM, D.; MARETTI, M., et. al. Bronchiolitis: update on the management. **Early Hum Dev**, v.89, s.4, p.S94–S95, oct 2013. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-3782\(13\)70115-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-3782(13)70115-4).

38. BUDHIRAJA, Sandeep; VERMA, Rachna; SHIELDS, Michael D. The management of acute bronchiolitis in infants. **Paediatrics and Child Health**, v.23, n.7, p. 296–300, jul 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.paed.2012.11.010>

39. CORRÊA, RA.; LUNDGREN, FLC.; PEREIRA-SILVA, JL.; et. al. Diretrizes brasileiras para pneumonia adquirida na comunidade em adultos imunocompetentes- 2009. **J. bras. pneumol.**, v.35, n.6, p. 574-601, jun 2009. doi: 10.1590/S1806-37132009000600011.

40. SANTOS, Mariana Spadini; GIORNO, Eliana Paes de Castro. **Diretrizes Assistenciais Bronquiolite: Diretrizes para o diagnóstico, tratamento e prevenção**. São Paulo: Albert Einstein, 2008.

41. ALVAREZ, A; MARSON, FA; BERTUZZO, CS. Epidemiological and genetic characteristics associated with the severity of acute viral bronchiolitis by respiratory syncytial virus. **J Pediatr (RioJ)**, v.89, n.6, p.531-43, nov-dec 2013. doi: 10.1016/j.jped.2013.02.022

42. LIM, FJ; DE KLERK, N.; BLYTH, CC.; et. al. Systematic review and meta-analysis of respiratory viral coinfections in children. **Respirology**, v.21, n.4, p.648-55, may 2016. doi: 10.1111/resp.12741.

43. SIGURS, N.; BJARNASON, R.; SIGURBERGSSON, F.; et. al. Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis in Infancy Is an Important Risk Factor for Asthma and Allergy at Age 7. **Am J Respir Crit Care Med**, v.16,p. 1501–1507, may 2000. doi: 10.1164/ajrccm.161.5.9906076.

44. NICOLAI, A.; FERRARA, M.; SCHIAVARELLO, C.; et. al. Viral bronchiolitis in children: a common condition with few therapeutic options. **Early Hum Dev.**, v.89, suppl 3, p.S7-11, oct 2013. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2013.07.016.
45. SALOMÃO JUNIOR, JB; GARDINASSI, LG; SIMAS, PV.; et al. Human respiratory syncytial virus in children hospitalized for acute lower respiratory infection. **J Pediatr (Rio J)**, v.87, p.219---24. 2011. doi:10.2223/JPED.2085
46. NASCIMENTO, MS.; SOUZA, AV.; FERREIRA, AV.; et. al. High rate of viral identification and coinfections in infants with acute bronchiolitis. **Clinics (Sao Paulo)**, v.65, n. 11, p.1133---7, 2010. doi:10.1590/S1807-59322010001100014
47. RALSTON, SL.; LIEBERTHAL, AS.; MEISSNER, HC.; et al. Clinical practice guideline: the diagnosis, management, and prevention of bronchiolitis. **Pediatrics** v.134, n.5, p.e1474-e1502, nov 2014. doi: 10.1542/peds.2014-2742.
48. HAN, LL; ALEXANDER, JP.; ANDERSON, LJ. Respiratory Syncytial Virus Pneumonia among the Elderly: An Assessment of Disease Burden. **J Infect Dis.**, v.179, n.1, p.25-30, jan 1999.
49. FALSEY, AR.; HENNESSEY, PA.; FORMICA, MA.; et. al. Respiratory syncytial virus in Elderly and High-risk adults. **N Engl J Med.** v. 352, n.17, p.1749-59, apr 2005. doi: 10.1056/NEJMoa043951.
50. FALSEY, Ann R.; WALSH, Edward E. Respiratory Syncytial Virus Infection in Adults. **Clin Microbiol Rev.**, v.13, n.3, p. 371–384, jul 2000.
51. VILA-CORCOLES, A.; OCHOA-GONDAR, O.; RODRIGUEZ-BLANCO, T. Epidemiology of community-acquired pneumonia in older adults: A population-based study. **Respir Med.**, v.103, n.2, p.309-16. feb 2009. doi: 10.1016/j.rmed.2008.08.006
52. PILOTTO, A.; ADDANTE, F.; FERRUCCI, L.; et al. The multidimensional prognostic index predicts short- and long-term mortality in hospitalized geriatric patients with pneumonia. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.**, v.64, n.8, p.880-887, abr 2009.
53. DIVAN, LA.; HIRSCHHEIMER, MR.; DAMACENO, N.; et. al. **Protocolo sobre pneumonias agudas adquiridas na comunidade.** São Paulo: Hospital Infantil menino Jesus, [20--?]. Disponível em: http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/upload/HIMJ_protocolo_pneumoni as_1254773706.pdf. Acesso em: 16 abr 16.

54. NAIR, H.; NOKES, DJ.; GESSNER, BD.; et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. **Lancet**, v.375, n.9725, p.1545–55, may 2010. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60206-1.

55. Ministério da Saúde/SE/DATASUS. **Sistema de Informações Hospitalares do SUS - SIH/SUS IBGE: base demografica**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?idb2012/d29.def>> Acesso em 10 mar 2017.

56. MOSENFAR, Zab. **Viral pneumonia treatment management**. [online]. Disponível em: <http://emedicine.medscape.com/article/300455-treatment#d8>. Acesso em: 17 abr 2016.

57 GRAHAM, BS.; ANDERSON, LJ. Challenges and Opportunities for Respiratory Syncytial Virus Vaccines. **Curr Top Microbiol Immunol.**, v.372, p.391-404, 2013. doi: 10.1007/978-3-642-38919-1_20.

58. MAZUR NI.; MARTINÓN-TORRES, F.; BARALDI, E.; et. al. Lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus: current management and new therapeutics. **Lancet Respir Med.**, v.3, n.11, p.888-900, nov 2015. doi: 10.1016/S2213-2600(15)00255-6.

59. MEJIAS, A.; RAMILO, O.. New options in the treatment of respiratory syncytial virus disease . **J Infect.**; v.71, suppl 1, p.S80-7, jun 2015. doi: 10.1016/j.jinf.2015.04.025.

60. AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Updated guidance for palivizumab prophylaxis among infants and young children at increased risk of hospitalization for respiratory syncytial virus infection. **Pediatrics**, v.134, n.2, p.415-20, aug 2014. doi: 10.1542/peds.2014-1665.

61. ANDERSON, LJ.; DORMITZER, PR.; NOKES, DJ.; et. al.. Strategic priorities for respiratory syncytial virus (VSR) vaccine development. **Vaccine**, v.31, suppl. 2, p. B209e15, abr 2013. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.11.106.

62. MODJARRAD, K.; GIERSING, B.; KASLOW, DC.; et. al.. Consultation on Respiratory Syncytial Virus Vaccine Development Report from a World Health Organization Meeting held on 23–24 March 2015. **Vaccine**, v.34, n.2, p.190-7, jan 2016. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.05.093.

63. LUOTO, R.; RUUSKANEN, O.; WARIS, M.; et. al. Prebiotic and probiotic supplementation prevents rhinovirus infections in preterm infants: a randomized,

placebo-controlled trial. **J Allergy Clin Immunol**, v. 133, n. 2, p. 405-13, fev 2014. doi: 10.1016/j.jaci.2013.08.020.

64. OBATA, K.; KOJIMA, T.; MASAKI, T.; et. al. Curcumin Prevents Replication of Respiratory Syncytial Virus and the Epithelial Responses to It in Human Nasal Epithelial Cells. **PLoS ONE**, v.8, n.9, p. e70225, sep 2012. doi:10.1371/journal.pone.0070225

65. YANG, T.; Li, S.; Zhang, X.; et. al. Resveratrol, sirtuins, and viruses. **Rev. Med. Virol.**; v. 25, n.6, p.431–445, nov 2015. doi: 10.1002/rmv.1858.

66. PALAMARA, AT.; NENCIONI, L.; AQUILANO, K.; et. al. Inhibition of influenza a virus replication by resveratrol. **J Infect Dis.**, v.191, n.10, p.1719-29, may 2005.

67. KOMARAVELLI, N.; KELLEY, JP.; GAROFALO, MP.; et. al. Role of dietary antioxidants in humanmetapneumovirus infection. **Virus Research**, v. 200, p. 19–23, mar 2015. doi: 10.1016/j.virusres.2015.01.018.

68. XIE, XH.; ZANG, N.; LI, SM.; et. al. Resveratrol Inhibits Respiratory Syncytial Virus-Induced IL-6 Production, Decreases Viral Replication, and Downregulates TRIF Expression in Airway Epithelial Cells. **Inflammation**, v.35, n.4, p.1392-401, aug 2012. doi: 10.1007/s10753-012-9452-7.

69. BAESSO, Juliana Souza Ribeiro. **Síntese e caracterização de novos azoestilbenoides como potenciais agentes antineoplásicos**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

70. SOUTO, A. A. **Composto, composição farmacêutica, uso da composição farmacêutica, método de tratamento de doenças associadas a infecções antimicrobianas e processo de preparação de um composto**. BR n. 1020150321627, 21 dez 2015.

71. SOUTO, A. A, BAESSO, J.S.R.; SANTOS, P.K.; VIEZZER, C.; ADAMI, B.S. **Composto, composição farmacêutica, uso da composição farmacêutica, método de tratamento de neoplasias**. BR n. 1020150321686, 21 dez 2015.

72. SOUTO, A. A.; BAESSO, J.S.R.; SANTOS, P.K. **Composto, composição farmacêutica, uso da composição farmacêutica e método de tratamento de leishmaniose**. BR n. 1020150321660, 21 dez 2015.

71. SPENCER, JP.; ABD EL MOHSEN, MM.; MINIHANE. AM.; MATHERS JC. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. **Br J Nutr**, v.99, n.1, p.12-22, jan 2008.

72. Rau Hermann. Azo Compounds. In: Dürr, Heinz; Bouas-Laurent, Henri (Ed.) **Photochromism – Molecules and Systems**. EUA: Elsevier. 2003.

73. Knoll Helmut. Photoisomerism of azobenzenes. In: Horspool, Willian; Lenci, Francesco (Ed.). **CRC Handbook of organic photochemistry and photobiology**. 2.ed. CRC Press, 2004.

74. HONG, Yi Guo.; GU, Ji-Dong. Physiology and biochemistry of reduction of azo compounds. *Shewanella* strains relevant to electron transport chain. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.88, n.3, p.637–643, oct 2010. doi:10.1007/s00253-010-2820-z.

75. SLOKAR, YM.; LE MARECHAL, M. Methods of Decoloration of Textile Wastewaters. **Dyes and Pigments**, v.37, n.4, p.335-356, may 1998. doi: 10.1016/S0143-7208(97)00075-2.

76. TATSUTA, M.; KITAO, T. Reagent for Detecting and Diagnosing Cancer. **Journal Pharmacology**, v.1, p.207-247,1989.

77. SONG, S.; et. al. Synthesis of hydroxyl-substituted phenylnaphthalenes as inhibitors of tyrosinase. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.17, p.461-464, 2007.

78. PAREKH, Nikhil; et. al.. Study on Antibacterial Activity for Multidrug Resistance Stain by using henyl Pyrazolones substituted 3-amino 1H-pyrazolon (3,4-b) Quinoline Derivative In Vitro Condition. **Intl J PharmTech Res**, v.3, n.1, p. 540-548, jan-mar 2011.

79. SONG, YM.; HA, YM.; KIM, JA.; CHUNG, KW.; UEHARA, Y.; LEE, KJ.; CHUN, P.; et al. Synthesis of novel azo-resveratrol, azo-oxyresveratrol and their derivatives as potent tyrosinase inhibitors. **Bioorg Med Chem Lett.**, v.22, n.24, p.7451-5, dec 2012. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.10.050.

80. SWATI, Ginni; KARNAWAT, Romila; SHARMA, IK.; VERMA, PS. Synthesis, characterisation and antimicrobial screening of some azo compounds. **IJABPT.**, v.2, n.2, p. 332-338, abr-jun 2011.

81. PIOTTO, S.; et. al. Small azobenzene derivatives active against bacteria and fungi. **Eur J Med Chem.**, v.68, p.178-184, oct 2013. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.07.030

82. LIEBER, M.; SMITH, B.; Szakal, A.; Nelson-Rees, W.; Todaro G. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. **Int. J. Cancer**, v.17, n.1, p.62-70, jan 1976.

83. MEROLLA, R.; REBERT, N.A.; Tsviste, P.T.; Hoffmann, S.P.; Panuska, J R. Respiratory syncytial virus replication in human lung epithelial cells: inhibition by tumor necrosis factor- α and interferon- β . **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.152, n.4 (pt 1), p.1358-66, oct 1995.

84. GAROFALO, R.; MEI, F.; ESPEJO, R.; YE, G.; HAEBERLE, H.; BARON,S.; et. al. Respiratory syncytial virus infection of human respiratory epithelial cells up-regulates class I MHC expression through the induction of IFN- β and IL-1 α . **J. Immunol.**, v.157, n.6, p. 2506-13. sep 1996.

85. SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J.M. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann K, (ed.). **Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity**. London: Academic Press, 1990. p. 71-133.

86. CAGNO, V.; CIVRA, A.; KUMAR, R.; PRADHAN, S.; DONALISIO, M.; SINHA, B.N. ; et. al. Ficus religiosa L. bark extracts inhibit human rhinovirus and respiratory syncytial virus infection in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v.176, p. 252–257, Dec. 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>. Acesso em: 13 jan 2017.

87. FADDA, A.A.; ABDEL-LATIF, E.; EL-MEKAWY, R.E. Synthesis of Some New Arylazothiophene and Arylazopyrazole Derivatives as Antitumor Agents. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 3, n. 2, p.148-157, Apr. 2012. Disponível em: <https://www.scirp.org>. Acesso em: 17 dez 2016.

88. ZAREI, M.; MOHAMADZADEH, M. 3-Thiolated 2-azetidinones: synthesis and in vitro antibacterial and antifungal activities. **Tetrahedron**, v. 67, n. 32, p. 5832-5840, May 2011. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>. Acesso em: 13 dez 2016.

89. TONELLI, M.; VAZZANA, I. ; TASSO, B.; BOIDO, V.; SPARATORE, F.; FERMEGLIA, M.; et. al.. Antiviral and cytotoxic activities of aminoarylazo compounds and aryltriazene derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17,n.13, p. 4425–4440, Jul. 2009. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>. Acesso em: 12 jan 2017.

90. ROBERTI, M.; PIZZIRIANI, D.; SIMONI, D.; RONDANIN, R.; BERRUCHELLO, R.; BONORA, C.; et al.. Synthesis and biological evaluation of resveratrol and analogues as apoptosis-inducing agents. **J. Med. Chem.**, v. 46, p. 3546-3554, Jul. 2003. Disponível em: <http://pubs.acs.org>. Acesso em: 9 jan 2017.

91. DELMAS, D.; AIRES, V.; LIMAGNE, E.; DUTARTRE, P.; MAZUÉ, F.; GHIRINGHELLI, F.; et al. Transport, stability and biological activity of resveratrol. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1215, p. 48-59, Jan. 2011. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com>. Acesso em: 11 jan 2017.

92. VLACHOGIANNI, I. C. ; FRAGOPOULOU, E.,; KOSTAKIS, I.K.,; ANTONOPOULOU, S. In vitro assessment of antioxidant activity of tyrosol, resveratrol and their acetylated derivatives. **Food Chemistry**, v. 177, p. 165-173, Jun. 2015. Disponível em: www.sciencedirect.com. Acesso em: 19 jan 2017.

93. PETTERSON, F.; YAU, C.; DOBOCAN, M.C.; CULJKOVIC-KRALJACIC, B.; RETRUYEY, H.; PUCKETT, R.; et al.. Ribavirin treatment effects on breast cancers overexpressing eIF4E, a biomarker with prognostic specificity for luminal B-type breast cancer. **Clin Cancer Res.**, v. 17, n. 9, p. 2874–2884, May 2011. Disponível em: <http://clincancerres.aacrjournals.org>. Acesso em: 22 jan 2017.

94. KOKENY S.; PAPP, J.; WEBER, G.; VASZKO, T.; CARMONA-SAEZ, P.; OLAH, E. Ribavirin acts via multiple pathways in inhibition of leukemic cell proliferation. **Anticancer Res.**, v. 29, n. 6, p. 1971–1980, Jun. 2009. Disponível em: <http://ar.iiarjournals.org>. Acesso em: 26 jan 2017.

95. VOLPIN, F.; CASAOS, J.; SESEN, J.; MANGRAVITIL, A.; CHOIL, J.; GORELICK, N. Use of an anti-viral drug, Ribavirin, as an anti-glioblastoma therapeutic. **Oncogene**, 1–11, Dec. 2016. Disponível em: <http://www.nature.com/onc>. Acesso em: 31 jan 2017.

96. LEHNERS, N.; TABATABAI J.; PRIFERT, C. et al. Long-Term Shedding of Influenza Virus, Parainfluenza Virus, Respiratory Syncytial Virus and Nosocomial Epidemiology in Patients with Hematological Disorders. **PloS One**, v.11, n. 2, p.1-17, Feb. 2016. Disponível em: <http://journals.plos.org>. Acesso em: 28 jan 2017.

97. EI SALLEBY, C.M.; SOMES, G.W.; DE VICENZO, J.P.; GAUR, A.H. Risk factors for severe respiratory syncytial virus disease in children with cancer: the importance of lymphopenia and young age. **Pediatrics**, v. 121, n. 2, p. 235- 43, Feb. 2008. Disponível em: <http://pediatrics.aappublications.org>. Acesso em: 29 jan 2017.

98. RICHARDSON, L.; BRITE, J.; Del CASTILLO, M. et al. Comparison of respiratory virus shedding by conventional and molecular testing methods in patients with haematological malignancy. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 4, p. 380 e.1-380 e.7, Apr. 2016. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>. Acesso em 10 fev. 2017.

99. LIAO, J. B. Viruses and Human Cancer. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 79, p.115-122, Dec. 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em 7 fev 2017.

100. DAMANIA, B. DNA tumor viruses and human cancer. **Trends in Microbiology**, v. 15, n.1, p. 38-44, Jan. 2007. Disponível em: <http://www.cell.com>. Acesso em 26 jan 2017.

101. BERARDI, Valerio; et. al. Resveratrol exhibits a strong cytotoxic activity in cultured cells and has an antiviral action against polyomavirus: potential clinical use. **J Exp Clin Cancer Res.**, v.28, p.96, jul 2009. doi: 10.1186/1756-9966-28-96.

102. SAVIO, Monica; FERRARO, Daniela; MACCARIO, Cristina. Resveratrol analogue 4,4'-dihydroxy-*trans*-stilbene potently inhibits cancer invasion and metastasis. **Sci Rep.**, v.6, p.19973, feb 2016. doi: 10.1038/srep19973

EPIÍGRAFE

1. MACHADO, Antonio. Antología poética. Madrid: Editorial EDAF, 2005. 250p. (Cantares XXIX)

2. SANTO AGOSTINHO (354-430d.C.). Livro XI. In: **Confissões**. Tradução de J. Oliveira Santos e A. Ambrosio de Pina. 2.ed. São Paulo: Abril Cultural, 1980. p. 243-244.

ANEXO

Carta de submissão do manuscrito resultante deste trabalho para a revista *Biological Chemistry* – DeGruyter e Artigo original:

De: Biological Chemistry <onbehalfof@manuscriptcentral.com>

Data: 9 de setembro de 2019 15:49:10 BRT

Para: arigonv@pucri.br

Assunto: Your manuscript ID BIOLCHEM-2019-0364 - submission confirmation

Responder A: biol.chem.editorial@degruyter.com

09-Sep-2019

Dear Dr. Souto,

Your manuscript entitled "Synthesis and in vitro Biological Activity of Azo Compounds on Respiratory Syncytial Virus Infection" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Biological Chemistry.

The manuscript ID is BIOLCHEM-2019-0364.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when contacting the office for questions. If there are any changes in your affiliation, street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/bc> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/bc>.

Thank you for submitting your manuscript to Biological Chemistry.

Kind regards,
Torsten Krueger
Biological Chemistry

For news highlights from this journal and other publications, see our new service Science Discoveries at <http://sciencediscoveries.degruyter.com/>

**Synthesis and *in vitro* Biological
Activity of Azo Compounds on
Respiratory Syncytial Virus
Infection**

Margarita A.P. Cortés^{1*}, Karen Magnus^{1*},
Bárbara N. Porto^{2a}, André A. Souto^{1§}

¹ Department of Pure Chemistry, School of Chemistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul - PUCRS, Porto Alegre, 90619900, Brazil.

² Laboratory of Clinical and Experimental Immunology, Infant Center, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul – PUCRS, Porto Alegre, 90619900, Brazil

^a Centre for the Study of Complex Childhood Diseases (CSCCD), Hospital for Sick Children, SICKKIDS, Toronto, ON M5G 0A4, Canadá. (present address).

*Margarita A.P. Cortés and Karen Magnus contributed equally to this work as first authors.

§**Corresponding author:** André A. Souto. Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul – PUCRS. Department of Pure Chemistry, School of Chemistry. Av. Ipiranga, 6681 – prédio 12A- Phone: +55 51 3320.3545 - Porto Alegre, 90619900, Brazil. E-mail: arigony@pucrs.br.

Running Title:

**Activity of Azo Compounds on Respiratory
Syncytial Virus**

ABSTRACT

The human syncytial virus is considered one of the causes for increased morbidity and mortality in adults with cancer. We evaluated *in vitro* biological activity of azo compounds synthesized in our laboratory against human respiratory syncytial virus. Cytotoxicity and virucidal activity of the compounds were evaluated by MTT assay. Compounds **1a** and **1b** showed tumor cell selectivity and virucidal activity against the virus. Acetylated azo compounds appear to be promising for the development of new drugs for the treatment of hRSV infection in cancer patients, and further research is needed to deepen these findings.

Keywords: A549; antiviral; cancer; virucidal; hRSV; MRC-5.

Respiratory viral infections are considered the leading causes of increased morbidity and mortality in cancer patients (Hijano et al., 2018). In adult individuals diagnosed with cancer, human respiratory syncytial virus (hRSV) infection reaches the lower respiratory tract in approximately 30% to 50% of patients, while mortality from pneumonia can exceed 75% (Hijano et al., 2018). HRSV is an enveloped virus of the genus *Orthopneumovirus* and *Human orthopneumovirus* species (Rima et al., 2017). There are only two drugs approved by the Food and Drug Administration (FDA) for treatment, Palivizumab monoclonal antibody, and antiviral Ribavirin (Griffiths et al., 2017). However, both drugs are costly and narrowly indicated. Azos compounds (AZc) are molecules that incorporate the functional group -N = N- attached directly to aromatic rings (Rasheed, 2011). Despite being known

for their dyeing properties, azo compounds have been identified as promising molecules for the development of new drugs. Among the biological effects of AZc were described the antineoplastic (Sharma et al., 2013), anti-inflammatory (Kennedy et al., 2011) and antiviral action against hRSV (Tonelli et al., 2009). Recently our research group synthesized a set of azo compounds based on Resveratrol analogs, which have shown promise in inhibiting tumor cell growth (Baesso, J.; et. al., 2017). In this study, we evaluated, *in vitro*, the role of these compounds in the treatment of hRSV-infected tumor lung cells. The AZc molecules tested were synthesized through an unacetylated single compound azo, resulting in compounds that differ in their structure by the number of acetyl groups (Figure 1).

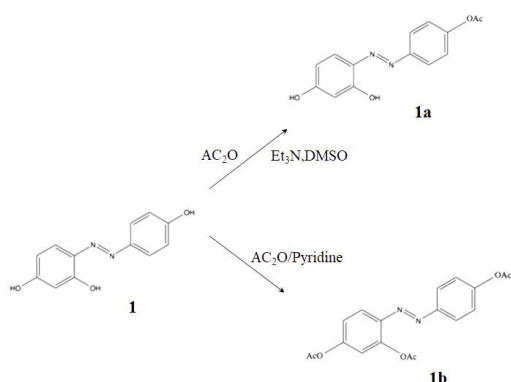


Figure 1: Schematic representation of the synthesis of azo-compounds. **(1)** The product was obtained according to Tedder and Theaker (1958). The phenol (0.01 mole) was dissolved in a mixture of acetone and water (1:2). Sodium nitrite (0.145 mole) was added to this solution, followed by 2N hydrochloric acid (0.01 mole), and the combined solution was kept at a constant temperature of 0°C in the dark. Samples were withdrawn periodically, treated with excess of sulphamic acid, and neutralised with sodium hydrogen carbonate. Excess of resorcinol was added to the neutralised solution which was then made strongly alkaline (pH 10) by 1 M sodium hydroxide. After 2 hr at room temperature the crude dye was precipitated by dilute hydrochloric acid. The crude dyes were isolated by filtration and recrystallised from aqueous. The yield of 72 %. The **1** was characterized as follows: Mp: 220°C; IR (KBr): $\nu = 3425,80, 3201,83, 1592,19, 1251,51$; UV-

vis: λ (acetonitrile/water) = 230nm; RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 13.363$ (s, 1H, OH), 9.951 (s, 1H, OH), 9.737 (s, 1H, OH), 7.690-7.579 (m, 3H, Ar-H), 6.902-6.864 (m, 2H, Ar-H), 6.489-6.461 (m, 2H, Ar-H), 6.303-6.297 (m, 1H, Ar-H); RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD): $\delta = 163.03, 161.16, 156.64, 145.30, 134.66, 133.45, 124.37, 116.94, 109.46, 104.02$. **(1a)** The product was obtained according to Acerson and Andrus (2014) A flame dried 10 mL round bottomed flask was charged with **1** (0.11 mmol) and 5 mL anhydrous DMSO. Triethylamine (0.11 mmol) was added to the reaction flask and then stirred for 20 min. Acetic anhydride (0.11 mmol) was added to the reaction flask and allowed to stir for 1 hr. The reaction was then quenched with distilled H_2O . The reaction mixture was extracted with 10 mL diethyl ether three times. The organic layers were dried with anhydrous Na_2SO_4 . Concentration and chromatography gave the product **1a** (10 %) as a white solid. The **1a** was characterized as follows: Mp: 130-132°C; IR (KBr): $\nu = 3495,94, 1760,37, 1371,79, 1191,01$; UV-vis: λ (acetonitrile/water) = 272nm; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 13.362$ (s, 1H, OH), 13.156 (s, 1H, OH), 7.798-7.648 (m, 3H, Ar-H), 7.260-7.185 (m, 1H, Ar-H), 6.814-6.723 (m, 2H, Ar-H), 6.276-6.271 (m, 1H, Ar-H), 2.411-2.334 (d, 3H, CH_3); RMN

13C (100 MHz, CDCl₃): δ = 169.79, 158.85, 154.01, 152.98, 144.26, 133.59, 132.96, 123.83, 122.45, 116.16, 115.83, 113.43, 108.91, 21.24. (**1b**) The product was obtained according to Gelo-Pujic et al. (2008). To the slurry of **1b** (0.133 mmol) in the acetic anhydride (76 ml, 6 eq) pyridine (3 eq) was added at room temperature over a span of 40 min. Reaction was completed within 30 min after all pyridine was added. Product was obtained by precipitation in cold water (400 mL at 10°C), filtration and three successive washing with water. The remaining pyridine was eliminated by washing with 5% HCl (500 mL) and the cake was further washed with water until pH 5 was reached. The yield of 94%. The **1b** was characterized as follows: 115-122°C; IR (KBr): ν = 3065,77, 1760,37, 1588,21, 1191,01; UV-vis: λ (acetonitrile/water) = 355nm; RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.876-7.821 (m, 3H, Ar-H), 7.259-7.224 (m, 2H, Ar-H), 7.159-7.021 (m, 2H, Ar-H), 2.380-2.262 (m, 7H, COCH₃); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ = 169.12, 168.58, 153.21, 150.40, 149.44, 141.63, 124.16, 122.27, 119.74, 118.27, 116.80, 21.17, 20.69.

The cytotoxicity and virucidal activity of the compounds were evaluated by MTT colorimetric assay. Compound **1**

(non-acetylated) was the most cytotoxic, with lower IC₅₀ values, probably due to structural differences between molecules that can make them more or less toxic (Table 1).

Compound	IC ₅₀ [μ M]					
	48h			72h		
	MRC-5	A549	SI	MRC-5	A549	SI
1 (Non-acetylated)	56.52	31.35	1.8	6.6	10.62	0.62
1a (Monoacetylated)	>160	36.68	4.36	91.31	29.15	3.13
1b (Triacetylated)	127.5	41.1	3.10	150.1	30.77	4.87

The Azo compounds did not show cellular cytotoxicity in 24 hours of treatment.
 IC₅₀= Half-maximal inhibitory concentration 50; SI= Selective index

Table 1: Evaluation of cytotoxicity of compounds. A549 (ATCC® CCL-185TM) and MRC-5 (ATCC® CCL171TM) cells lines (5x10³ cells/200 μ l – 96-well plates) were plated in DMEM medium containing 10% Fetal Bovine Serum and different concentrations (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M, 160 μ M) of Azo compounds **1** (Non-acetylated), **1a** (Monoacetylated) or **1b** (Triacetylated). The cells were incubated for 24h, 48h and 72h at 37 °C under 5% CO₂. The vehicle (0.1% DMSO) was used as control. The determination of cellular cytotoxicity was performed by MTT assay as described by Santos da Silva et al. (2018). IC₅₀ was calculated using GraphPad Prism software, version 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). The selectivity

index (SI) for the activity of the compounds on the cell lines was determined as $SI = IC_{50} \text{ MRC-5} / IC_{50} \text{ A549}$ and considered as interesting when $SI \geq 3.0$ (Bézivin et al., 2003).

This compound has in its structure three hydroxyl groups (Figure 1) suggesting that the hydroxyl group may be responsible for the inhibitory effect on the growth of the studied cell lines. This compound has in its structure three hydroxyl groups (Figure 1) suggesting that the hydroxyl group may be responsible for the inhibitory effect on the growth of the studied cell lines. Previous studies have shown that hydroxyl groups at the C-3 position significantly potentiate the cytotoxicity of a compound (Roberti et al., 2003; Wang et al., 2017). This structural difference between the compounds may also explain the results of the selectivity index (SI) found (Table 1), which suggests a relationship where the more acetyls a compound has in its structure, the

more selective it will be. Compounds **1a** (monoacetylated) and **1b** (triacetylated) showed the best cytotoxic selectivity index at 72h for the tumor cell studied (Table 1), with the triacetylated compound having the best selective activity. These results are similar to those found in previous studies in which the conclusion showed that modification of the hydroxyl group by acetyl could modify the structure of the molecule, making it more lipophilic (Delmas et al., 2011; Vlachogianni et al., 2015), less cytotoxic, more permeable to cell membrane entry and less available for phase II biotransformation or oxidation (Delmas et al., 2011). Cell death induced by hRSV infection is a factor that contributes to the exacerbation of the inflammatory process and may worsen respiratory infection. To evaluate the antiviral action of the molecules, it was decided to evaluate the protective effect of compounds **1a**

and **1b** against cell death caused by the virus. Therefore, we performed 24h pretreatment and postinfection treatment tests. In both cases, the compounds were not shown to have antiviral action as they were unable to protect cells from death caused by the virus (results not shown). It may be because the cell affects the molecule, making it unavailable or inactive in infection. However, the virus, when incubated directly with the compound for 1h before infection showed a significant reduction in the viral cytopathic effect (Figure 2A). In order to exclude the effect of the tumor cell on the molecule, the plaque reduction assay was performed using only Vero cell line to assess viral inactivation. The results showed that compounds **1a** and **1b** somewhat inactivated the viral particle, being dose-dependent (Figure 2B).

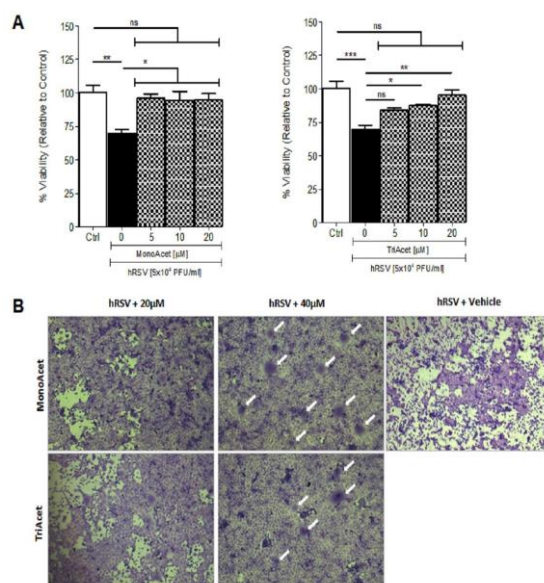


Figure 2: Virucidal activity of the compounds. **(A)** hRSV (5×10^4 PFU/ml) was incubated for 1 hour (at 37°C) with 5, 10, 20 µM of the compounds (Monoacetylated or Triacetylated) or vehicle (0.1% DMSO) (Cagno et al., 2015). The A549 cells were then infected with the virus for 2 hours in serum free media. At the end of incubation, the media was removed and replaced with fresh medium and cells cultured for 72h. Evaluation of the cell viability was performed by MTT assay (Santos da Silva et al., 2018). Data representative independent experiments and expressed in mean±SEM. Data analyzed using One-Way Anova with Bonferroni's post-test ($p < 0.05$). **(B)** The assay of plaque reduction for viral inactivation effect evaluation was performed using Vero (ATCC® CCL- 81™) cell line. Vero cells were plated in 24-well plates (2×10^5 cells/1ml) in DMEM

medium supplemented with 10% fetal bovine serum, at 37°C under 5% CO₂ during 24 hours for adherence of the cells. hRSV (5x10⁴ PFU/ml) was incubated for 1 hour (at 37°C) with 20 or 40 μM of the compounds (Monoacetylated or Triacetylated). Vehicle (0.1% DMSO) was used as control. After incubation, the Vero cells were infected with the virus for 2 hours (at 37°C under 5% CO₂) in serum-free media. The medium was replaced, and F12-DMEM medium and carboxymethylcellulose were added in a ratio of 1:1. Cells were incubated for 6 days (at 37°C and 5% CO₂) for observation of the cytopathic effect. The monolayer was fixed with cold methanol and stained with 1% crystal violet (Chang et al., 2013) and images obtained using 200x magnification. The hRSV strain A2 was used in this experiment.

It is noticed that, although syncytia formation occurred, the cell mat is more intact with the presence of the compounds compared to the one infected with the virus alone. This demonstrates that acetylated AZc somehow exert a direct antiviral action on the virus, suggesting once again that structural modification of AZc is

promising in the search for alternatives to the treatment of hRSV infection. HRSV is a virus enveloped by a lipid membrane derived from the host plasma membrane at the time of viral particle budding (Bajimaya et al., 2017), and since the compounds have received acetyl clusters, the lipophilicity of the molecule is increased, which makes it more permeable and possibly facilitates the entry of azo compound into the viral envelope. This permeability may probably contribute to viral envelope disruption altering, thereby, the virus's ability to absorb on the host cell and/or causing damage to its genetic material, which could make virus replication impossible after infection. Viral entry into the host cell mediated by fusion of the virus cell membrane is the major factor in the hRSV life cycle. This membrane fusion is fundamental for both virus entry and cell-cell fusion (syncytia formation) (Aguilar et al.,

2016). Destabilizing this fusion may be an attractive target for the development of new drugs. Although compounds **1a** and **1b** had no antiviral action against hRSV, they had a virucidal effect directly on the virus, decreasing syncytia formation, which may be a way of disrupting this cell-cell fusion. In this study, azo compounds synthesized in our laboratory were first investigated in hRSV-infected lung carcinoma cells. The structure-activity relationship of AZc revealed that the presence of acetyl clusters made them more selective for the lung cancer tumor cell (A549), besides presenting virucidal capacity against hRSV virus. An alternative for future studies would be to introduce into the molecule a group capable of generating a compound that combines the antitumor potential and the ability to inhibit viral replication concomitantly. This would help reduce the adverse effects caused by the combination of different drugs in the

treatment of cancer and infection, as well as reduce drug costs for the health care system. Compounds **1a** and **1b** appear to be promising for the development of new drugs for the treatment of hRSV infection in cancer patients, and further research is needed to deepen these findings.

Acknowledgments

This study was financed in part by *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)* – Finance Code 001.

References

- Acerson, M.J., and Andrus, M.B. (2014). Selective esterification of the polyphenol resveratrol at the 4'-position. *Tetrahedron Lett.* *55*, 757–760.
- Aguilar, H.C., Henderson, B.A., Zamora, J.L., and Johnston, G.P. (2016). Paramyxovirus Glycoproteins and the Membrane Fusion Process.

- Curr. Clin. Microbiol. Reports 3, 142–154.
- Baesso, J.; Santos, P.; Souto, A.; Viezzer, C.; Adami, B. (2017). Composto, composição farmacêutica, uso da composição farmacêutica, método de tratamento de neoplasias e processo de preparação. (Brazil. BR 102015032168-6.).
- Bajimaya, S., Frankl, T., Hayashi, T., and Takimoto, T. (2017). Cholesterol is required for stability and infectivity of influenza A and respiratory syncytial viruses. *Virology* 510, 234–241.
- Bézivin, C., Tomasi, S., Lohézic-Le Dévéhat, F., and Boustie, J. (2003). Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine* 10, 499–503.
- Cagno, V., Civra, A., Kumar, R., Pradhan, S., Donalisio, M., Sinha, B.N., Ghosh, M., and Lembo, D. (2015). *Ficus religiosa* L. bark extracts inhibit human rhinovirus and respiratory syncytial virus infection in vitro. *J. Ethnopharmacol.* 176, 252–257.
- Chang, J.S., Yeh, C.F., Wang, K.C., Shieh, D.E., Yen, M.H., and Chiang, L.C. (2013). Xiao-Qing-Long-Tang (Sho-seiryu-to) inhibited cytopathic effect of human respiratory syncytial virus in cell lines of human respiratory tract. *J. Ethnopharmacol.* 147, 481–487.
- Delmas, D., Aires, V., Limagne, E., Dutartre, P., Mazué, F., Ghiringhelli, F., and Latruffe, N. (2011). Transport, stability, and biological activity of resveratrol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1215, 48–59.
- Gelo-Pujic, M., Desmurs, J.R., Kassem, T., Delaire, S., Adao, A., and Tawil, D. (2008). Synthesis of new antioxidant conjugates and their in vitro hydrolysis with Stratum corneum enzymes. *Int. J. Cosmet. Sci.* 30, 195–204.
- Griffiths, C., Drews, S.J., and Marchant, D.J. (2017). Respiratory

- syncytial virus: Infection, detection, and new options for prevention and treatment. *Clin. Microbiol. Rev.* *30*, 277–319.
- Hijano, D.R., Maron, G., and Hayden, R.T. (2018). Respiratory Viral Infections in Patients With Cancer or Undergoing Hematopoietic Cell Transplant. *Front. Microbiol.* *9*, 3097.
- Kennedy, D.A., Vembu, N., Fronczek, F.R., and Devocelle, M. (2011). Synthesis of mutual azo prodrugs of anti-inflammatory agents and peptides facilitated by α -aminoisobutyric acid. *J. Org. Chem.* *76*, 9641–9647.
- Rasheed, O.K. (2011). *New Directions in the Chemistry of Azo-compounds*.
- Rima, B., Collins, P., Easton, A., Fouchier, R., Kurath, G., Lamb, R.A., Lee, B., Maisner, A., Rota, P., and Wang, L. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Pneumoviridae. *J. Gen. Virol.* *98*, 2912–2913.
- Roberti, M., Pizzirani, D., Simoni, D., Rondanin, R., Baruchello, R., Bonora, C., Buscemi, F., Grimaudo, S., and Tolomeo, M. (2003). Synthesis and Biological Evaluation of Resveratrol and Analogues as Apoptosis-Inducing Agents.
- Santos da Silva, G.N., Monti Atik, D., Antunes Fernandes, J.L., de Freitas do Nascimento, D., Fazolo, T., Duarte de Souza, A.P., and Baggio Gnoatto, S.C. (2018). Synthesis of three triterpene series and their activity against respiratory syncytial virus. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. *351*, 1800108.
- Sharma, R., Rawal, R.K., Gaba, T., Singla, N., Malhotra, M., Matharoo, S., and Bhardwaj, T.R. (2013). Design, synthesis and ex vivo evaluation of colon-specific azo based prodrugs of anticancer agents. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* *23*, 5332–5338.
- Tedder, J.M., and Theaker, G. (1958). The direct introduction of the diazonium group into aromatic nuclei. Part IV. The preparation of diazonium salts from phenols. *J. Chem. Soc.* *521*,

2573–2577.

Tonelli, M., Vazzana, I., Tasso, B., Boido, V., Sparatore, F., Fermeglia, M., Paneni, M.S., Posocco, P., Pricl, S., Colla, P. La, et al. (2009). Antiviral and cytotoxic activities of aminoarylazo compounds and aryltriazene derivatives. *Bioorganic Med. Chem.* *17*, 4425–4440.

Vlachogianni, I.C., Fragopoulou, E., Kostakis, I.K., and Antonopoulou, S. (2015). In vitro assessment of antioxidant activity of tyrosol, resveratrol and their acetylated derivatives. *Food Chem.* *177*, 165–173.

Wang, Q., Ma, C., Ma, Y., Li, X., Chen, Y., and Chen, J. (2017). Structure–activity relationships of diverse xanthenes against multidrug resistant human tumor cells. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*