

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

DIANA MONTI ATIK

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE COMPOSTOS TRITERPÊNICOS
CONTRA O VÍRUS SINCIAL RESPIRATÓRIO**

Porto Alegre
2020

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

DIANA MONTI ATIK

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE COMPOSTOS TRITERPÊNICOS
CONTRA O VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Farmacêutica na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof^a. Ana Paula Duarte de Souza

Porto Alegre

2020

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE COMPOSTOS TRITERPÊNICOS
CONTRA O VÍRUS SINCIAL RESPIRATÓRIO**

DIANA MONTI ATIK

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Orientadora

(Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul)

Prof^a. Dr^a. Fernanda Bueno Morrone

(Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul)

Prof^a. Dr^a. Marlise Araújo dos Santos

(Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul)

Prof^a. Dr^a. Alessandra Nejar Bruno

(Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia)

PORTO ALEGRE
2020

Ficha Catalográfica

A872a Atik, Diana Monti

Avaliação da Atividade Antiviral de Compostos Triterpênicos
Contra o Vírus Sincicial Respiratório / Diana Monti Atik . –
2016.

60 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Farmacêutica, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Duarte de Souza.

1. Atividade antiviral. 2. Compostos triterpênicos. 3. Vírus
sincicial respiratório. I. Souza, Ana Paula Duarte de. II. Título.

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

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

DEDICATÓRIA

Em memória ao meu querido e eterno pai que foi o meu maior exemplo de vida e que sempre esteve ao meu lado durante todos os momentos.

À minha amada mãe que sempre me apoiou durante toda esta caminhada e é o meu exemplo de bondade e perseverança.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à profa. Dra. Ana Paula Duarte de Souza, pela sua excelente orientação no trabalho, pela paciência e por todas as lições no decorrer desta caminhada.

Agradeço aos queridos colegas do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Deise do Nascimento de Freitas, Tiago Fazolo, Gabriela Acevedo Ferreira, Natália Jaeger, Krist Helen Antunes Fernandes, Jheini Lis Antunes Fernandes, Thais Diniz Lopez, Rodrigo Benedetti Gassen e Edemar Schoenardie Júnior por toda ajuda prestada durante a execução deste trabalho e ao Elenilson Figueiredo da Silva da UFRGS pelo auxílio na etapa final de conclusão.

Ao Dr. Fernando Kreutz por ter cedido tempo para a realização deste trabalho.

Às minhas amigas pela paciência e compreensão nos momentos de ausência e pelo incentivo constante para que este trabalho fosse concluído.

À minha família toda, pelo apoio financeiro, psicológico e emocional durante esta jornada.

Aos meus pais, Rosendo Rizk Atik e Eneida Monti Atik por me darem a vida, amor e pelo aprendizado diário.

À Deus, por tudo.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE COMPOSTOS TRITERPÊNICOS CONTRA O VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO

RESUMO

O Vírus Sincicial Respiratório (VSR) é um vírus de RNA envelopado de bicamada lipídica que se origina da célula hospedeira e pertence à família Paramyxoviridae. O VSR causa infecção aguda do trato respiratório e é a principal causa de internações e morte entre crianças menores de 5 anos em todo o mundo. Atualmente, não existe nenhuma vacina licenciada disponível no mercado. Desta forma, existe uma necessidade para o desenvolvimento de agentes terapêuticos antivirais eficazes e seguros. Os compostos triterpênicos, entre eles, o ácido betulínico, o ácido ursólico e a betulina apresentam uma variedade de atividades biológicas e farmacológicas, incluindo atividade antiviral. Neste estudo, testamos compostos derivados do ácido betulínico, do ácido ursólico e da betulina quanto à sua citotoxicidade e quanto à sua atividade antiviral. Os compostos LAFIS131 e LAFIS134 apresentaram importante atividade antiviral *in vitro* protegendo as células da morte causada pelo VSR. Estes compostos apresentaram um índice de seletividade de 2.09 e 25.5, respectivamente, indicando que o LAFIS134 seria o composto mais promissor, porque além de apresentar atividade antiviral, não apresenta citotoxicidade, tornando-o mais seletivo às células infectadas com o VSR.

Palavras-chave: Atividade antiviral; compostos triterpênicos, vírus sincicial respiratório.

EVALUATION OF ANTIVIRAL ACTIVITY OF TRITERPENOID COMPOUNDS AGAINST RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS

ABSTRACT

Respiratory Syncytial Virus (RSV) is an enveloped RNA virus of the lipid bilayer that originates from the host cell and belongs to the Paramyxoviridae family. RSV causes acute respiratory tract infection and is the leading cause of hospitalization and death among children under 5 years worldwide. Currently there is no licensed vaccine available on the market. Thus, a need exists for the development of antiviral therapeutics. The triterpenoid compounds, including, betulinic acid, ursolic acid and betulin have a variety of pharmacological and biological activities, including antiviral activity. In this study, we tested compounds derived from betulinic acid, ursolic acid and betulin as its cytotoxicity and antiviral activity. The LAFIS131 and LAFIS134 compounds had significant antiviral activity *in vitro* protecting cells from death caused by RSV. These compounds showed an index of selectivity of 2:09 and 25.5, respectively, indicating that the LAFIS134 would be the most promising compound because besides having antiviral activity, non-cytotoxic, making it more selective for cells infected with RSV.

Key words: Antiviral agents; triterpenes, respiratory syncytial virus.

LISTA DE ABREVIATURAS

- CC₅₀: Concentração citotóxica de 50%
- CPE: Efeito citopático
- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- EC₅₀: Concentração efetiva de 50%
- EDTA: Etilenodiamino Tetra-acético
- IC₅₀: Concentração inibitória de 50%
- MTT: Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
- OMS: Organização Mundial da Saúde
- RNA: Ácido Ribonucleico
- SBF: Soro Bovino Fetal
- VPM: Vírus da Pneumonia de Camundongos
- VSR: Vírus Sincicial Respiratório
- VSRB: Vírus Sincicial Respiratório Bovino
- VSRO: Vírus Sincicial Respiratório Ovino

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Vírus Sincicial Respiratório.....	17
Figura 2- Estrutura química do ácido betulínico e seus derivados.....	24
Figura 3- Estrutura química do ácido ursólico e seus derivados.....	25
Figura 4- Estrutura química da betulina e seus derivados.....	26
Figura 5- Citotoxicidade do ácido betulínico e seus derivados.	32
Figura 6- Citotoxicidade do ácido ursólico e seus derivados	34
Figura 7- Citotoxicidade da betulina e seus derivados.....	36
Figura 8- Curva de concentração do VSR.	38
Figura 9- Atividade antiviral do ácido betulínico e seus derivados.....	40
Figura 10- Atividade antiviral do ácido ursólico e seus derivados.....	42
Figura 11- Atividade antiviral dos derivados da betulina.....	44
Figura 12- Células Vero infectadas com VSR e tratadas com DMSO	45
Figura 13- Células Vero infectadas com VSR e tratadas com LAFIS 131	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores de CC_{50} dos compostos.....	37
Tabela 2- Valores de IC_{50} dos compostos.	46
Tabela 3- Avaliação do índice de seletividade (IS) CC_{50}/IC_{50}	47

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1

$$\mathbf{[(A-B)/C-B]x100}$$

A- Células tratadas com os compostos

B- Células infectadas com o vírus

C- Células não tratadas e não infectadas

SUMÁRIO

1	Referencial Teórico	14
	INTRODUÇÃO.....	14
	1.1 O Vírus Sincicial Respiratório	16
	1.2 Compostos Antivirais em Investigação para Tratamento do VSR.....	18
	1.3 Compostos Triterpênicos	19
2	Hipótese.....	20
3	Objetivos.....	20
	3.1 Objetivos Gerais	20
	3.2 Objetivos Específicos.....	20
4	Justificativa.....	20
5	Manuscrito.....	21
6	Considerações Finais.....	47
7	Referências	48
8	Artigo Publicado	54

1 Referencial Teórico

INTRODUÇÃO

O Vírus Respiratório Sincicial (VSR) é conhecido como a causa mais comum de infecção aguda do trato respiratório e é a principal causa de internações e morte entre crianças menores de 5 anos em todo o mundo (Hall et al., 2013; Cho et al., 2013; Munywoki et al., 2013; Bezerra et al., 2011; Nair et al., 2010). Estima-se que o VSR causou aproximadamente de 66 a 199 mil mortes de crianças no mundo no ano de 2005 (Nair et al., 2010) e apesar da gravidade da ameaça à saúde global e a carga econômica representada pela infecção pelo VSR, não há agentes antivirais eficazes específicos para tratar o VSR (Shin et al., 2013).

Bebês, crianças imunocomprometidas, ou com distúrbios respiratórios subjacentes têm um risco significativamente maior de desenvolver infecções graves pelo VSR. Infecções pelo VSR podem ser complicadas por pneumonia viral oportunista e desconforto respiratório. Idosos e imunocomprometidos também são suscetíveis a complicações de infecções por VSR, destacando assim a importância da intervenção médica na forma de terapias profiláticas e antivirais (Byrd; Prince, 1997).

A bronquiolite aguda causada por VSR é a doença mais prevalente em crianças nos dois primeiros anos de vida, com grande impacto em hospitalizações e altos custos para o sistema de saúde (Glezen; Taber et al., 1986; Selwyn, 1990). As crianças com maior risco de doença grave são os lactentes prematuros, os recém-nascidos com displasia broncopulmonar e os lactentes com cardiopatia congênita. Alguns autores estimam que a taxa de mortalidade em lactentes prematuros hospitalizados com VSR chega a 5% (Fulginiti et al., 1969). Durante os primeiros 18 meses de idade, 87% das crianças desenvolvem anticorpos específicos para o VSR, o que demonstra alta taxa de contaminação até os 3 anos de idade, praticamente todas as crianças foram infectadas (Dudas and Karron, 1998).

Nos Estados Unidos a infecção por VSR resulta em mais de 120.000 hospitalizações infantis e até 500 mortes (Empeyet al., 2010). Comparando com a gripe, o VSR causa 9 vezes mais mortes em crianças menores de 1 ano de idade (Vieira et al., 2001). No Brasil, embora não haja vigilância epidemiologia oficial para VSR, estudos em

diversas regiões do país e dados de hospitalização por bronquiolite indicam que a prevalência da doença no Brasil assemelha aos relatos de outros países (Chang and Braciale, 2002). A infecção primária pelo VSR não confere uma resposta imune protetora eficiente e prolongada (Tregoning and Schwarze, 2010) e reinfecções com as mesmas cepas virais podem ser comuns (González et al., 2012; Mackman et al., 2015). Com infecções repetidas, principalmente no adulto, a severidade dos sintomas clínicos do VSR diminui no decorrer do tempo e a infecção torna-se assintomática. Até o presente momento não foi desenvolvida uma vacina eficiente contra o vírus, que possa prevenir esta infecção. Um ensaio clínico da década de 60, com uma vacina contra VSR utilizando vírus inativado com formalina obteve resultado extremamente negativo, ao invés de proteger as crianças, a vacina exacerbou a doença levando-as à morte (Fulginiti et al., 1969).

Embora existam alguns tratamentos profiláticos disponíveis, como o anticorpo monoclonal Palivizumab (MedImmune), que confere proteção substancial contra a doença grave causada pelo VSR, porém de acesso limitado devido ao seu elevado custo. O Palivizumab é um anticorpo monoclonal humanizado direcionado contra a glicoproteína de fusão (proteína F) de superfície do VSR. Sua ação ocorre através da neutralização e inibição da fusão do VSR, fornecendo imunidade passiva. O Palivizumab foi licenciado inicialmente nos Estados Unidos em 1998 e na Europa em 1999 com extensão do seu licenciamento em 2003. No Estados Unidos, a profilaxia nos grupos de alto risco reduziu as taxas de hospitalização em até 78% nos últimos anos. Entretanto, o uso de profilaxia com o Palivizumab em grupos não selecionados resulta em aumento significativo nos custos, pouca redução de gastos com menor taxa de hospitalização e nenhuma redução nas taxas de mortalidade (Sociedade Brasileira de Pediatria, 2011).

Atualmente, o único tratamento antiviral disponível no mercado é a ribavirina, um análogo de nucleosídeo, aprovada para infecção grave causada pelo VSR, porém ela não é recomendada devido a diversos fatores, tais como a sua alta taxa de toxicidade e a dificuldade em sua administração (American Academy of Pediatrics Subcommittee, 2006). A ribavirina é administrada geralmente como um aerossol de partículas pequenas em pacientes imunocomprometidos com infecção do trato respiratório inferior causada por VSR. Esta droga também tem sido utilizada de forma oral e intravenosa, em pacientes imunocomprometidos (Chu; Englund, 2013, p. 236). Notavelmente, a ribavirina tem demonstrado eficácia limitada em ensaios clínicos em crianças com bronquiolite causadas por VSR (Guerguerian et al., 1999; Law et al., 1997; Moler et al., 1996).

Atualmente, não existe nenhuma vacina licenciada disponível no mercado, desta forma, existe uma necessidade urgente para o desenvolvimento de vacinas e agentes terapêuticos eficazes e seguros.

1.1 O Vírus Sincicial Respiratório

O VSR foi identificado em 1956 e pertencente à família Paramyxoviridae. O vírus é envelopado de bicamada lipídica que se origina da célula hospedeira. Dentro do envelope encontra-se o nucleocapsídeo que envolve o genoma viral de uma simples fita de RNA com polaridade negativa. O genoma do VSR codifica 11 proteínas, duas proteínas presentes na superfície do virion a G e a F desempenham uma importante função no estágio inicial do ciclo infeccioso viral devido a sua ligação com glicosaminoglicanos permitindo que o vírus entre através de fusão nas células do trato respiratório do hospedeiro. A proteína G pode ligar-se na heparina e foi descrito que o receptor da proteína F é a nucleolina (Tayyari et al., 2011).

O VSR é heterogêneo principalmente devido a alterações na proteína G, caracterizando dois subtipos circulantes sazonalmente, subtipo A e B. Outros membros desse gênero são: VSR bovino (VSRB), O VSR ovino (VSRO) e o vírus da pneumonia de camundongos (VPM). O virion do VSR consiste num nucleocapsídeo envolto num envelope lipídico proveniente da membrana plasmática da célula hospedeira (Figura 1). Os virions produzidos em cultura de células consistem em partículas esféricas de 100- 350nm de diâmetro com longos filamentos de 60-200 nm de diâmetro e até 10 µm de comprimento (Kopelman and Miyoshi, 1999).

Durante a infecção por VSR ocorre a formação de uma ribonucleoproteína (RNP) no núcleo da célula infectada. Esta ribonucleoproteína é formada por uma interação do RNA genômico viral, com a proteína do nucleocápsido (N), a fosfoproteína (P) e a proteína grande (L). Para a transcrição eficiente do genoma do vírus através do complexo da polimerase é necessário a associação entre as proteínas N, P e L, (Collins et al., 1996; Grosfeld et al., 1995) e uma proteína adicional do vírus, M2-1 (Fearnsand Collins, 1999; HardyandWertz, 1998; Hardy et al., 1999; Mason et al., 2003). Um envelope lipídico derivado a partir da célula hospedeira na qual as glicoproteínas do vírus estão incorporadas rodeia a RNP. A proteína N é presente em ambos os filamentos do vírus e

nos corpos de inclusão, enquanto que a proteína NS2 é detectada somente dentro dos corpos de inclusão (Weber et al., 1995).

O VSR tem a capacidade de formar sincícios, que são caracterizados como sendo células multinucleadas e grandes. Isso ocorre devido à fusão do envelope viral com a membrana e as proteínas virais permanecem nela integradas. Um dos resultados é a promoção da fusão entre as membranas celulares das células circunvizinhas promovida pela proteína F. Além disso, receptores virais localizados na membrana, podem também se adsorver a receptores de células vizinhas. A formação do sincício é extremamente benéfica para o vírus, representando um mecanismo de escape do sistema imune, pois facilita a passagem do vírus de uma célula para outra sem que ocorra a saída para o meio extracelular (Selwyn et al., 1990).

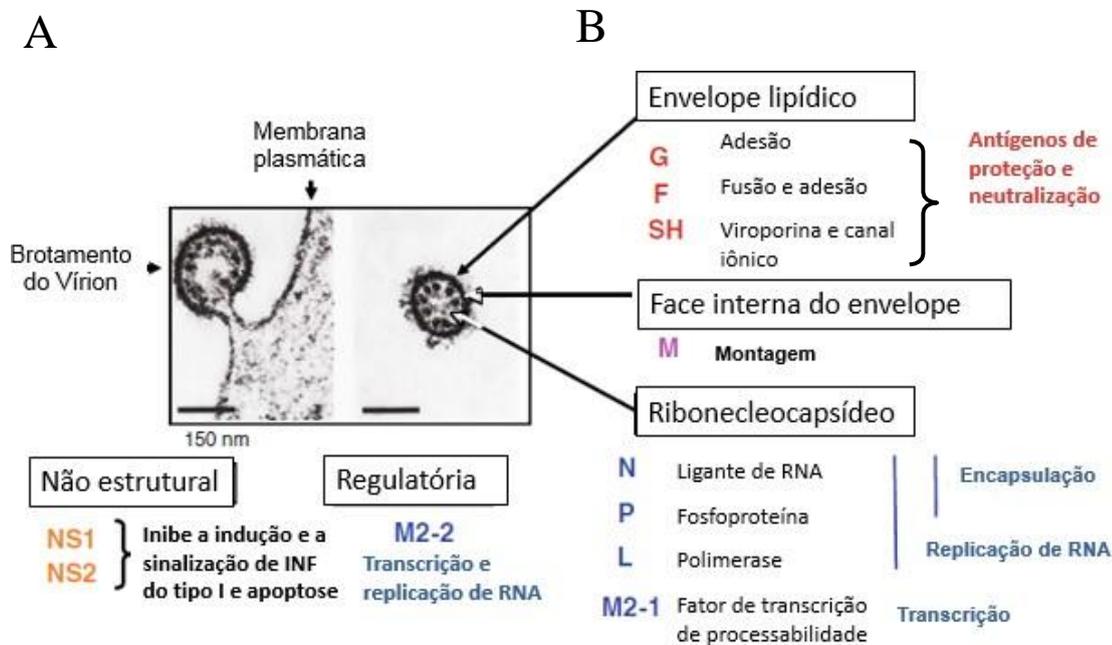


Figura 1 – Vírus Sincicial Respiratório. A) Micrografia eletrônica do vírus brotando na membrana de uma célula infectada. B) Esquema demonstrando as proteínas do VSR, suas funções e localizações no vírion (Collins et al., 2013 p. 7).

1.2 Compostos Antivirais em Investigação para Tratamento do VSR

O VSR, isolado pela primeira vez em 1955, permaneceu com sua caracterização bioquímica e molecular rudimentar durante muitos anos devido ao seu crescimento relativamente ineficiente em cultura de células, associada à instabilidade física. A caracterização detalhada começou em 1981 com a clonagem molecular e sequenciamento do RNA do VSR. As ferramentas moleculares resultantes têm aumentado muito a nossa compreensão do VSR e revolucionou a investigação para o tratamento e prevenção. Por exemplo, o candidato vacina viva atenuada do VSR projetados por genética reversa estão atualmente em estudos. Vacinas vetorais e expressas de forma recombinante vacinas de antígenos virais também estão em desenvolvimento (Collins et al., 2013 p.13).

A doença causada pelo VSR é complexa e variável. No seu histórico, o VSR é destacado pela falha na vacina na década de 60, que agravou a doença ainda mais em crianças vacinadas levando-as à morte. Candidatos à vacina viva podem ser livres desta complicação, no entanto, o desenvolvimento de vacinas ou outras subunidades à base de proteínas para utilização pediátrica é dificultada pela possibilidade de aumento da doença e pelo desafio de demonstrar de forma confiável a sua ausência em estudos pré-clínicos (Collins et al., 2013 p. 12).

O controle de infecção é a única estratégia atual para prevenir a doença causada por VSR. Ao longo da última década, o avanço mais significativo na prevenção do VSR tem sido o desenvolvimento de anticorpos profiláticos. Um anticorpo monoclonal humanizado dirigido contra a proteína de fusão (F) palivizumab (Synagis, MedImmune, Inc., Gaithersburg, MD) usado clinicamente para imunoprofilaxia passiva em recém-nascidos de alto risco e crianças, foi produzido usando antígeno recombinante expresso. O anticorpo é dado rotineiramente em uma base mensal para recém-nascidos prematuros e crianças com menos de 24 meses de idade com problemas subjacentes, incluindo a prematuridade, a doença pulmonar crônica, ou doença cardíaca para evitar a doença causada por VSR e evitar a hospitalização. Outros anticorpos monoclonais ou policlonais ou fragmentos de anticorpos contra a proteína F foram desenvolvidos e testados alguns já em populações de doentes. Novos agentes antivirais promissores em desenvolvimento por várias empresas farmacêuticas e de biotecnologia que incluem pequenas moléculas inibidoras de fusão, inibidores da ligação, inibidores da síntese de RNA e pequenas partículas de RNA de interferência (siRNA) (Chu and Englund, 2013 p. 236).

Vários medicamentos antivirais potenciais estão sob investigação clínica (Cianci et al., 2004; Pryde et al., 2013; Yu et al., 2004, 2007). Um exemplo é um nucleosídeo inibidor da RNA-polimerase de AL-8176 (Wang et al., 2015) e um inibidor de fusão GS-5806 (Mackman et al., 2015). No entanto, nenhum destes medicamentos ainda foi aprovado por agências governamentais como terapias ou estão disponíveis para a comunidade de pesquisa como ferramentas para estudar o ciclo de vida do vírus ou interações entre hospedeiro/vírus (Noah et al., 2010).

1.3 Compostos Triterpênicos

O ácido betulínico, um triterpeno pentacíclico isolado a partir da árvore *Jujuba* (*Zizyphus jujuba* Mill), tem sido conhecida para uma ampla gama de propriedades biológicas e farmacêuticas, tais como antibacteriana, anti-malária, antiinflamatória, anti-helmíntico, atividades anti-nociceptiva e anticancerígena (Yogeeswari and Sriram, 2005; Rastogi et al., 2015). Outros autores como Li et al., (2007) e Shin et al., (2013) já testaram a inibição do VSR por vários compostos naturais, entre eles, o ácido betulínico.

Em outro estudo, investigou-se a atividade antiviral do ácido betulínico contra a influenza do vírus A/PR/8 em células A549 (células epiteliais de adenocarcinoma de pulmão humano) e em camundongos C57BL/6. Nesse estudo, o ácido betulínico apresentou a atividade antiviral contra a influenza em uma concentração de 50 μ M, sem citotoxicidade significativa em células A549 infectadas com o vírus influenza A/PR/8 (Hong et al., 2015).

Além disso, o ácido betulínico atenuou significativamente a patologia pulmonar que inclui o aumento da necrose, os números de células inflamatórias e o edema pulmonar induzido pela infecção do vírus influenza A/PR/8 em comparação com camundongos tratados com oseltamivir (Hong et al., 2015).

Schefflera heptaphylla (L.) Frodin é um ingrediente principal de uma formulação à base de plantas de chá amplamente utilizado para o tratamento da constipação comum no sul da China. Um estudo que avaliou o extrato da planta *S. Heptaphylla* utilizando método de redução do efeito citopático, mostrou que o mesmo possui atividade antiviral potente contra VSR. O fracionamento e isolamento deste extrato levou a obtenção de dois triterpenóides puros altamente ativos como o ácido 3 α -hydroxylup-20(29)-ene-23,28- dióico e ácido 3-*epi*-betulínico 3-O-sulfato (Li et al., 2007).

2 Hipótese

É comprovado pela literatura científica que o ácido betulínico possui uma ampla gama de propriedades biológicas e farmacêuticas, tais como antibacteriana, anti-malária, antiinflamatória, anti-helmíntico, atividades anti-nociceptiva, anticancerígena e especialmente antiviral. Baseado nestes fatos nossa hipótese é que o ácido betulínico e outros derivados triterpênicos podem apresentar atividade antiviral contra o VSR em células A549.

3 Objetivos

3.1 Objetivos Gerais

- Testar a atividade antiviral contra VSR dos compostos triterpênicos ácido betulínico, do ácido ursólico e da betulina e seus derivados obtidos a partir de modificações estruturais.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade dos compostos.
- Verificar a concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) dos compostos.
- Testar a atividade antiviral dos compostos contra o VSR.
- Verificar a concentração inibitória viral de 50% (IC₅₀) dos compostos.
- Verificar o índice de seletividade (IS) dos compostos.

4 Justificativa

Infecções por VSR são a maior causa de bronquiolite em crianças menores de um ano de vida podendo levar estas crianças à morte e atualmente não existe nenhum tratamento disponível, somente profilático para crianças de alto risco. Baseado no acima exposto constitui fato inegável a necessidade do desenvolvimento de novas terapias para a infecção pelo VSR e o estudo do potencial antiviral dos compostos triterpênicos e seus derivados pode trazer informações valiosas rumo ao um novo tratamento para esta infecção.

5 Manuscrito (ARTIGO)

EVALUATION OF ANTIVIRAL ACTIVITY OF TRITERPENOID COMPOUNDS AGAINST RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS

ABSTRACT

Respiratory Syncytial Virus (RSV) is an enveloped RNA virus of the lipid bilayer that originates from the host cell and belongs to the Paramyxoviridae family. RSV causes acute respiratory tract infection and is the leading cause of hospitalization and death among children under 5 years worldwide. Currently there is no licensed vaccine available on the market, thus, a need exists for the development of effective vaccines and antiviral therapeutics and safe. The triterpenoid compounds, including, betulinic acid, ursolic acid and betulin have a variety of pharmacological and biological activities, including antiviral activity. In this study, we tested compounds derived from betulinic acid, ursolic acid and betulin as its cytotoxicity and antiviral activity. The LAFIS131 and LAFIS134 compounds had significant antiviral activity *in vitro* protecting cells from death caused by RSV. These compounds showed an index of selectivity of 2.09 and 25.5, respectively, indicating that the LAFIS134 would be the most promising compound because besides having antiviral activity, non-cytotoxic, making it more selective for cells infected with RSV.

Key words: Antiviral activity; triterpenoid compounds, respiratory syncytial virus.

INTRODUÇÃO

O Vírus Sincicial Respiratório (VSR) é conhecido como a causa mais comum de infecção aguda do trato respiratório e é a principal causa de internações e morte entre crianças menores de 5 anos em todo o mundo (Hall et al., 2013; Cho et al., 2013; Munywoki et al., 2013; Bezerra et al., 2011; Nair et al., 2010). Bronquiolite aguda causada por VSR é a doença mais prevalente em crianças nos dois primeiros anos de vida, com grande impacto em hospitalizações e altos custos para o sistema de saúde (Glezen et al., 1986; Selwyn, 1990). As crianças com maior risco de doença grave são os lactentes prematuros, os recém-nascidos com displasia broncopulmonar e os lactentes com cardiopatia congênita. Alguns autores estimam que a taxa de mortalidade em lactentes prematuros hospitalizados com VSR chega a 5%. Até o presente momento não foi desenvolvida uma vacina eficiente contra o vírus, que possa prevenir esta infecção. Um ensaio clínico da década de 60, com uma vacina contra VSR utilizando vírus inativado com formalina obteve resultado extremamente negativo, ao invés de proteger as crianças, a vacina exacerbou a doença levando-as à morte (Fulginiti, Eller et al. 1969).

A infecção pelo VSR é uma grande preocupação em países desenvolvidos e em desenvolvimento porque ainda não há uma vacina eficaz disponível (Chang, 2011; Rudraraju et al., 2013; Graham, 2011; Jorquera et al., 2013; Shaw et al., 2013; Wang et al., 2011a,b; Zeitlin et al., 2013). Atualmente, o único tratamento antiviral disponível no mercado é a ribavirina, um análogo de nucleosídeo, aprovada para infecção grave causada pelo VSR, porém ela não é recomendada devido a diversos fatores, tais como a sua alta taxa de toxicidade e a dificuldade em sua administração (American Academy of Pediatrics Subcommittee, 2006). É utilizado clinicamente para imunoprofilaxia passiva em recém-nascidos de alto risco e crianças um anticorpo monoclonal humanizado dirigido contra a proteína de fusão (F) palivizumab (Synagis, MedImmune, Inc., Gaithersburg, MD) (Collins et al., 2013). Porém este tratamento tem acesso limitado devido ao seu elevado custo (Sociedade Brasileira de Pediatria, 2011). Desta forma, o desenvolvimento de novos tratamentos para o VSR se faz prioridade.

Vários medicamentos antivirais potenciais estão sob investigação clínica (Cianci et al., 2004; Pryde et al., 2013; Yu et al., 2004, 2007). Um exemplo é um nucleosídeo inibidor da RNA-polimerase de AL-8176 Miyoshi (Wang et al., 2015) e um inibidor de fusão GS-5806 (Mackman et al., 2015). No entanto, nenhum destes medicamentos ainda foi aprovado por agências governamentais como terapias (Noah et al., 2010).

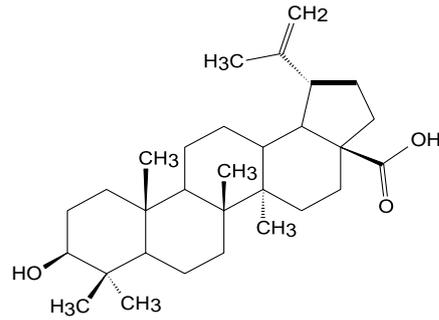
O ácido betulínico, um triterpeno pentacíclico isolado a partir da árvore Jujuba (*Zizyphus jujuba* Mill), tem sido conhecida para uma ampla gama de propriedades biológicas e farmacêuticas, tais como antibacteriana, anti-malária, antiinflamatória, anti-helmíntico, atividades anti-nociceptiva e anticancerígena e antiviral (Yogeeswari and Sriram, 2005; Rastogi et al., 2015; Li et al., 2007; Shin et al., 2013). O presente artigo tem o objetivo de avaliar o potencial antiviral de compostos triterpênicos ácido betulínico, do ácido ursólico e da betulina e seus derivados do contra o VSR.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de Compostos

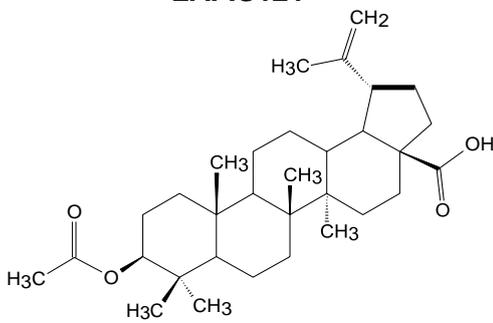
O ácido betulínico (LAFIS12) e seus derivados (LAFIS 121, LAFIS1213, LAFIS1215, LAFIS1216, LAFIS1219, LAFIS1220), os derivados do ácido ursólico (LAFIS111, LAFIS1113, LAFIS1115, LAFIS1116, LAFIS1119) e a betulina (LAFIS130) e seus derivados (LAFIS131, LAFIS132, LAFIS133, LAFIS134, LAFIS137) foram obtidos no Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sobre supervisão da professora doutora Simone Cristina Baggio Gnoatto. Os triterpenos precursores, ácido betulínico e ácido ursólico foram obtidos através de extração de material vegetal descrito por Silva et al., (2013). A betulina foi obtida através de compra da Sigma Aldrich. A partir dos triterpenos ácido betulínico, ácido ursólico e betulina foram obtidos derivados semi-sintéticos por modificações nas posições do carbono 3 e 28, que resultaram em derivados esterificados. Estas reações foram realizadas de acordo com Silva et al., (2013). As estruturas químicas dos compostos testados nesta pesquisa estão demonstradas abaixo nas Figuras 2, 3 e 4 que foram extraídas de Silva et al., (2013).

LAFIS12 (Ácido Betulínico)

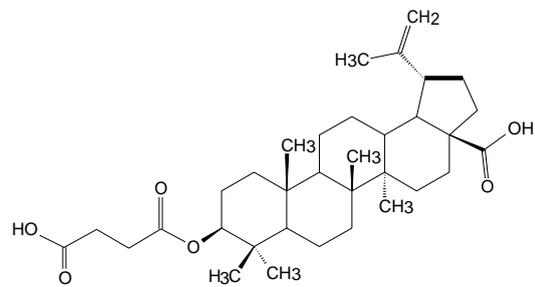


Derivados do Ácido Betulínico

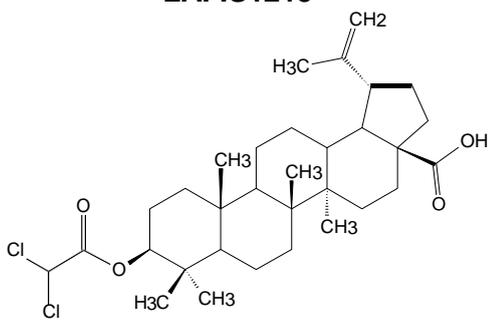
LAFIS121



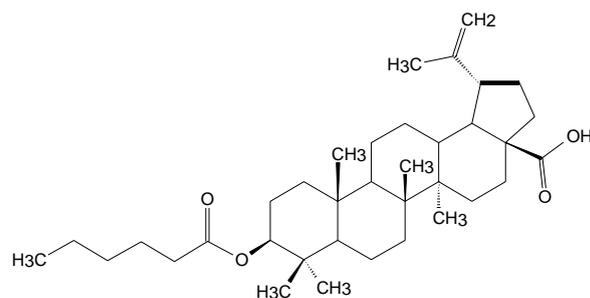
LAFIS1213



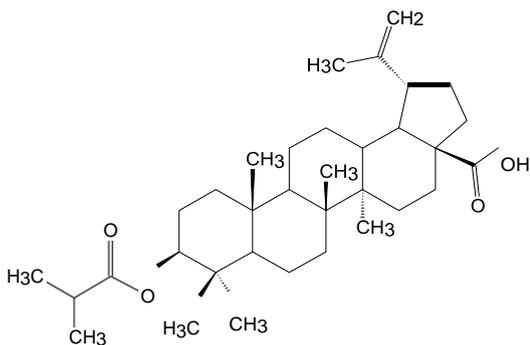
LAFIS1215



LAFIS1216



LAFIS1219



LAFIS1220

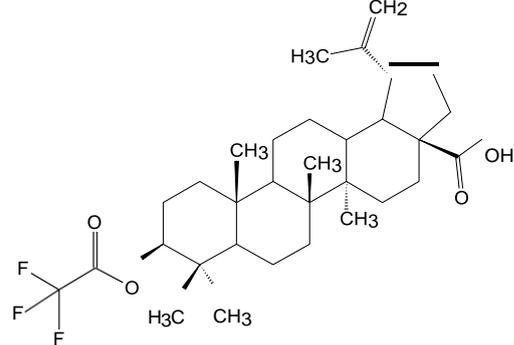
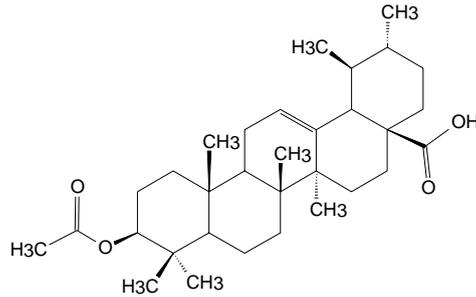


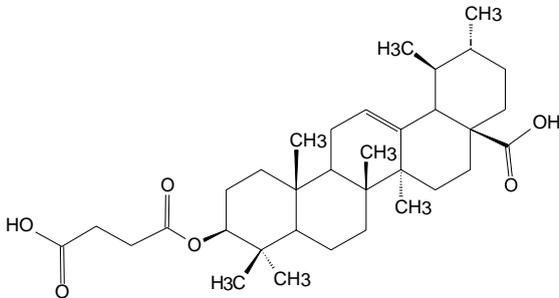
Figura 2: Estrutura química do ácido betulínico (LAFIS12) e seus derivados (LAFIS121,

LAFIS111 (Ácido Ursólico)

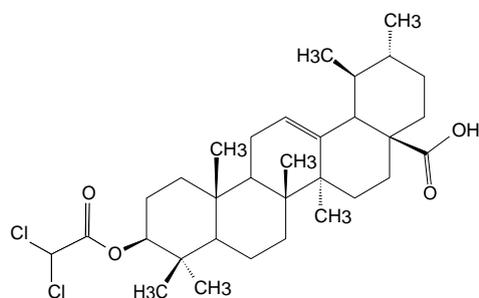


Derivados do Ácido Ursólico

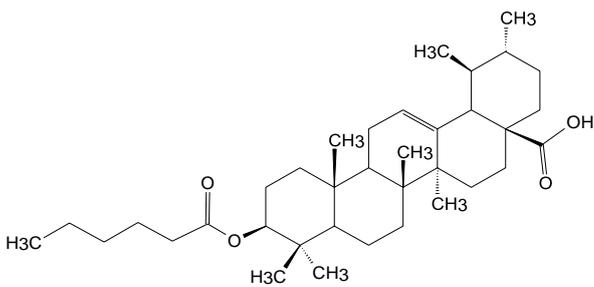
LAFIS1113



LAFIS1115



LAFIS1116



LAFIS1119

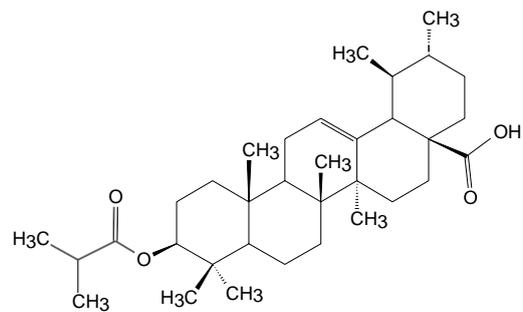
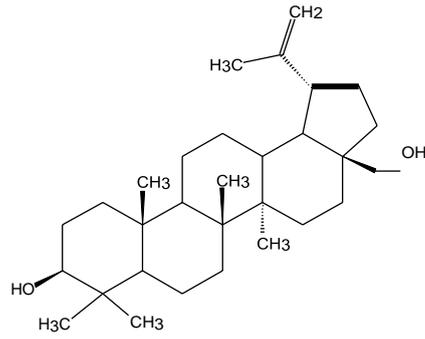


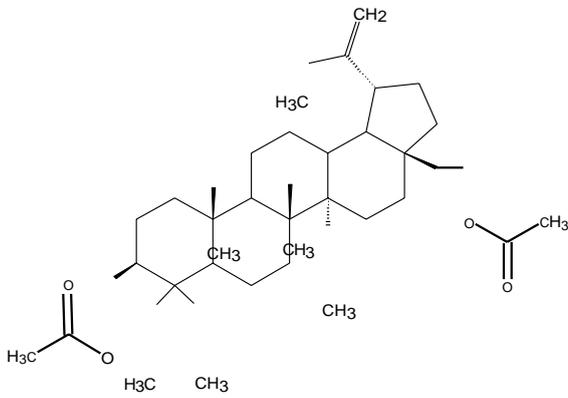
Figura 3: Estrutura química do ácido ursólico (LAFIS111) e dos seus derivados (LAFIS1113, LAFIS1115, LAFIS1116, LAFIS1119).

LAFIS130 (Betulina)

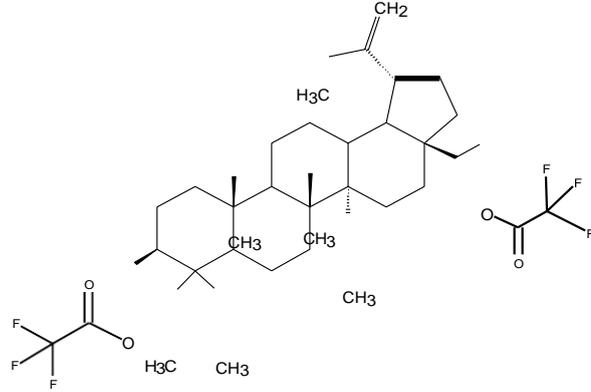


Derivados da Betulina

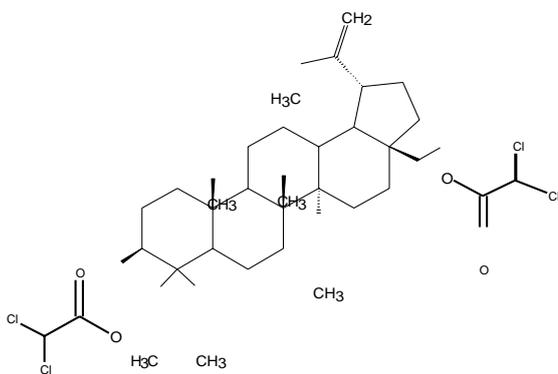
LAFIS 131



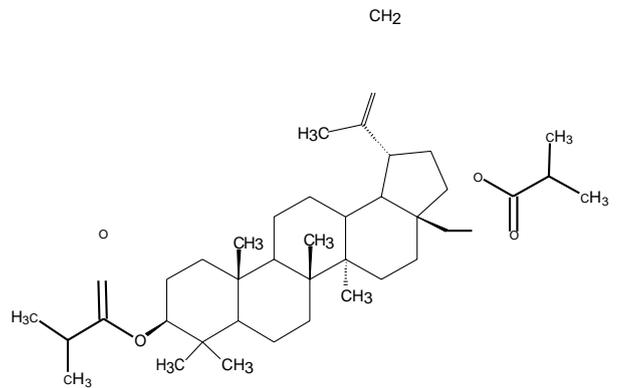
LAFIS 132



LAFIS133



LAFIS134



LAFIS 137

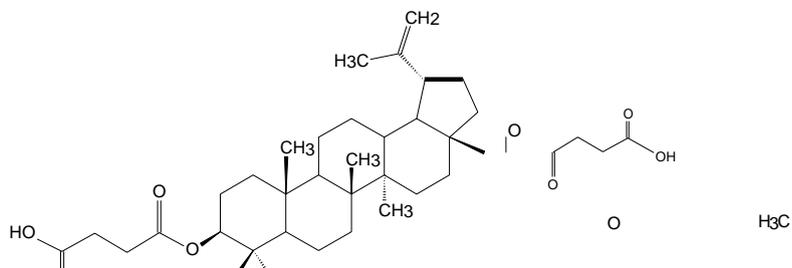


Figura 4: Estrutura química da Betulina (LAFIS130) e dos seus derivados (LAFIS131, LAFIS 132, LAFIS133, LAFIS134, LAFIS137).

Linhagens Celulares

Foram usadas linhagens celulares A549 (linhagem celular de carcinoma de pulmão) e Vero (linhagem celular epitelial de rim de macaco verde africano) (ATCC). As células foram mantidas em DMEM (Cultilab) 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab) em estufa de cultura celular a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. As células foram tripsinizadas utilizando Tripsina+EDTA (Cultilab) e a manipulação das mesmas ocorreu sempre em ambientes estéreis.

Vírus e Titulação Viral

O VSR subtipo cepa A2 que foi utilizado neste estudo foi gentilmente doado pelo Prof. Fernando Polack, Buenos Aires, AR. A linhagem celular utilizada para cultivo e titulação do VSR foi a Vero. A titulação viral foi realizada utilizando anticorpo monoclonal Anti-Respiratory Syncytial Virus (VSR) (Milipore).

O vírus foi titulado utilizando o método de titulação por placa de lise utilizando anticorpo específico para proteína F para revelação das placas. Em seguida as placas foram contadas utilizando microscópio invertido e foi feito o cálculo do número de unidades formadoras de placa por mL (PFU/mL).

Citotoxicidade dos Compostos

Os compostos, LAFIS12, LAFIS121, LAFIS1213, LAFIS1215, LAFIS1216, LAFIS1219, LAFIS1220, LAFIS111, LAFIS1113, LAFIS1115, LAFIS1116, LAFIS1119, LAFIS130, LAFIS131, LAFIS132, LAFIS133, LAFIS134 e LAFIS137 foram pesados em balança analítica e diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) em uma concentração de estoque final de 200mM. Foram plaqueadas 5×10^3 células A549 por poço em placa de 96 poços de fundo reto com meio de cultura DMEM enriquecido com 2% de soro bovino fetal (SBF). Após 24 horas em cultura foram adicionados os compostos na placa nas concentrações de 12,5µM, 25µM, 50µM, 100µM e 200µM para testar a citotoxicidade dos mesmos. Após 96 horas em cultura, foi utilizado o método de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma) para verificar a viabilidade celular. Para realização do método de MTT foi retirado 100µL de meio de cultura de cada poço e adicionado 40µL de MTT (5mg/mL). Após 4 horas em estufa de cultura de células, todo o

conteúdo dos poços foi aspirado deixando as células intactas ao fundo, foram adicionados 120µL de DMSO em cada poço e homogeneizado. Foi realizada a leitura da placa em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 a 650nm. Foi utilizado como controle o DMSO diluído com DMEM sem soro 1:10 e foi feita uma curva de dose de DMSO nos volumes 1µL, 2,5µL, 5µL, 10µL, e 20µL por poço.

Avaliação da Concentração Citotóxica dos Compostos (CC₅₀)

Os compostos, LAFIS12, LAFIS121, LAFIS1213, LAFIS1215, LAFIS1216, LAFIS1219, LAFIS1220, LAFIS111, LAFIS1113, LAFIS1115, LAFIS1116, LAFIS1119, LAFIS130, LAFIS131, LAFIS132, LAFIS133, LAFIS134 e LAFIS137 foram avaliados com relação à sua concentração citotóxica (CC₅₀) que reduziu o número de células viáveis em 50%.

Todos os compostos nas diferentes concentrações de 12,5µM, 25µM, 50µM, 100µM e 200µM foram comparados com o controle DMSO na concentração mais alta (20µL) para o cálculo da porcentagem da viabilidade celular. Com o valor da viabilidade celular obtida com o tratamento dos compostos nas diferentes concentrações, utilizamos o programa Microsoft Excel 2007 para elaborar o gráfico de dispersão dose-resposta e verificar a equação da reta formada mediante um R² próximo a um. A equação da reta de cada composto foi transferida para o programa *WolframAlpha* onde foi calculada o valor de CC₅₀ para cada composto (WOLFRAM RESEARCH COMPANY, 2016).

Dose-resposta da morte celular causada por VSR

As células A549 foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços de fundo reto (TPP) na concentração de 5×10^3 células por poço em meio DMEM com 2% de SBF com volume final de 200µL por poço. Após 24 horas em cultura, as células foram infectadas com diferentes concentrações de VSR (10^4 , 10^5 e 10^6 PFU/mL) por 2 horas em meio DMEM sem SBF. Em seguida o meio de cultura foi trocado para meio DMEM contendo 2% SBF. Após 96 horas em cultura, foi utilizado o método MTT para verificar a viabilidade celular.

Atividade Antiviral

As células A549 foram plaqueadas em placa de 96 poços de fundo reto com 5×10^3 células por poço, com meio de cultura DMEM com 2% de SBF em um volume final de 200 μ L por poço. Após 24 horas em cultura, as células foram infectadas com 10^4 PFU de VSR de cepa A2 em meio DMEM sem soro. Após 2 horas foram adicionados os compostos LAFIS12, LAFIS121, LAFIS1213, LAFIS1215, LAFIS111, LAFIS1113, LAFIS1116, LAFIS131, LAFIS132 e LAFIS134 nas concentrações de 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 200 μ M. Este tempo de 2h é o tempo necessário para o vírus infectar as células (Ohol, 2015). Foram utilizados como controles as células não infectadas com o vírus e as células infectadas com o vírus sem os tratamentos. Após 96 horas em cultura, foi utilizado o método MTT para verificar a viabilidade celular.

Avaliação da Concentração Inibitória dos Compostos (IC_{50})

Os compostos LAFIS12, LAFIS121, LAFIS1213, LAFIS1215, LAFIS111, LAFIS1113, LAFIS1116, LAFIS131, LAFIS132 e LAFIS134 foram avaliados com relação à sua concentração inibitória de 50% (IC_{50}) do efeito viral.

A concentração antiviral eficaz de 50% (IC_{50}) é expressa como a concentração que atinge 50% de proteção às células infectadas tratadas no que se refere à morte provocada pela indução do vírus. Para o cálculo de percentual de proteção de cada concentração foi utilizada a fórmula $[(A-B)/C-B] \times 100$, onde A são as células tratadas com os compostos, B são as células infectadas com o vírus e C são as células não tratadas e não infectadas (BETANCUR-GALVIS, 2002). Foi elaborado um gráfico de dispersão de dose-resposta com concentrações de 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 200 μ M dos compostos e o percentual de proteção antiviral sobre as células obtido para cada concentração utilizando o programa Microsoft Excel 2007. A equação da reta do gráfico gerado obtida de cada composto, com um R^2 próximo a um, foi transferida para o programa *WolframAlpha* onde foi calculada o valor de IC_{50} para cada composto (WOLFRAM RESEARCH COMPANY, 2016).

Avaliação do Índice de Seletividade (IS)

O índice de seletividade (IS) de cada composto é a relação entre a CC_{50} do composto e a IC_{50} . Este valor é utilizado para estimar a segurança de medicamentos, e quanto maior o valor deste (acima de um), maior a diferença entre a concentração de antiviral que inibe em 50% a morte das células causada pela infecção do vírus (IC_{50}) e a concentração citotóxica (CC_{50}) do composto (Coen; Richman, 2007). O IS foi calculado através da razão entre o CC_{50} e o IC_{50} (CC_{50}/IC_{50}).

Avaliação da Inibição da Formação do Sincício através da Titulação do Vírus

As células Vero foram plaqueadas em placa de 24 poços com concentração de $1,5 \times 10^5$ cel/mL e volume final de 500 μ L de meio DMEM com 10% de SBF. Após 24 horas em cultura, foi realizada a infecção com 10^4 PFU de VSR de cepa A2 em meio DMEM sem soro em um volume final de 200 μ L. Após 2 horas de incubação com o vírus, o volume de meio DMEM foi removido e foi adicionado o composto LAFIS131 na concentração de 2 μ M. Foi utilizado como controle o vírus com o DMSO. As células permaneceram em cultura por 6 dias. A titulação do vírus foi realizada no 6º dia utilizando o método por placa de lise com anticorpo específico para proteína F para revelação da placa. Em seguida, as placas foram visualizadas utilizando microscópio invertido.

Análise Estatística

Foi utilizado o teste Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade dos dados. Para comparação de medianas dos dados não-paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns. Os dados foram analisados usando o programa GraphPad Prism versão 5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de citotoxicidade dos compostos foi realizado para a escolha da dose que não causasse morte as células. As doses escolhidas para realização do teste de citotoxicidade foram 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 200 μ M. As células A549 foram plaqueadas e após 24 horas de incubação foram adicionados os compostos e realizado teste de MTT para avaliar a viabilidade celular. Como os compostos foram diluídos em DMSO, foi utilizado como controle o DMSO diluído com DMEM sem soro 1:10 e foi feita uma curva de dose de DMSO nos volumes 1 μ L, 2,5 μ L, 5 μ L, 10 μ L, e 20 μ L por poço e o DMSO demonstrou não causar nenhuma citotoxicidade às células em nenhuma das doses administradas quando comparadas com o grupo controle, sem a adição dos compostos e sem infecção (Figura 5).

Os resultados da citotoxicidade do ácido betulínico e dos seus derivados mostraram que alguns compostos não apresentam citotoxicidade significativa em nenhuma das doses testadas, como o LAFIS1213, LAFIS1215 e LAFIS1219 (Figura 5). Na dose de 200 μ M os LAFIS12, LAFIS121 e LAFIS1216 apresentaram citotoxicidade significativa conforme demonstrado na Figura 5. Já o composto LAFIS1220 mostrou citotoxicidade significativa na dose de 50 μ M, conforme demonstrado na mesma Figura.

Em um estudo de Li et al., (2007) foi avaliada a citotoxicidade utilizando o método do MTT em diferentes concentrações do extrato isolado de *Schefflera heptaphylla* (L.) contendo triterpenóides do tipo lupano entre eles o ácido betulínico e o ácido dióico e ambos apresentaram-se ligeiramente tóxicos para células HEp-2 na concentração de 100 μ g/mL.

Já, em outro estudo de Silva et al., (2013) testou um composto derivado do ácido betulínico em células HEK293T e no teste de citotoxicidade o composto não apresentou nenhuma citotoxicidade contra células HEK293T na concentração testada de 100 μ M. Estes dados são semelhantes aos nossos obtidos com os compostos LAFIS12, LAFIS1216 e LAFIS1219.

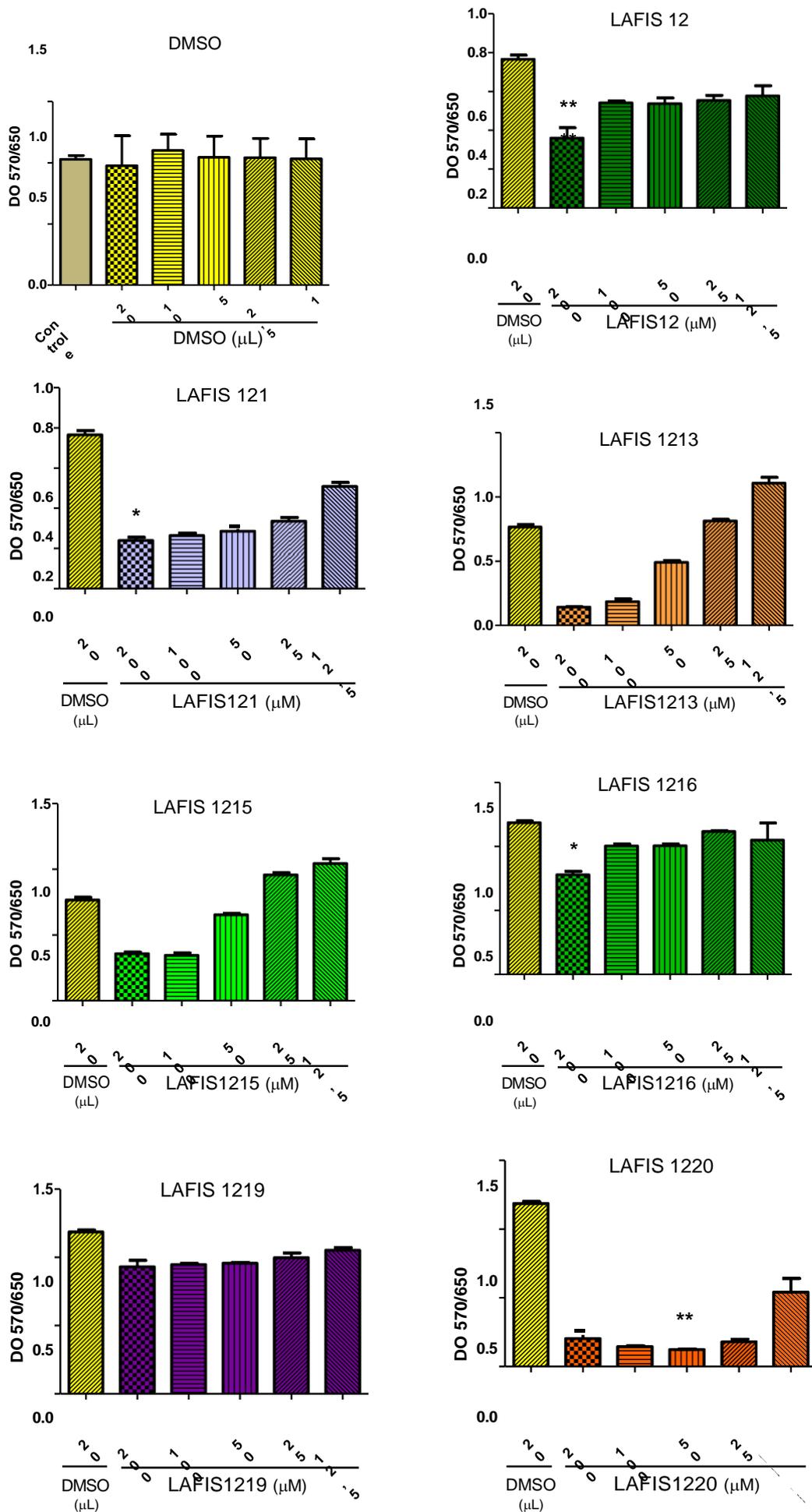


Figura 5: citotoxicidade do ácido betulínico (LAFIS12) e dos seus derivados (LAFIS121, LAFIS1213,

LAFIS1215, LAFIS1216, LAFIS1219, LAFIS1220) em células A549. A curva de concentração adicionada ~~35~~ 35
cada composto foi de 12,5 μ M, 25 μ M, 5 μ M, 100 μ M e 200 μ M. Os compostos foram comparados com o DMSO
no volume adicionado de 20 μ L. * $p < 0.05$ diferença estatisticamente significativa em relação ao controle
DMSO. ** $p < 0.005$ diferença estatisticamente significativa em relação ao controle DMSO (Kruskal- Wallis).

O mesmo teste de citotoxicidade foi realizado para os derivados do ácido ursólico nas concentrações 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 200 μ M e foram comparados com o grupo controle DMSO adicionado no volume de 20 μ L. Os resultados do teste de citotoxicidade mostraram que o LAFIS111 e o LAFIS1113 não apresentaram citotoxicidade significativa em nenhuma das concentrações usadas quando comparadas com o grupo controle (DMSO), conforme demonstrando na Figura 6. Entretanto, os compostos LAFIS1115 e LAFIS1119 mostraram ser citotóxicos na concentração de 25 μ M em índices significativos quando comparados com o grupo controle, além disso, o LAFIS1115 também mostrou citotoxicidade na concentração de 12,5 μ M (Figura 6). Já o LAFIS1116 mostrou não ser citotóxico em nenhuma das concentrações administradas e inclusive apresentou índice significativo de proliferação celular na dose de 50 μ M quando comparado com o grupo controle (Figura 6).

Os dados mostram que para alguns compostos (LAFIS111 e LAFIS1113) quanto maior a concentração, mais tóxico as células se tornam. O mesmo não ocorreu para os LAFIS1115 e LAFIS1119, apresentando-se menos tóxicos à medida que aumenta a concentração dos compostos.

No estudo de Silva et al., (2013) onde foi testado um composto derivado do ácido ursólico em células HEK293T, no teste de citotoxicidade o composto não apresentou nenhuma citotoxicidade contra células HEK293T na concentração testada de 100 μ M. Estes dados foram semelhantes aos nossos somente no composto LAFIS1116.

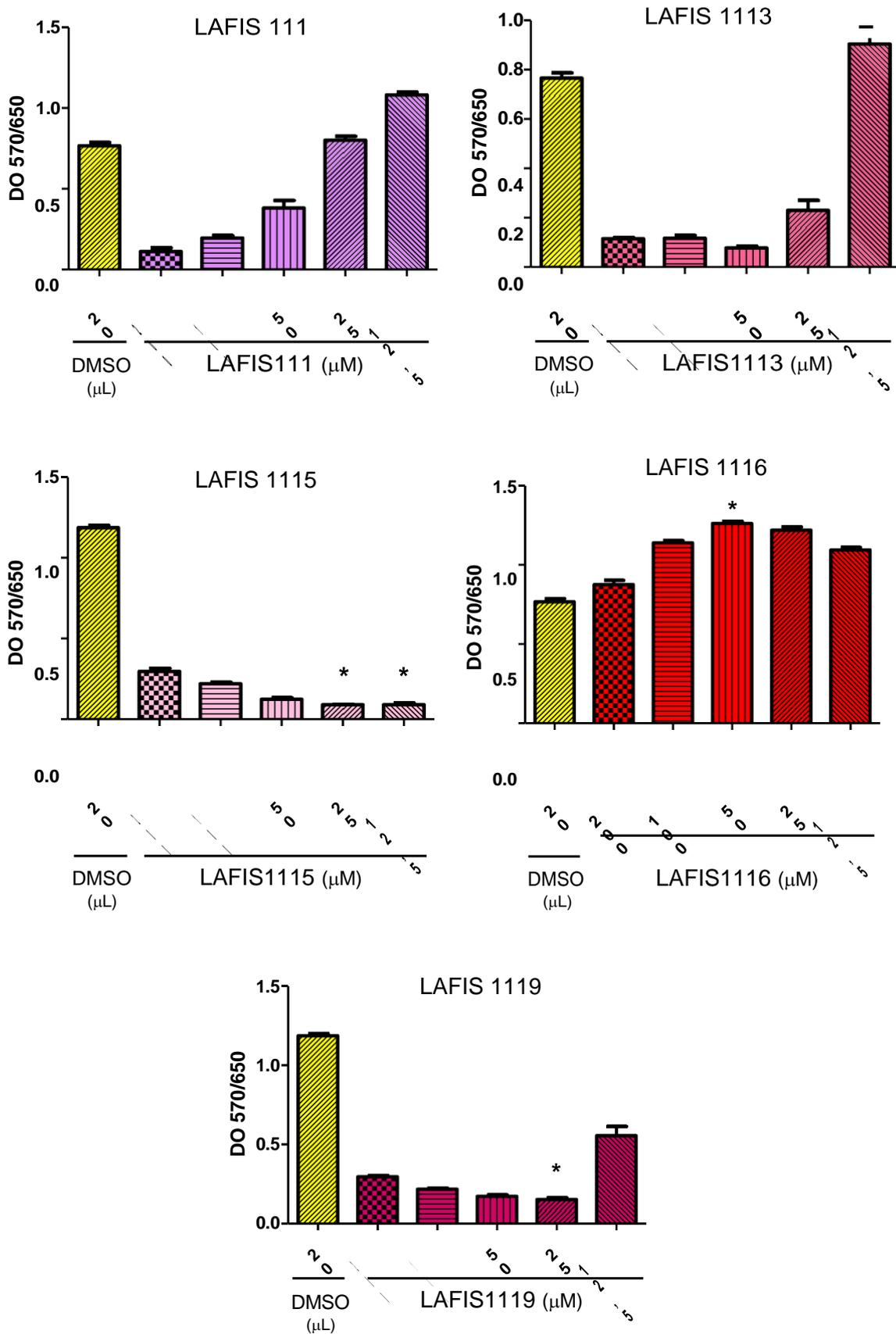


Figura 6: citotoxicidade do ácido ursólico e dos seus derivados (LAFIS111, LAFIS1113, LAFIS1115, LAFIS1116, LAFIS1119) em células A549. A curva de concentração adicionada de cada composto foi de 12,5μM, 25μM, 50μM, 100μM e 200μM. Os compostos foram comparados com o DMSO no volume adicionado de 20μL. *p<0.05 diferença estatisticamente significativa em relação ao controle DMSO (Kruskal- Wallis)..

A Betulina e os seus derivados também passaram pelo teste de citotoxicidade nas mesmas concentrações (12.5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 200 μ M). Os compostos LAFIS130, LAFIS137 apresentaram citotoxicidade significativa nas concentrações de 200 μ M, enquanto que as demais concentrações não demonstraram ser citotóxicas às células em índices significativos quando comparados com o grupo controle (DMSO), conforme demonstrado na Figura 7. Os compostos LAFIS131, LAFIS132, LAFIS133 e LAFIS134 mostraram não causar citotoxicidade em nenhuma das concentrações utilizadas em índices significativos quando comparadas com o grupo controle. Embora o LAFIS132 tenha demonstrado redução na densidade óptica em relação ao DMSO nas concentrações de 100 μ M e 200 μ M, porém está redução não foi estatisticamente significativa (Figura 7).

Um estudo de revisão proposto por Kró et al., (2015) mostrou que a betulina é um potente agente anticâncer e possui especificidade sobre as células cancerosas com baixa citotoxicidade para as células normais.

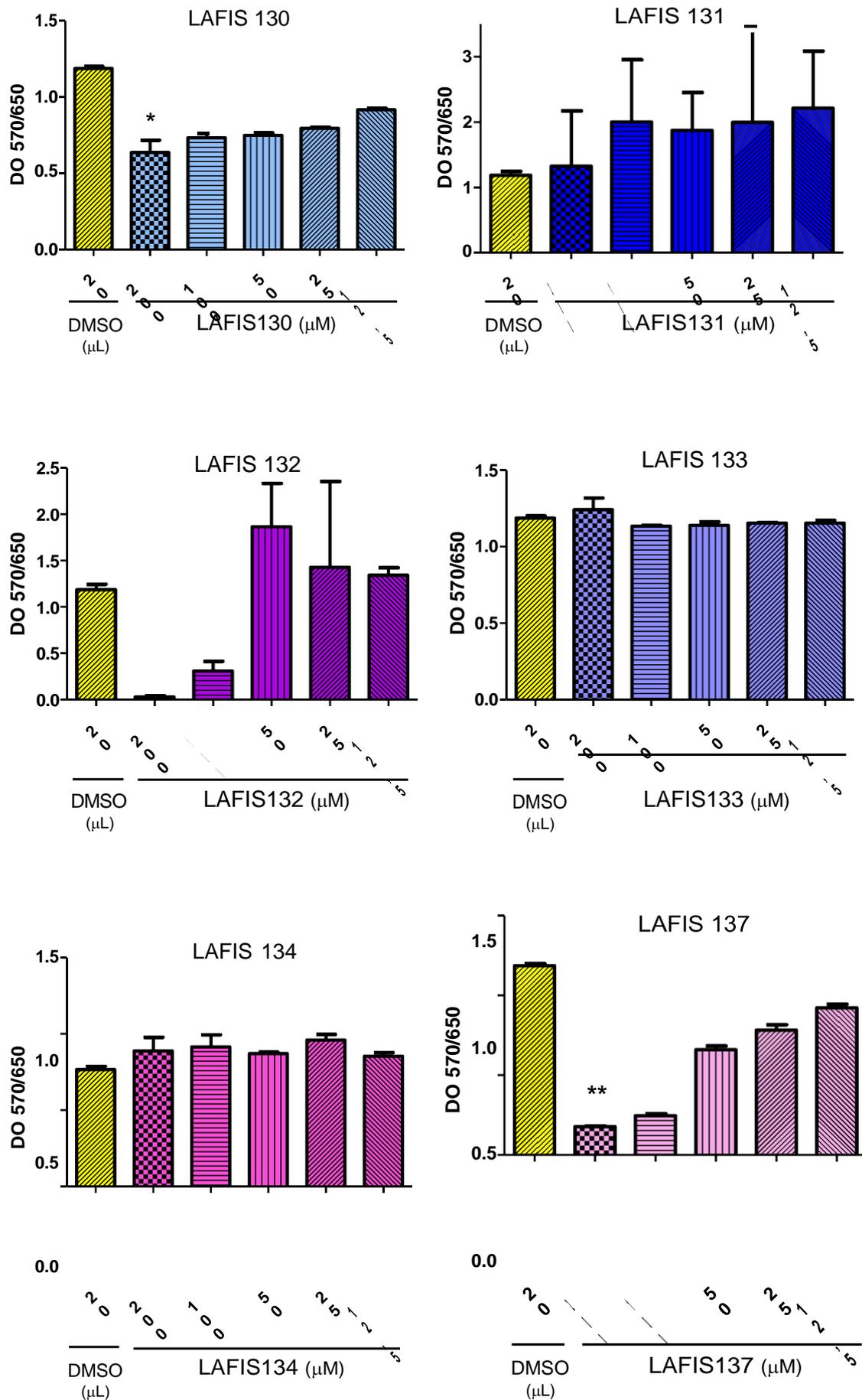


Figura 7: citotoxicidade da Betulina (LAFIS130) e dos seus derivados (LAFIS131, LAFIS132, LAFIS133, LAFIS134, LAFIS137) em células A549. A curva de concentração adicionada de cada

composto foi de 12.5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 200 μ M. Os compostos foram comparados com⁴⁰ DMSO no volume adicionado de 20 μ L. * $p < 0.05$ diferença significativa em relação ao controle DMSO, ** $p < 0.005$ diferença estatisticamente significativa em relação ao controle DMSO (Kruskal-Wallis).

Todos os compostos foram avaliados com relação à sua concentração citotóxica (CC_{50}) que reduziu o número de células em 50% com relação a sua densidade óptica, conforme apresentado abaixo na Tabela 1:

Tabela 1: Valores de CC_{50} dos compostos:

Compostos Derivados do Ácido Betulínico	CC_{50} μM	Compostos Derivados do Ácido Ursólico	CC_{50} μM	Compostos Derivados da Betulina	CC_{50} μM
LAFIS12	133.0	LAFIS111	35,9	LAFIS130	273.9
LAFIS121	16.2	LAFIS1113	16,5	LAFIS131	415,6
LAFIS1213	53.5	LAFIS1115	393.4	LAFIS132	80.6
LAFIS1215	72,6	LAFIS1116	384,1	LAFIS133	2494.8
LAFIS1216	369.6	LAFIS1119	8.4	LAFIS134	1174,6
LAFIS1219	1437.9			LAFIS137	57.4
LAFIS1220	12.7				

A concentração citotóxica 50% (CC_{50}) é definida como a concentração que reduz a densidade óptica das células não infectadas tratadas para 50% que em relação às células não infectadas não tratadas. Conforme demonstrado na tabela acima, a CC_{50} do ácido betulínico e dos seus derivados apresentaram-se de um modo geral menores que em comparação aos compostos derivados da betulina. Os compostos derivados do ácido ursólico apresentaram CC_{50} intermediária que em comparação aos demais grupos. Os compostos menos tóxicos foram os derivados da betulina.

Para a análise da atividade antiviral inicialmente foi realizada uma curva dose-resposta com diferentes concentrações virais (10^4 , 10^5 e 10^6 PFU/mL) para definir a melhor concentração de vírus que mata as células. A avaliação da viabilidade das células foi realizada após 96 horas de incubação pelo método MTT. Conforme demonstrado na Figura 5, todas as concentrações de VSR utilizadas mostraram ter matado significativamente as células quando comparadas com o grupo controle sem vírus e sem tratamento. Para os demais experimentos apresentados neste artigo, adotamos a concentração de 10^4 PFU/mL.

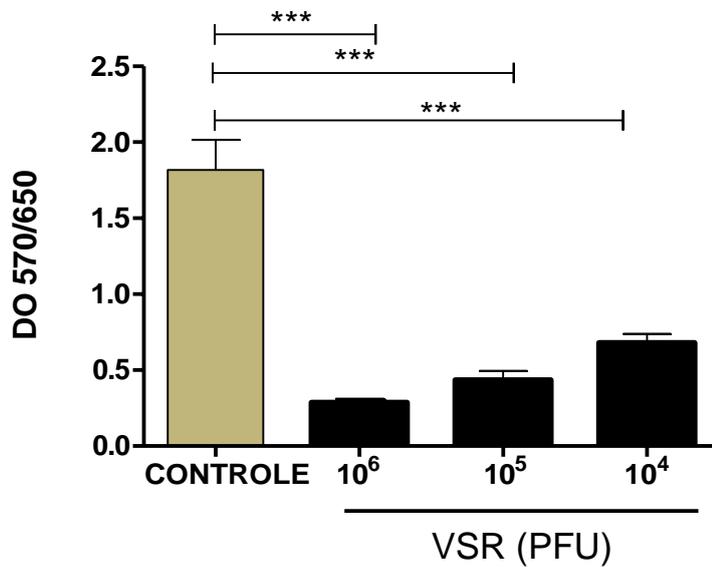


Figura 8: Curva de concentração do VSR.

*** $p < 0.0001$ diferença estatisticamente significativa em relação ao controle sem vírus e sem tratamento (Kruskal-Wallis).

Foi então avaliada a atividade antiviral dos compostos LAFIS12, LAFIS121, LAFIS1213, LAFIS1215, LAFIS111, LAFIS1113, LAFIS1116, LAFIS131, LAFIS132 e LAFIS134 utilizando as concentrações 12.5µM, 25µM, 50µM, 100µM e 200µM. As células A549 foram plaqueadas e após 24 horas de incubação foram infectadas com o VSR na concentração de 10⁴ PFU/mL por poço. Após 2 horas de incubação, foram adicionados os tratamentos. As células ficaram em incubação por 96 horas e foi adicionado o MTT para avaliar a viabilidade celular. O grupo sem tratamento e sem infecção foi comparado com o grupo com infecção pelo VSR, mostrando que houve morte das células causada pela infecção na concentração de 10⁴ PFU/mL. Os tratamentos com os compostos foram comparados com o grupo com a infecção pelo VSR sem tratamento, chamado de grupo VSR.

Como resultado, os tratamentos com o ácido betulínico (LAFIS12) e seus derivados (LAFIS121, LAFIS1213 e LAFIS1215) mostraram não apresentar atividade antiviral, pois ficou evidenciado pela baixa densidade óptica apresentada na leitura em espectrofotômetro quando comparados com o grupo VSR conforme demonstrado na Figura 9.

Em um estudo proposto por Yaolan et al., (2007) o extrato isolado de *Schefflera heptaphylla* (L.) contendo triterpenóides do tipo lupano entre eles o ácido betulínico e o ácido dióico diferentemente do nosso estudo, mostraram espectro antiviral amplo contra VSR. Entretanto, o estudo realizado por Shin et al (2013) demonstrou que o ácido betulínico não possui atividade antiviral contra o VSR significativa.

Hong et al., (2015) demonstrou o ácido betulínico atividade antiviral contra a influenza A / PR / 8/34 com cerca de 98% na concentração de 50µM e atividade antiviral de cerca de 30% na concentração de 10µM. Em estudo de Kanamoto et al., (2001) foi demonstrado que o ácido betulínico tem potente atividade inibidora contra o HIV-1. A atividade antiviral foi detectada pelo método do MTT e o derivado do ácido betulínico YK- FH312 inibiu a indução do vírus em células MT-4. A concentração efetiva de 50% (EC₅₀) do composto apresentou-se baixa, sendo de 0.011µg/ml, a concentração citotóxica (CC₅₀) foi de 14.03 µg/ml e o índice de seletividade do composto foi de 1.275.

Comparando os nossos resultados com outros descritos na literatura, podemos observar que em alguns casos o ácido betulínico poderá ter atividade antiviral e em outros casos, dependendo do vírus, da concentração do composto e das linhagens celulares, poderá não ocorrer atividade antiviral.

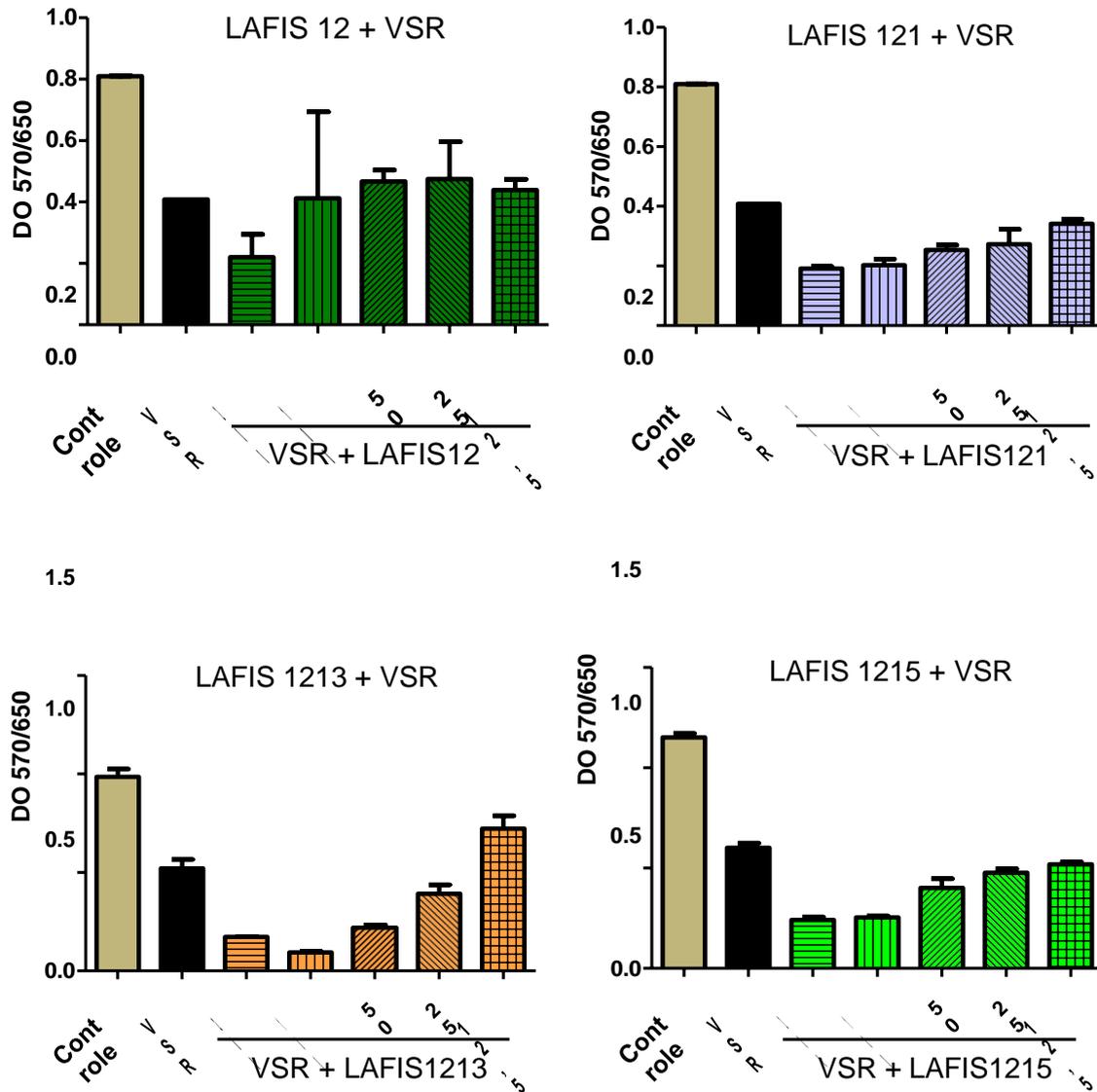


Figura 9: Atividade antiviral do ácido betulínico e seus derivados. Infecção das células A549 com o vírus 10^4 PFU/mL por poço e tratamentos com o ácido betulínico (LAFIS12) e seus derivados (LAFIS121, LAFIS1213 e LAFIS1215). A curva de concentração adicionada do composto foi de 12,5 μM, 25 μM, 50 μM, 100 μM e 200 μM. Os compostos foram comparados com os o grupo controle com a infecção pelo VSR (Kruskal-Wallis).

Os compostos derivados do ácido ursólico LAFIS1111, LAFIS1113 e LAFIS1116 também foram testados em células A549 para avaliação da atividade antiviral nas concentrações de 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 200 μ M. Os tratamentos com estes compostos também não apresentaram atividade antiviral quando comparados com o grupo controle com a infecção pelo VSR e isso foi observado através da baixa viabilidade celular apresentada mesmo após os tratamentos, conforme demonstrado na Figura 10.

Comparando os nossos resultados, um estudo proposto por de Shin et al., (2013) testou em células A549 o ácido carnósico e neste estudo, o ácido carnósico apresentou atividade antiviral contra o VSR e sua CC_{50} foi de 130,8 μ g/mL. Entretanto, neste estudo também foram extraídos o ácido ursólico, do mesmo modo que o nosso estudo, o composto não apresentou atividade antiviral significativa contra o VSR, somente o ácido carnósico apresentou atividade antiviral.

Em contrapartida, em estudo proposto por de Silva et al., (2013) que testou compostos derivados do ácido ursólico em células HEK293T, mostrou que os mesmos apresentam atividade anti-malária contra o *P. falciparum* 3D7.

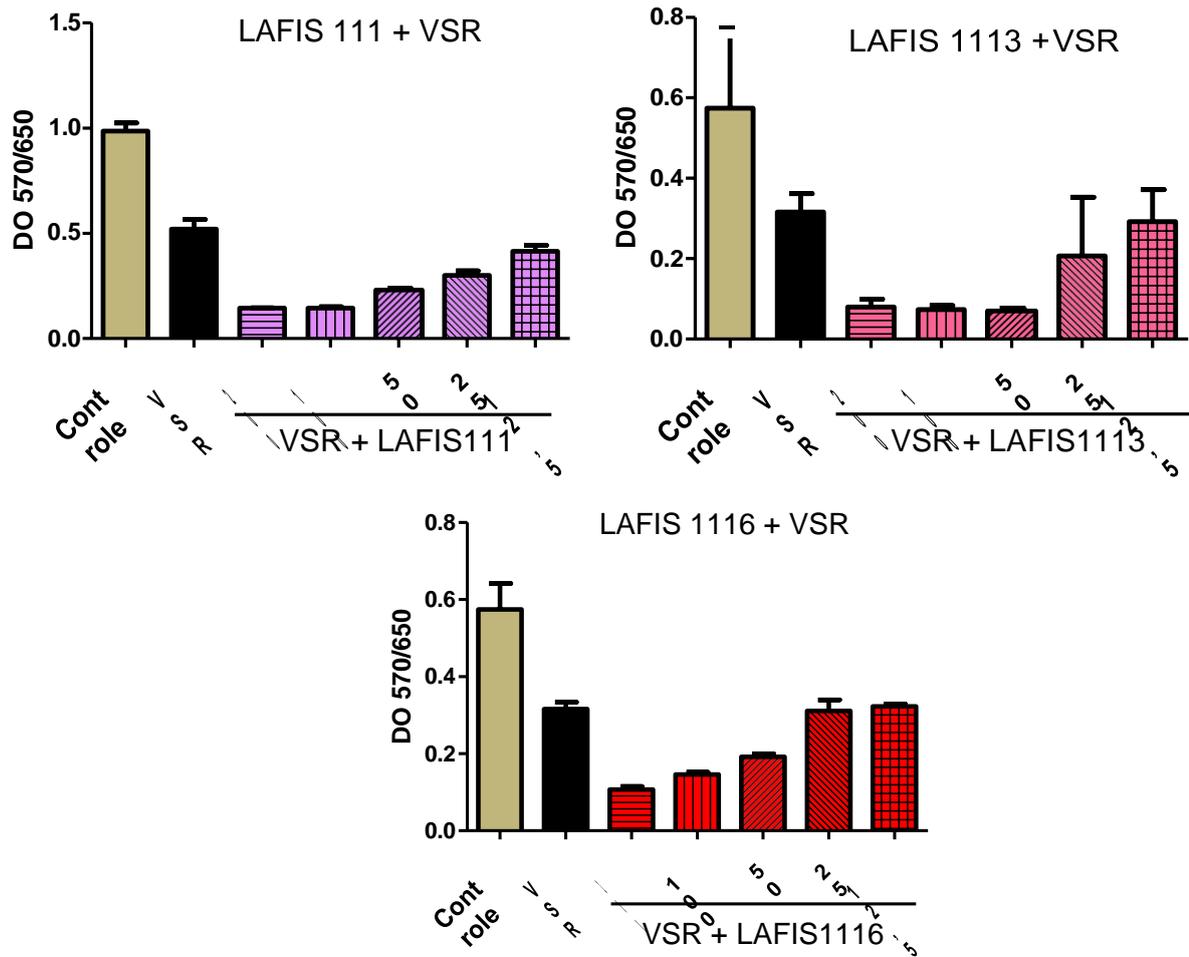


Figura 10: Atividade antiviral do ácido ursólico e seus derivados. Infecção das células A549 com o vírus 10^4 PFU/mL por poço e tratamentos com os compostos derivados do ácido ursólico LAFIS111, LAFIS1113 e LAFIS1116. A curva de concentração adicionada do composto foi de $12,5\mu\text{M}$, $25\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$ e $200\mu\text{M}$. Os compostos foram comparados com os o grupo controle com a infecção pelo VSR (Kruskal-Wallis)

Foi também avaliada a atividade antiviral dos compostos derivados da Betulina (LAFIS31, LAFIS132 e LAFIS134) em células A549 nas mesmas concentrações que os compostos anteriores. Os tratamentos com os compostos LAFIS131 e LAFIS134 protegeram as células da morte causada pelo vírus, demonstrando atividade antiviral (Figura 11). Deste modo, os compostos LAFIS131 e LAFIS134 mostraram ser eficazes como possíveis agentes antivirais, pois inibiram as células da replicação do VSR. O LAFIS131, sobretudo, mostrou aumentar a proliferação celular, uma vez que apresentou uma densidade óptica maior que a do grupo controle de células sem a infecção pelo vírus e sem o tratamento nas concentrações de 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M.

Entretanto, o composto LAFIS132 não apresentou atividade antiviral, que ficou evidenciado pela morte das células com a infecção do vírus mesmo após o tratamento (Figura 11).

Não há dados na literatura que mostrem a atividade antiviral da betulina contra o VSR. Neste trabalho encontramos compostos derivados da betulina que comprovaram ter atividade antiviral frente ao VSR.

Um estudo de Conforme Kró et al., (2015), mostrou que a betulina exibe um largo espectro de propriedades biológicas e farmacológicas e mostrou ser um potente agente anticâncer com especificidade sobre as células cancerosas.

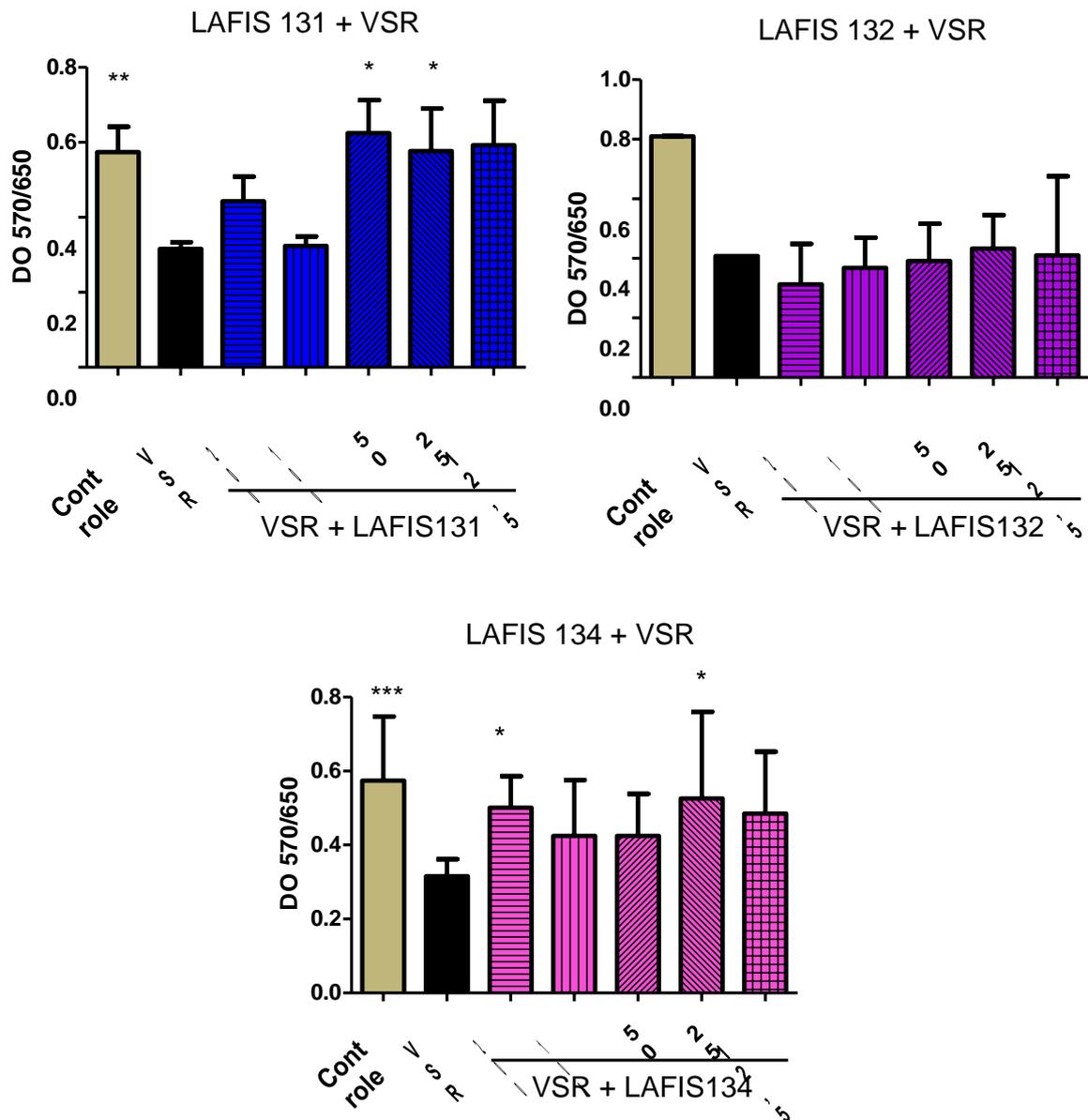


Figura 11: Atividade antiviral dos derivados da betulina. Infecção das células A549 com o vírus 10^4 PFU/mL por poço e tratamentos com os compostos derivados da betulina LAFIS131, LAFIS132 e LAFIS134. A curva de concentração adicionada de cada composto foi de 12,5 μM, 25 μM, 50 μM, 100 μM e 200 μM. Os compostos foram comparados com os o grupo controle com a infecção pelo VSR. * $p < 0,05$ diferença estatisticamente significativa em relação ao VSR. ** $p < 0,005$ diferença significativa em relação ao VSR (Kruskal-Wallis).

Conforme o resultado da atividade antiviral do LAFIS131 derivado da betulina ter se apresentado promissor, realizamos um experimento de análise da inibição da formação do sincício do VSR em células Vero. Para realizar este experimento as células Vero foram plaqueadas e após 24 horas em cultura, foi realizada a infecção com 10^4 PFU de VSR. Após 2 horas de incubação com o vírus foi adicionado o composto LAFIS131 na concentração de $2\mu\text{M}$. Foi utilizado como controle o vírus com o DMSO. As células permaneceram em cultura por 6 dias. A titulação do vírus foi realizada no 6º dia e foi observada uma evidente diminuição na formação dos sincícios no poço com o tratamento devido à marcação das células com o anticorpo no poço controle (DMSO) e a diminuição dos sincícios no poço com o tratamento, conforme demonstrado nas Figuras 12 e 13 abaixo. Este dado corrobora com o teste de atividade antiviral através do MTT onde o LAFIS131 demonstra ação protetora contra o VSR.

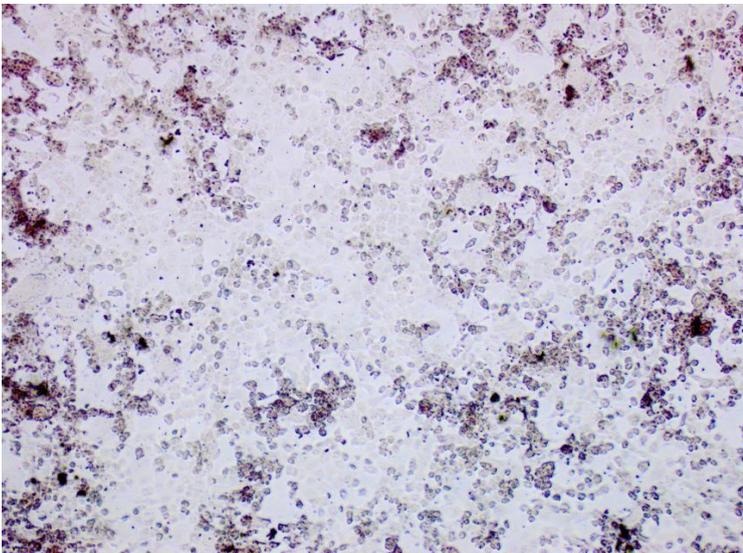


Figura 12: células VERO infectadas com VSR e tratadas com DMSO.

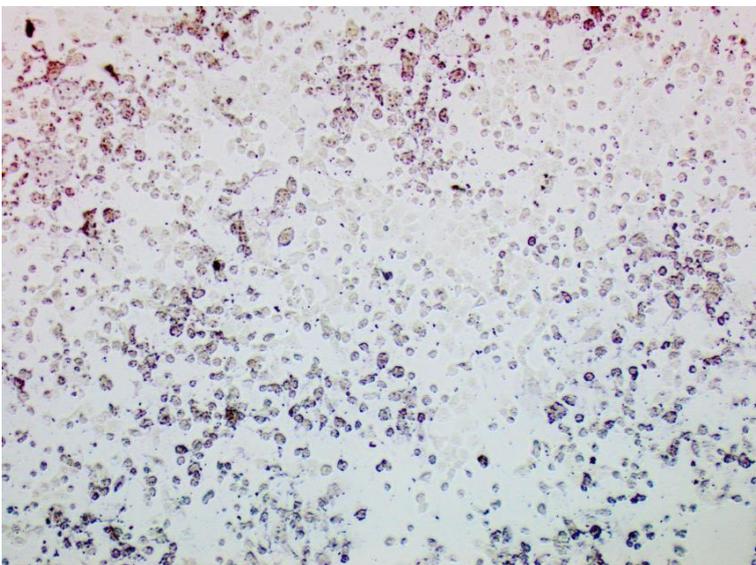


Figura 13: células VERO infectadas com o VSR e tratadas com LAFIS131.

Diferentemente do nosso estudo e em comparação com os nossos resultados, um estudo de Kanamoto et al., (2001) testou o efeito da formação do sincício com o composto YK-FH312 derivado do ácido betulínico em células MOLT-4 na formação dos sincícios do HIV-1 e observou que o efeito não foi inibido quando comparado com outros compostos não derivados do ácido betulínico.

O nosso achado é importante para a comprovação da atividade antiviral do composto derivado da betulina (LAFIS131) e poderá ser utilizado futuramente para testar os demais compostos que apresentarem atividade antiviral comprovada em ensaio através do MTT.

Na sequência os compostos, LAFIS12, LAFIS121, LAFIS1213, LAFIS1215, LAFIS111, LAFIS1113, LAFIS1116, LAFIS131, LAFIS132 e LAFIS134 foram avaliados com relação à sua concentração inibitória que reduziu em 50% a indução do vírus (IC_{50}), relacionada com a atividade antiviral do composto. A IC_{50} é expressa como sendo a concentração que alcança 50% de proteção às células infectadas pelo vírus.

Os resultados apresentados na Tabela 2 mostram que somente um composto derivado do ácido betulínico (LAFIS1213) e dois compostos derivados da betulina (LAFIS131 e LAFIS134) apresentaram IC_{50} positiva. Os demais compostos possuem um IC_{50} negativo, ou seja, não possuem nenhuma atividade antiviral.

Tabela 2: Valores de IC_{50} dos compostos:

Compostos Derivados do Ácido Betulínico	IC_{50} μM	Compostos Derivados do Ácido Ursólico	IC_{50} μM	Compostos Derivados da Betulina	IC_{50} μM
LAFIS12	Abaixo da menor dose testada	LAFIS111	Abaixo da menor dose testada	LAFIS131	197.95
LAFIS121	Abaixo da menor dose testada	LAFIS1113	Abaixo da menor dose testada	LAFIS132	Abaixo da menor dose testada
LAFIS1213	6.9	LAFIS1116	Abaixo da menor dose testada	LAFIS134	46.0
LAFIS1215	Abaixo da menor dose testada				

Deste modo, a partir da CC_{50} e da IC_{50} obtidas foi calculado o índice de seletividade de cada composto, conforme demonstrado abaixo na Tabela 3.

Os resultados apresentam um índice de seletividade mais alto para o composto derivado da betulina (LAFIS134) quando comparado com os outros LAFIS131 e LAFIS1213 (derivado da betulina e do ácido betulínico, respectivamente), sugerindo que o composto LAFIS134 seria o composto mais promissor, porque além de apresentar atividade antiviral, não apresenta citotoxicidade, desta forma, é mais seletivo às células infectadas com o VSR.

Tabela 3: Avaliação do Índice de Seletividade (IS) CC_{50}/IC_{50}

COMPOSTOS	Índice de Seletividade
LAFIS 1213	7.7
LAFIS 131	2.09
LAFIS 134	25.5

6 Considerações Finais

Neste estudo, os compostos triterpenos precursores o ácido betulínico, o ácido ursólico e a betulina foram avaliados quanto à sua citotoxicidade e, posteriormente, alguns compostos foram avaliados quanto à sua atividade antiviral. Após as análises de citotoxicidade e atividade antiviral, encontramos 2 compostos derivados da betulina, o LAFIS131 e o LAFIS134 com atividade antiviral comprovada. Estes compostos conferiram atividade protetora às células, diminuindo a morte celular causada pela infecção do VSR, aumentando a sua viabilidade e a sobrevivência das células. Podemos sugerir que a mudança na estrutura química desses compostos pode conferir maior atividade antiviral, porém o mecanismo de ação da atividade antiviral desses compostos não está ainda esclarecido e novos estudos deverão ser realizados para compreender melhor o mecanismo pelo qual esses compostos agem contra o VSR.

Embora o VSR tenha sido identificado há décadas, atualmente não há nenhuma vacina aprovada para o uso. Novas terapias potenciais estão sob investigação e avaliação, mas o fato é que nenhuma dessas terapias estão aprovadas pelas agências regulatórias devido a questão econômica e a complexidade dos testes clínicos, por isso a busca por novas terapias antivirais eficazes se faz necessária.

7 Referências

- American Academy of Pediatrics Subcommittee on Diagnosis and Management of Bronchiolitis: Diagnosis and management of bronchiolitis. *Pediatrics* 2006.118:1774–1793.
- Betancur-Galvis, et al., Cytotoxic and Antiviral Activities of Colombian Medicinal Plant Extracts of the *Euphorbia* genus. *Mem Inst Oswald Cruz*. 2002, June. Rio de Janeiro, Vol. 97 (4): 541-546,
- Bezerra, P. G. et al. Viral and atypical bacterial detection in acute respiratory infection in children under five years. *PLoS One*, [S.l.], v. 6, n. 4, p. e18928 2011.
- Brasier AR, Spratt H, Wu Z, Boldogh I, Zhang Y, Garofalo RP, et al., "Nuclear heat shock response and novel nuclear domain 10 reorganization in respiratory syncytial virus-infected A549 cells identified by high-resolution two-dimensional gel electrophoresis" *J Virol*. 2004. Nov;78(21):11461-76.
- Byrd, L.G., Prince, G.A. Animal models of respiratory syncytial virus infection. *Clin. Infect. Dis*. 1997.25 (6), 1363–1368.
- Chang J, Braciale TJ. Respiratory syncytial virus infection suppresses lung CD8+ T-cell effector activity and peripheral CD8+ T-cell memory in the respiratory tract. *Nat Med*. 2002. Jan;8(1):54-60.
- Chang, J. "Current progress on development of respiratory syncytial virus vaccine". *BMB Rep*. 2011. 44 (4), 232–237.
- Chang, Jun, and Thomas J. Braciale. "Respiratory syncytial virus infection suppresses lung CD8+ T-cell effector activity and peripheral CD8+ T-cell memory in the respiratory tract." *Nature medicine* 8.1 2002: 54-60.
- Cho, H.J., Shim, S.Y., Son, D.W., et al. "Respiratory viruses in neonates hospitalized with acute lower respiratory tract infections". *Pediatr*. 2013. Int. 55, 49– 53.
- Chu, H.Y.; Englund, J.A., *Respiratory Syncytial Virus Disease: Prevention and Treatment*. In: LARRY, A.J.; J., GRAHAM, B.S. (Ed.). *Challenges and opportunities for respiratory syncytial virus vaccines*. Berlin: Springer, 2013. p. 235-258.
- Coen D.M. & Richman D.D. Antiviral agents. In: Knipe D.M. & Howley P.M. (Eds), *Fields Virology*. 5th ed. Williams and Wilkins, Philadelphia 2007. p.447-485.

Collins et al., Respiratory Syncytial Virus: Virology, Reverse Genetics, and Pathogenesis of Disease In: Larry, A.J.; J., Graham, B.S. (Ed.). Challenges and opportunities for respiratory syncytial virus vaccines. Berlin: Springer, 2013. p.7.

Collins, P.L., Hill, M.G., Cristina, J., Grosfeld, G. "Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus". Proc. Natl. Acad. 1996. Sci. U.S.A. 93, 81–85.

Dudas RA, Karron RA. Respiratory syncytial virus vaccines. Clin Microbiol Rev. 1998. Jul;11(3):430-9.

Empey KM, Peebles Jr RS, and Kolls JK. Pharmacologic Advances in the Treatment and Prevention of Respiratory Syncytial Virus. Clin Infect Dis. 2010. May 1; 50(9): 1258–1267.

Evans CW, Atkins C, Pathak A, et al., Benzimidazole analogs inhibit respiratory syncytial virus G protein function. Antiviral Res. 2015. Sep;121:31-8.

Fearn, R., Collins, P.L. "Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription". J. Virol. 1999. 73, 5852–5864.

Fulginiti VA, Eller JJ, Sieber OF, et al., "Respiratory virus immunization. I. A field trial of two inactivated respiratory virus vaccines; an aqueous trivalent parainfluenza virus vaccine and an alumprecipitated respiratory syncytial virus vaccine." Am J Epidemiol 1969. 89 (4): 435-448.

Glezen, W. P., L. H. Taber, et al. "Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus." Am J Dis Child 1986. 140 (6): 543-546.

González, PA., Bueno, SM., Carreño, LJ., et al. "Respiratory syncytial virus infection and immunity." Reviews in medical virology 2012. 22.4: 230-244.

Graham, B.S. "Biological challenges and technological opportunities for respiratory syncytial virus vaccine development. Immunol". Rev. 2011. 239(1), 149–166.

Grosfeld, H., Hill, M.G., Collins, P.L. "RNA replication by respiratory syncytial virus (RSV) is directed by the N, P, and L proteins; transcription also occurs under these conditions but requires RSV superinfection for efficient synthesis of full length mRNA". J. Virol. 1995. 69, 5677– 5686.

Guerguerian AM, Gauthier M, Lebel MH, Farrell CA, Lacroix J: Ribavirin in ventilated respiratory syncytial virus bronchiolitis. A randomized, placebo-controlled trial. Am J Respir Crit Care Med 1999, 160:829–834.

Hall CB, McBride JT, Walsh EE, Bell DM, Gala CL, Hildreth S, Ten Eyck LG, Hall WJ: Aerosolized ribavirin treatment of infants with respiratory syncytial viral infection. A randomized double-blind study. *N Engl J Med* 1983, 308:1443–1447.

Hall, C.B., Weinberg, G.A., Blumkin, A.K., et al. "Respiratory syncytial virus-associated hospitalizations among children less than 24 months of age". *Pediatrics* 2013. 132 (2), 341–348.

Hardy, R.W., Harmon, S.B., Wertz, G.W. "Diverse gene junctions of respiratory syncytial virus modulate the efficiency of transcription termination and respond differently to M2-mediated antitermination". *J. Virol.* 1999. 73, 170– 176.

Hardy, R.W., Wertz, G.W. "The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription". *J. Virol.* 1998. 72, 520– 526.

Hong EH et al. Anti-Influenza Activity of Betulinic Acid from *Zizyphus jujube* on influenza A/PR/8 Virus. *Biomol Ther (Seoul)*.2015 Jul;23(4):345-9.

Jorquera, P.A., Oakley, K.E., Tripp, R.A. "Advances in and the potential of vaccines for respiratory syncytial virus". *Expert Rev. Respir. Med.* 2013. 7 (4), 411–427.

Kanamoto T, et al. Anti-human immunodeficiency virus activity of YK-FH312 (a betulinic acid derivative), a novel compound blocking viral maturation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001. Apr;45(4):1225-30.

Kopelman, Benjamin Israel and Milton Harumi Miyoshi. "Infecção pelo vírus sincicial respiratório." *Pediatrics Moderna* 35 1999: 233-39.

Król SK et al. Comprehensive review on betulin as a potent anticancer agent. *Biomed Res Int.* 2015;2015:584189. doi: 10.1155/2015/584189. Epub 2015 Mar 19.

Law BJ, Wang EE, MacDonald N, McDonald J, Dobson S, Boucher F, Langley J, Robinson J, Mitchell I, Stephens D: Does ribavirin impact on the hospital course of children with respiratory syncytial virus (RSV) infection? An analysis using the pediatric investigators collaborative network on infections in Canada (PICNIC) RSV database. *Pediatrics* 1997, 99:E7.

Li Y, Jiang R, Ooi LS, But PP, Ooi VE. Antiviral triterpenoids from the medicinal plant *Schefflera heptaphylla*. *Phytother Res.* 2007 May;21(5):466-70.

Mackman RL, Sangi M, Sperandio D, et al., Discovery of an oral respiratory syncytial virus (RSV) fusion inhibitor (GS-5806) and clinical proof of concept in a human RSV challenge study. *J Med Chem.* 2015. Feb 26;58(4):1630-43.

Mason, S.W., Aberg, E., Lawetz, C., DeLong, R., Whitehead, P., Liuzzi, M. "Interaction between human respiratory syncytial virus (RSV) M2-1 and P proteins is required for reconstitution of M2-1-dependent RSV minigenome activity". *J. Virol.* 2003. 77, 10670– 10676.

Moler FW, Steinhart CM, Ohmit SE, Stidham GL: Effectiveness of ribavirin in otherwise well infants with respiratory syncytial virus-associated respiratory failure. Pediatric Critical Study Group. *J Pediatr* 1996, 128:422–428.

Munywoki, P.K., Ohuma, E.O., Ngama, M., et al., "Severe lower respiratory tract infection in early infancy and pneumonia hospitalizations among children". *Kenya Emerg. Infect. Dis.* 2013. 19 (2), 223–239.

Nair, H., Nokes, D.J., Gessner, B.D., et al., "Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis". *Lancet* 2010. 375 (9725), 1545–1555.

Oliveira, A.P. et al. Human respiratory syncytial virus N, P and M protein interactions in HEK-293T cells. *Virus Res.* 2013 Oct;177(1):108-12.

Ohol, Y. M. Direct Inhibition of Cellular Fatty Acid Synthase Impairs Replication of Respiratory Syncytial Virus and Other Respiratory Viruses. *PLOS ONE* 2015 (11), 1-20.

Rastogi, S., Pandey, M. M. and Kumar Singh Rawat, A. Medicinal plants of the genus *Betula*-Traditional uses and a phytochemical-pharmacological review. *J. Ethnopharmacol.* 2015.159, 62-83.

Rudraraju, R., Jones, B.G., Sealy, et al. "Respiratory syncytial virus: current progress in vaccine development". *Viruses* 2013. 5 (2), 577–594.

S. P. Jae, H. R. Si, K. K. Dae et al., "Anti-cancer effect of betulin on a human lung cancer cell line: a pharmacoproteomic approach using 2 D SDS PAGE coupled with nano-HPLC tandem mass spectrometry," *Planta Medica*, vol. 75, no. 2, pp. 127– 131, 2009.

Selwyn BJ. The epidemiology of acute respiratory tract infection in young children: comparison of findings from several developing countries. Coordinated Data Group of BOSTID Researchers. *Rev Infect Dis.* 1990. Nov-Dec;12 Suppl 8:S870-88.

Shaw, C.A., Ciarlet, M., Cooper, et al. "The path to an RSV vaccine". *Curr. Opin. Virol.* 2013. 3 (3), 332–342.

Shin HB, Choi MS, Ryu B, et al. Antiviral activity of carnosic acid against respiratory syncytial virus. *Virol J.* 2013. Oct 8;10:303.

Silva GN, Maria NR, Schuck DC, et al. Two series of new semisynthetic triterpene derivatives: differences in anti-malarial activity, cytotoxicity and mechanism of action. *Malar J*. 2013. Mar 9;12:89.

Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP). Diretrizes para o Manejo da Infecção Causada pelo Vírus Sincicial Respiratório (VSR). (2011) Disponível em: http://www.sbp.com.br/src/uploads/2015/02/diretrizes_manejo_infec_vsr_versao_final1.pdf Acesso em: 01/12/2015.

Tayyari F, Marchant D, Moraes TJ, et al., "Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus." *Nat Med* 2011.17(9): 1132-1135.

Tregoning, John S. and Jürgen Schwarze. "Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology." *Clin Microbiol Rev*. 2010. Jan; 23(1): 74–98.

Vieira SE, Stewien KE, Queiroz DA, et al. Clinical patterns and seasonal trends in respiratory syncytial virus hospitalizations in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2001.May-Jun;43(3):125-31.

W. Rzeski, A. Stepulak, M. Szymanski et al., "Betulin elicits anti-cancer effects in tumour primary cultures and cell lines in vitro," *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 2009, vol. 105, no. 6, pp. 425–432.

Wang, D., Bayliss, S., Meads, C. "Palivizumab for immunoprophylaxis of respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis in high-risk infants and young children: a systematic review and additional economic modelling of subgroup analyses". *Health Technol. Assess*. 2011a. 15 (5), 1–124.

Wang, H.W., Lin, Y.C., Pai, T.W., Chang, H.T. "Prediction of B-cell linear epitopes with a combination of support vector machine classification and amino acid propensity identification". *J. Biomed. Biotechnol*. 2011b. 2011, 432830.

Weber, E., Humbert, B., Streckert, H.J., Werchau, H. "Nonstructural protein 2 (NS2) of respiratory syncytial virus (RSV) detected by an antipeptide serum". *Respiration* 1995. 62, 27– 33.

WOLFRAM RESEARCH COMPANY. WolframAlpha. [S.I.], 2016. Disponível em: <<http://www.wolframalpha.com> >. Acesso em: 14 jan. 2016.

Y. Li, K. He, Y. Huang et al., "Betulin induces mitochondrial cytochrome c release associated apoptosis in human cancer cells," *Molecular Carcinogenesis*, vol. 49, no. 7, pp. 630–640, 2010.

Yogeeswari P, Sriram D. Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. *Curr Med Chem*. 2005;12(6):657-66.

Zeitlin, L., Bohorov, O., Bohorova, N., et al. "Prophylactic and therapeutic testing of nicotiana-derived RSV-neutralizing human monoclonal antibodies in the cotton rat model". *MAbs*. 2013. 5(2), 263–269.

8 Artigo Publicado

Received: 1 April 2018 | Revised: 23 June 2018 | Accepted: 29 June 2018
 DOI: 10.1002/ardp.201800108



FULL PAPER

DPhG ARCH PHARM
 Archiv der Pharmazie

Synthesis of three triterpene series and their activity against respiratory syncytial virus

Gloria N. Santos da Silva¹ | Diana Monti Atik² | Jheini L. Antunes Fernandes² |
 Deise de Freitas do Nascimento² | Tiago Fazolo² | Ana Paula Duarte de Souza² |
 Simone C. Baggio Gnoatto¹

¹ Phytochemistry and Organic Synthesis Laboratory, School of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

² Clinical and Immunology Laboratory, Biomedical Research Institute, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Correspondence

Dr. Gloria N. Santos da Silva, Phytochemistry and Organic Synthesis Laboratory, School of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90610-000, Brazil.
 Email: narjarags@gmail.com

Funding information

CNPq; CAPES

Abstract

The human respiratory syncytial virus (hRSV) is a leading cause of hospitalization due to acute lower respiratory infection especially in infants and young children, sometimes causing fatal cases. The monoclonal antibody palivizumab is one of the available options for preventing this virus, and at the moment there are several hRSV vaccine trials underway. Unfortunately, the only drug option to treat hRSV infection is ribavirin, which can be used in severe high-risk cases. For this reason, new medicines are needed and, in this context, the triterpenes and their derivatives are promising alternatives, since many of them have shown important antiviral activity, such as bevirimat. Therefore, we report three series of triterpene (betulin (BE), betulinic acid (BA), and ursolic acid (UA)) derivatives tested against hRSV. The derivatives were synthesized by using commercial anhydrides in an easy and inexpensive step reaction. For the antiviral assay, A549 cells were infected by hRSV and after 96 h of compound or ribavirin (positive control) treatment, the cell viability was tested by MTT assay. DMSO, non-infected cells and infected cells without treatment were used as negative control. The triterpene esterification at the hydroxyl group resulted in 17 derivatives. The 3,28-di-O-acetylbetulin derivative (**1a**) showed the best results for cell viability, and real-time PCR amplification was performed for **1a** treatment. Remarkably, one new anti-hRSV prototype was obtained through an easy synthesis of BE, which shall represent an alternative for a new lead compound for anti-hRSV therapy.

KEYWORDS

A549 cells, betulin, betulinic acid, respiratory syncytial virus, ursolic acid

1 | INTRODUCTION

Several viral diseases are a global public health burden, such as dengue,^[1] Zika,^[2] Ebola,^[3] viral hepatitis, and acquired immunodeficiency syndrome (AIDS).^[4] Another virus causing a global impact on human health is the pathogen named human respiratory syncytial virus

(hRSV), which is a member of the *Paramyxoviridae* family and subfamily *Pneumovirinae*.^[5] Despite considerable efforts toward the development of effective treatments for hRSV disease, this seasonal infection is still a major cause of pneumonia and bronchiolitis in infants, in young children, and even in adults.^[6–8] A United States study estimated that hRSV is the most common cause of viral mortality in children aged

under 5 years.^[9] hRSV is highly contagious and is transmitted by direct contact with nasal secretions or by fomite spread on hands, cots, and fluffy toys. Preventing the spread of the virus is possible by promoting cough etiquette, hand washing, and cohorting hospitalized hRSV patients.^[10] The incubation period is typically 2–8 days, with virus replication spreading from the upper respiratory tract epithelial cells to the lower respiratory tract.^[11]

The available options for preventing and treating hRSV are limited to select populations in high-resource settings.^[12] One of this is the monoclonal antibody palivizumab for prophylaxis.^[13] The aerosolized antiviral agent ribavirin (1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) is the approved drug for the treatment of hRSV infections. Ribavirin is a synthetic guanosine nucleoside analogue with *in vitro* antiviral activity against a range of RNA and DNA viruses.^[14] There is a concern regarding the efficacy of ribavirin and based on the available data it is not recommended in the current guidelines for management of bronchiolitis.^[15]

An example of therapeutic strategies that have been developed for the treatment of hRSV infection is GS-5806, which is an hRSV fusion and entry inhibitor that successfully completed a phase I safety trial and a phase II hRSV challenge trial in adults.^[16] Other studies have been developing but the majority of the compounds are still in the preliminary stages of research, such as emodin.^[17]

Although some agents have been reported to have anti-hRSV activity,^[16–19] new strategies for therapeutic intervention during moderate to severe hRSV infection are evidently needed. It is clearly seen that the progress made in hRSV vaccines and therapeutics since the discovery of the virus in 1950 has been poor, particularly compared to other viruses like influenza virus, hepatitis C virus, and HIV.^[12] In this context, natural compounds, as triterpenes, might be an alternative. The triterpenes, betulin (BE), betulinic acid (BA), and ursolic acid (UA) (Figure 1), have shown a variety of biological activity.

BE is a pentacyclic triterpene alcohol with a lupane skeleton. BE can be used as such, or after chemical modification as a starting compound for other useful materials and compounds, such as BA which possess various interesting pharmacological properties.^[20] For instance, BA has described its anti-HIV, antibacterial, antimalarial, anti-inflammatory, and anthelmintic activities.^[21] Furthermore, a promising BA derivative called bevirimat, the first-in-class HIV-1 maturation inhibitor, has been modified at C-28 position and resulted in even more

active compound.^[22] Consequently, BE and BA are of interest for medicine as the basis for the development of new antiviral agents.

The therapeutic potential of UA, a pentacyclic triterpene found in several traditional plants, has also attracted attention. The functional properties have been described for UA, such as antibacterial, antiprotozoal, anti-inflammatory, anti-HIV, and antitumor.^[23,24]

However, the ability of these triterpenes for the inhibition of hRSV was not evaluated. Since there is not a variety of medicine for hRSV treatment, this current study shows efforts to find a new and effective compound as an alternative. Thus, we assayed 20 compounds divided in the three triterpenes series; BE, BA, and UA and their carbon 3 (C-3) and carbon 28 (C-28 for BE) derivatives to verify their anti-hRSV potential.

2 | RESULTS AND DISCUSSION

Through an easy and inexpensive step reaction, it was possible to obtain 17 triterpenes derivatives with satisfactory yield (range of 70–93%). The structures of all derivatives are depicted in Table 1. After the synthesis of these compounds, their structural elucidation could be deduced from ¹H, ¹³C NMR, and HR-ESI-MS data. The data of BA and UA series were compared with those previously described in our prior studies,^[25,26] and 3,28-di-O-succinylbetulin (**1d**) was compared with data published by Tian et al.^[27] In addition, we have described for the first time four new BE derivatives. The BE was modified at C-3 and C-28 to determine if ester substituents influence anti-hRSV activity, whereas the anti-HIV derivative from BA, bevirimat, is the successful result of C-3 modification and in our previous studies against another microorganism, malaria parasite, also displayed improvement of activity when C-3 and C-28 were chemically modified.^[25,26] The ¹H NMR spectra of the BE derivatives have two singlets around δ 4.50 ppm suggesting the presence of an isoprenyl group at position H-29. The loss of *dd* at δ 3.05 ppm suggests that in the presence of H-3 the carbon binding at hydroxyl was substituted for an ester group. Also, after the change at C-3 the presence of $-\text{CHOCO}-$ around δ 2.50 ppm suggested that esterification had occurred. The signals of ester groups were observed in the ¹³C NMR spectrum at the range of δ 157–177 ppm. The isoprenyl was evidenced in signals around δ 109 (C-29) and δ 150 ppm (C-20).

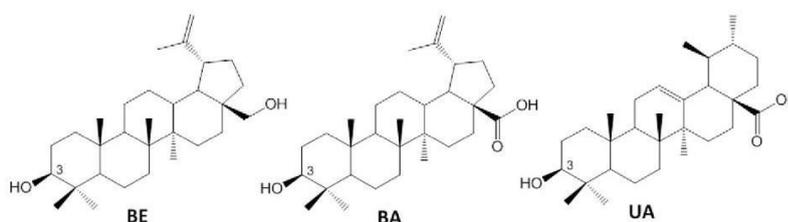
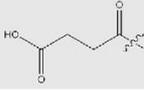
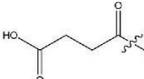


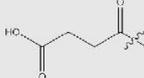
FIGURE 1 Chemical structures of betulin (BE), betulinic acid (BA), and ursolic acid (UA)

TABLE 1 Library of the three series of triterpene derivatives, cytotoxicity and anti-hRSV activity by MTT assay

Code	R	CC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ (μM)	TI
BE	H	7.48	69.72	0.11
1a		2245.38	104.66	21.45
1b		268.27	196.81	1.36
1d		11.197	120.15	0.093
1e		624.95	98.87	6.32
1f		244.96	73.05	3.35
BA	H	30.31	***	***
2a		13.74	27.77	0.49
2b		33.14	38.51	0.86
2c		120.48	33.81	3.56
2d		30.79	93.77	0.33
2e		16.02	22.19	0.72
2f		140.08	84.57	1.66
UA	H	23.73	18.67	1.27
3a		26.80	48.75	0.54

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Code	R	CC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ (μM)	TI
3b		14.61	71.00	0.20
3c		685.00	86.85	7.89
3d		46.57	***	***
3e		12.77	28.09	0.45
3f		12.22	76.44	0.16
Ribavirin	-	7.02 ^a	1.96 ^a	3.57

CC₅₀, 50% cytotoxic concentration; EC₅₀, 50% inhibitory concentration of the viral effect; TI, therapeutic index defined as CC₅₀ over EC₅₀; ***, beyond the highest tested concentration (100 μM).

^a μg.

Regarding the biological assay, Table 1 presents the antiviral activity expressed as the EC₅₀ for all compounds against hRSV in A549 cells. EC₅₀ is the compound concentration required to reduce virus-induced cytopathogenicity or viral plaque formation by 50%. The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀), causing a 50% decrease in cell viability was determined using a colorimetric 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay system. Ribavirin was the reference compound included. Among the precursor triterpenes tested, UA proved to be more active with EC₅₀ = 18.67 μM, although in the UA series the 3c derivative was more selective with TI = 7.89. Furthermore, the BE derivative (1a) displayed the higher value for TI = 21.45, showing the importance of lupane for the acetyl modification. Based on the result of TI, we selected the BE derivative (1a) to perform an experiment to evaluate antiviral activity associated with virus replication. Real-time PCR amplification was performed to hRSV protein F gene and β-actin from cells infected with hRSV or infected and treated with 1a (12.5 and 50 μM) or ribavirin (0.3 and 1.2 μg) during 96 h. We found that BE derivative (1a) was able to significantly reduce the hRSV RNA gene expression suggesting a reduction in virus replication (Figure 2). Thus, our results show that the derivative more

active is not selective. It is relevant research since few triterpene derivatives have been evaluated against hRSV, such as described by Li et al.^[28] The planning of new derivatives from 1a may be a promising alternative for obtaining a future drug, as alternative therapy against a virus with high morbidity and mortality range.

3 | CONCLUSION

In summary, three series of triterpene derivatives (BE, BA, and UA) were prepared in high yield and in a total of 17 derivatives. All compounds were evaluated against hRSV and BE derivative 1a was the most selective. Then real-time PCR amplification was performed for hRSV protein F gene and β-actin of infected cells treated with 1a, demonstrating an effect of this compound in reducing virus RNA gene expression. Further, structure modifications of 1a might afford a novel series of anti-hRSV compounds that hold promise for treating a burden pathogen. These modifications will be planned in order to find a compound activity and selective. However, here we display information that may base further investigations, in the scenario where the

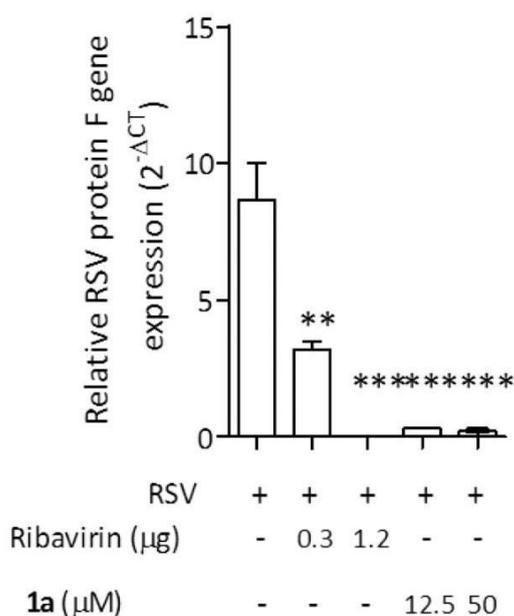


FIGURE 2 Antiviral activity of **1a**. Real-time PCR amplification was performed for hRSV protein F gene and β -actin gene from cells infected with hRSV or infected and treated with **1a** (12.5 and 50 μ M) or ribavirin (0.3 and 1.2 μ g) during 96 h. Relative expression was obtained by subtracting the CT value of β -actin from CT value of hRSV protein F gene. Statistical significance between the groups and hRSV was determined with one-way ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc* test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

only drug available, ribavirin, is not selective and for this reason is not safe to use.

4 | EXPERIMENTAL

4.1 | Chemistry

4.1.1 | Obtaining of BE, BA, and UA

BA was isolated from *Platanus acerifolia* bark (voucher specimen: ICN 171329) and UA was isolated from waste apple (*Malus domestica*) peels obtained from a local juice factory, as described by Silva et al.^[26] Both compounds were identified using full spectroscopy data, which are consistent with those previously described.^[25,26] BE was purchased from Sigma.

4.1.2 | Semisynthesis of BE, BA, and UA derivatives

BE, BA, and UA derivatives were synthesized according to the general procedure described in the literature.^[25,26] In brief, for ester derivatives the commercial anhydride (1.1 mmol, 5 Eq) and DMAP (0.22 mmol, 1 Eq) were added to BA or UA (0.22 mmol) in pyridine or CH_2Cl_2 (2 mL) and refluxed for 24 h (for cyclic anhydrides) or

processed without refluxing for 1 h (for acyclic anhydrides). The crude residue was purified in column chromatography to give the expected pure compounds. Column chromatography was carried out using silica gel 60 (Merck). Analytical thin layer chromatography was performed on silica gel 60 plates (Merck) and spots visualized by spraying with anisaldehyde/sulfuric. All compounds obtained are illustrated in Table 1.

The NMR spectra of compounds **1a**, **1b**, **1e**, and **1f** are provided as Supporting Information. The InChI codes of the investigated compounds together with some biological activity data are also provided as Supporting Information.

3,28-Di-O-acetylbetulins (1a)

Compound **1a** was prepared by using acetic anhydride. White powder, yield = 90%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 1.03 (s, 15H, CH_3 -23; CH_3 -24; CH_3 -25; CH_3 -26 and CH_3 -27); 1.06 (m, 1H, CH-13); 1.09 (t, 1H, CH-18); 1.12 (t, 2H, CH_2 -1); 1.24 (t, 2H, CH_2 -16); 1.36 (t, 2H, CH_2 -15); 1.39 (m, 4H, CH_2 -2 and CH_2 -21); 1.43 (t, 4H, CH_2 -11 and CH_2 -22); 1.50 (t, 2H, CH_2 -6); 1.51 (m, 2H, CH_2 -12); 1.56 (t, 2H, CH_2 -7); 1.62 (t, 1H, CH-5); 1.79 (br s, 3H, CH_3 -30); 1.84 (m, 2H, CH_2 -2); 1.86 (t, 1H, CH-9); 2.07 (s, 6H, CH_3 -32 and CH_3 -34); 2.44 (ddd, 1H, CH-19); 4.24 (dd, 2H, CH_2 -28); 4.46 (dd, 1H, CH-3); 4.58 (s, 1H, CH-29b); 4.68 (s, 1H, CH-29a). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 16.15 (C-25); 16.48 (C-26 and C-27); 18.15 (C-6); 19.09 (C-34); 20.78 (C-32); 21.06 (C-30); 21.32 (C-11); 25.12 (C-2); 26.90 (C-12); 23.68 (C-23 and C-24); 27.93 (C-15); 29.55 (C-21); 29.71 (C-16 and C-22); 35.53 (C-7); 37.03 (C-10); 37.53 (C-13); 37.77 (C-4); 38.36 (C-1); 40.86 (C-8); 42.66 (C-14); 48.74 (C-19); 46.28 (C-18); 47.69 (C-17); 50.25 (C-9); 55.35 (C-5); 62.78 (C-28); 80.89 (C-3); 109.88 (C-29); 150.09 (C-20); 170.99 (C-31); 171.60 (C-33). HRMS (ESI-MS, m/z); $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd. for $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{O}_4\text{Na}$: 549.3915. Found: 549.2620, mp: 210–214°C.

3,28-Di-O-isobutylbetulins (1b)

The compound **1b** was prepared by using isobutyric anhydride. White powder, yield = 93%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 0.96 (t, 2H, CH_2 -16); 1.02 (s, 15H, CH_3 -23, CH_3 -24, CH_3 -25, CH_3 -26 and CH_3 -27); 1.06 (t, 1H, CH-18); 1.13 (m, 3H, CH_2 -1 and CH-13); 1.17 (d, 12H, CH_3 -33, CH_3 -34, CH_3 -37 and CH_3 -38); 1.38 (t, 4H, CH_2 -15 and CH_2 -21); 1.41 (m, 4H, CH_2 -2 and CH_2 -11); 1.49 (m, 4H, CH_2 -6 and CH_2 -12); 1.57 (t, 2H, CH_2 -7); 1.60 (t, 1H, CH-5); 1.67 (t, 2H, CH_2 -22); 1.79 (br s, 3H, CH_3 -30); 2.42 (m, 1H, CH-36); 2.53 (m, 1H, CH-32); 1.82 (t, 1H, CH-9); 2.03 (ddd, 1H, CH-19); 2.26 (t, 2H, CH_2 -36); 2.38 (t, 2H, CH_2 -32); 4.26 (dd, 2H, CH_2 -28); 4.44 (dd, 1H, CH-3); 4.57 (s, 1H, CH-29b); 4.67 (s, 1H, CH-29a). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 16.05 (C-25); 16.07 (C-26); 16.59 (C-27); 19.12 (C-33, C-34, C-37 and C-38); 19.25 (C-6); 20.82 (C-11 and C-30); 23.68 (C-23 and C-24); 25.18 (C-2); 26.95 (C-12); 27.96 (C-15); 29.61 (C-21); 29.82 (C-16); 34.12 (C-22); 34.26 (C-36); 34.49 (C-32); 34.57 (C-7); 37.10 (C-10); 37.57 (C-13); 37.97 (C-1 and C-4); 38.36 (C-8); 40.91 (C-14); 42.73 (C-18); 46.57 (C-17); 48.83 (C-19); 50.29 (C-9); 55.39 (C-5); 62.42 (C-28); 80.35 (C-3); 109.88 (C-29); 150.19 (C-20); 176.82 (C-35); 177.52 (C-31). HRMS (ESI-MS, m/z); $[\text{M}+\text{H}+\text{K}]^+$ calcd. for $\text{C}_{38}\text{H}_{61}\text{O}_4\text{K}$: 619.4124. Found: 619.3745, mp: 110–112°C.

3,28-Di-O-trifluoroacetylbetulín (1e)

The compound **1e** was prepared by using trifluoroacetic anhydride. White powder, yield = 80%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 0.83 (t, 2H, CH₂-16); 0.99 (m, 1H, CH-13); 1.06 (s, 15H, CH₃-23, CH₃-24, CH₃-25, CH₃-26 and CH₃-27); 1.08 (t, 1H, CH-18); 1.15 (t, 2H, CH₂-1); 1.30 (m, 2H, CH₂-12); 1.33 (t, 2H, CH₂-15); 1.42 (m, 2H, CH₂-21); 1.43 (t, 4H, CH₂-11 and CH₂-22); 1.45 (t, 2H, CH₂-6); 1.62 (t, 1H, CH-5); 1.64 (t, 2H, CH₂-7); 1.78 (br s, 3H, CH₃-30); 1.80 (m, 2H, CH₂-2); 1.84 (t, 1H, CH-9); 1.99 (ddd, 1H, CH-19); 4.15 (dd, 2H, CH₂-28); 4.58 (dd, 1H, CH-3); 4.62 (s, 1H, CH-29b); 4.71 (s, 1H, CH-29a). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 15.98 (C-26); 16.14 (C-27); 16.24 (C-25); 18.07 (C-6 and C-30); 19.08 (C-11); 20.77 (C-23 and C-24); 23.25 (C-2); 25.04 (C-12); 26.92 (C-15); 27.77 (C-21); 29.33 (C-16); 34.00 (C-22); 34.21 (C-7); 37.04 (C-10); 37.74 (C-13); 38.07 (C-4); 38.20 (C-1); 40.88 (C-8); 42.74 (C-14); 46.61 (C-18); 47.53 (C-17); 48.76 (C-19); 50.19 (C-9); 55.23 (C-5); 66.84 (C-28); 86.23 (C-3); 110.30 (C-29); 116.05 (C-32); 116.11 (C-34) 149.50 (C-20); 157.74 (C-31); 158.16 (C-33). HRMS (ESI-MS, *m/z*): [M-H+3OH]⁺ calcd. for C₃₄H₅₀F₆O₇: 683.3383. Found: 683.3650, mp: 175–176°C.

3,28-Di-O-dichloroacetylbetulín (1f)

The compound **1f** was prepared by using chloroacetic anhydride. White powder, yield = 85%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 0.99 (s, 15H, CH₃-23, CH₃-24, CH₃-25, CH₃-26 and CH₃-27); 1.06 (m, 3H, CH-13 and CH₂-16); 1.06 (t, 1H, CH-18); 1.13 (t, 2H, CH₂-1); 1.26 (m, 2H, CH₂-21); 1.30 (t, 2H, CH₂-15); 1.34 (m, 2H, CH₂-11); 1.42 (t, 2H, CH₂-7); 1.45 (m, 4H, CH₂-2 and CH₂-12); 1.51 (t, 2H, CH₂-6); 1.64 (t, 1H, CH-5); 1.74 (t, 2H, CH₂-22); 1.79 (br s, 3H, CH₃-30); 1.81 (t, 1H, CH-9); 2.00 (ddd, 1H, CH-19); 4.07 (dd, 2H, CH₂-28); 4.48 (dd, 1H, CH-3); 4.61 (s, 1H, CH-29b); 4.70 (s, 1H, CH-29a); 5.92 (s, 1H, CH-34); 5.96 (s, 1H, CH-32). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 15.96 (C-25); 16.11 (C-26); 16.32 (C-27); 18.01 (C-6); 19.08 (C-30); 20.74 (C-11); 23.19 (C-23 and C-24); 25.06 (C-2); 26.95 (C-12); 27.80 (C-15); 29.41 (C-21); 29.48 (C-16); 33.98 (C-7 and C-22); 34.29 (C-10); 37.01 (C-13); 37.66 (C-4); 38.21 (C-1); 40.84 (C-8); 42.70 (C-14); 46.75 (C-18); 47.66 (C-17); 48.80 (C-19); 50.17 (C-9); 55.28 (C-5); 64.43 (C-34); 64.78 (C-32); 66.16 (C-28); 80.90 (C-3); 109.08 (C-29); 149.70 (C-20); 164.30 (C-31); 164.96 (C-33). HRMS (ESI-MS, *m/z*): [M-H+Na]⁺ calcd. for C₃₄H₅₀Cl₄O₄Na: 683.2198. Found: 683.3828, mp: 166–170°C.

4.2 | Antiviral activity and cytotoxicity assay**4.2.1 | Cell lines and virus**

Human adenocarcinomic alveolar epithelial cells (A549) and Vero cells were cultured in DMEM low glucose (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Cultilab, Campinas, SP, Brazil). RSV A2 strain was kindly provided by Dr. Fernando Polack, Fundación Infant, Argentina. The virus was grown on Vero cells in Opti-MEM medium (Gibco™, Thermo Fisher Scientific) supplemented with 2% of FBS and was then purified from cell culture supernatant. Viral plaque-forming units (PFU) were identified using

an anti-hRSV antibody (Millipore, Billerica, MA, USA). Viral aliquots were stored in –80°C.

4.2.2 | Cytotoxicity assay

A549 cells were seeded in a 96-well flat-bottom plate at 5×10^3 cells per well. After 24 h incubation, each compound at 100, 50, 25, 12.5, and 6.25 μM was added to the plates which were then incubated for a further 96 h at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂. Cell viability was assessed by a colorimetric assay based on the reduction of 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Molecular Probes™, Thermo Fisher Scientific) by mitochondrial enzymes. Briefly, 100 μL of medium was removed and 40 μL of MTT reagent from a 5 mg/mL stock solution was added in each well. Cells were incubated for 4 h and the precipitated formazan crystals were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). Finally, the optic density (OD) was analyzed at 570/620 nm using micro-plate reader (EZ Read 400, Biochrom). DMSO was added as a control in the same volume used to dilute the compounds. The results were obtained from triplicate assays. The percentage of cytotoxicity of each compound was calculated considering 100% the OD of untreated cells and using as reference the OD of cells treated with DMSO.

4.2.3 | Antiviral assay

To assess the effect of the compound in inhibiting the cell death caused by the virus, A549 cells were seeded in 96-well flat-bottom plate (5×10^3 per well) and after 24 h infected with 5×10^4 PFU of RSV. After 2 h each compound at 100, 50, 25, 12.5, and 6.25 μM was added to the plates which were then incubated for a further 96 h at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂. Cell viability was assessed by MTT colorimetric assay as described above. Ribavirin was used as positive control (TCI America) at 2.4, 1.2, 0.6, 0.3, 0.15 μg per well. The results were obtained from triplicate assays. The percent protection of each compound was calculated as $[(A - B)/C - B] \times 100$, where A, B, and C are the OD values of treated infected, untreated infected, and untreated uninfected cells, respectively.

4.2.4 | Data analysis

The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) and the 50% antiviral effective concentration (EC₅₀) for each compound were obtained from dose-effect curves and determined by linear regression analysis (not shown). The therapeutic index (TI) (i.e., selective index) is defined as CC₅₀/EC₅₀.

4.2.5 | Viral load quantification by real-time PCR

Total RNA was extracted from cells infected with RSV or infected and treated with **1a** (12.5 and 50 μM) or ribavirin (0.3 and 1.2 μg). Complementary DNA (cDNA) was synthesized using transcriptase kit GoScrip™ (Promega™, Madison, WI, USA). Real-time PCR was performed for the amplification of the RSV F protein gene using

specific primers and probes: forward-5'-AACAGATGAAGCAGCT CCGTTATC-3', reverse-5'-GATTTTATTGGATGCTGTACATTT-3', and probe 5'-FAM/TGCCATAGCATGACACAATGGCTCCT-TAMR A/-3' and for amplification of human β -actin as endogenous control gene using TaqMan assay (Hs00174103_m1 ACTB). The reaction was performed in a StepOne[®] (Applied Biosystems[®]) under the following conditions: 50°C for 2 min and 95°C for 10 min followed by for 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. The Delta cycle-threshold (Δ Ct) was obtained by subtracting the endogenous control gene Ct value from the Ct value of the RSV protein F gene.^[29]

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants and financial support from Brazilian Agencies CNPq and CAPES. The authors are also grateful to the Graduate Programme in Pharmaceutical Sciences (PPGCF/UFRGS). GNSS received CAPES Fellowship.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared no conflict of interest.

ORCID

Gloria N. Santos da Silva  <http://orcid.org/0000-0002-6584-201X>

REFERENCES

- [1] S. Bhatt, P. W. Gething, O. L. Brady, J. P. Messina, A. W. Farlow, C. L. Moyes, J. M. Drake, J. S. Brownstein, A. G. Hoen, O. Sankoh, M. F. Myers, D. B. George, T. Jaenisch, G. R. Wint, C. P. Simmons, T. W. Scott, J. J. Farrar, S. I. Hay, *Nature* **2013**, *496*, 504.
- [2] M. Dupont-Rouzeyrol, O. O'Connor, E. Calvez, M. Dares, M. John, J. P. Grangeon, A. C. Gourinat, *Emerg. Infect Dis.* **2015**, *21*, 381.
- [3] N. J. Beeching, M. Fenech, C. F. Houlihan, *BMJ* **2014**, *349*, g7348.
- [4] H. Belani, T. Chorba, F. Fletcher, K. Hennessey, K. Kroeger, A. Lansky, J. Leichter, D. Lentine, S. Mital, R. Needle, K. O'Connor, J. Oeltmann, E. Pevzner, D. Purcell, M. Sabin, S. Semaan, U. Sharapov, B. Smith, T. Vogt, B. A. Wynn, *Recomm. Rep.* **2012**, *61*, 1–40.
- [5] B. G. van den Hoogen, J. C. de Jong, J. Groen, T. Kuiken, R. de Groot, R. A. Fouchier, A. D. Osterhaus, *Nat. Med.* **2001**, *7*, 719.
- [6] J. F. Hruska, P. E. Morrow, S. C. Suffin, R. G. Douglas, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1982**, *21*, 125.
- [7] J. Treanor, A. Falsey, *Antiviral Res.* **1999**, *44*, 79.
- [8] R. C. Welliver, *Pediatr. Infect Dis. J.* **2003**, *22*, S6; discussion S10–12.
- [9] W. W. Thompson, D. K. Shay, E. Weintraub, L. Brammer, N. Cox, L. J. Anderson, K. Fukuda, *JAMA* **2003**, *289*, 179.
- [10] J. Groothuis, J. Bauman, F. Malinoski, M. Eggleston, *J. Perinatol.* **2008**, *28*, 319.
- [11] A. J. Easton, J. B. Domachowske, H. F. Rosenberg, *Clin. Microbiol. Rev.* **2004**, *17*, 390.
- [12] C. Griffiths, S. J. Drews, D. J. Marchant, *Clin. Microbiol. Rev.* **2017**, *30*, 277.
- [13] American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases, American Academy of Pediatrics Bronchiolitis Guidelines, *Pediatrics* **2014**, *134*, 415.
- [14] T. Poynard, P. Marcellin, S. S. Lee, C. Niederau, G. S. Minuk, G. Ideo, V. Bain, J. Heathcote, S. Zeuzem, C. Trepo, J. Albrecht, *Lancet* **1998**, *352*, 1426.
- [15] E. A. F. Simoes, L. Bont, P. Manzoni, B. Fauroux, B. Paes, J. Figueras-Aloy, P. A. Checchia, X. Carbonell-Estrany, *Infect. Dis. Ther.* **2018**, *7*, 87.
- [16] J. P. DeVincenzo, R. J. Whitley, R. L. Mackman, C. Scaglioni-Weinlich, L. Harrison, E. Farrell, S. McBride, R. Lambkin-Williams, R. Jordan, Y. Xin, S. Ramanathan, T. O'Riordan, S. A. Lewis, X. Li, S. L. Toback, S. L. Lin, J. W. Chien, *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 711.
- [17] Z. Liu, N. Ma, Y. Zhong, Z. Q. Yang, *Med. Sci.* **2015**, *35*, 916.
- [18] A. Ouahrouch, M. Taourirte, D. Schols, R. Snoeck, G. Andrei, J. W. Engels, H. B. Lazrek, *Arch. Pharm.* **2016**, *349*, 30.
- [19] E. A. F. Simoes, J. P. DeVincenzo, M. Boeckh, L. Bont, J. E. Crowe, P. Griffiths, F. G. Hayden, R. L. Hodinka, R. L. Smyth, K. Spencer, S. Thirstrup, E. E. Walsh, R. J. Whitley, *J. Infect. Dis.* **2015**, *211*, S1.
- [20] S. Alakurtti, T. Makela, S. Koskimies, J. Yli-Kauhaluoma, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *29*, 1.
- [21] P. Yogeewari, D. Sriram, *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 657.
- [22] J. Tang, S. A. Jones, J. L. Jeffrey, S. R. Miranda, C. M. Galardi, D. M. Irlbeck, K. W. Brown, C. B. McDanal, B. A. Johns, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 2689.
- [23] L. Wozniak, S. Skapska, K. Marszalek, *Molecules* **2015**, *20*, 20614.
- [24] S. T. Carginin, S. C. B. Gnoatto, *Food Chem.* **2017**, *220*, 477.
- [25] A. M. Innocente, G. N. S. Silva, L. N. Cruz, M. S. Moraes, M. Nakabashi, P. Sonnet, G. Gosmann, C. R. S. Garcia, S. C. B. Gnoatto, *Molecules* **2012**, *17*, 12003.
- [26] G. N. S. Silva, N. R. Maria, D. C. Schuck, L. N. Cruz, M. S. de Moraes, M. Nakabashi, C. Graebin, G. Gosmann, C. R. S. Garcia, S. C. B. Gnoatto, *Malar. J.* **2013**, *12*, 89.
- [27] S. Q. Tian, K. Lü, G. Z. Fang, S. Y. Han, Q. Ai, *Chem. Ind. Forest Prod.* **2007**, *27*, 77.
- [28] Y. Li, R. Jiang, L. S. Ooi, P. P. But, V. E. Ooi, *Phytother. Res.* **2007**, *21*, 466.
- [29] T. D. Schmittgen, K. J. Livak, *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1101.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Santos da Silva GN, Monti Atik D, Antunes Fernandes JL, et al. Synthesis of three triterpene series and their activity against respiratory syncytial virus. *Arch Pharm Chem Life Sci.* 2018;1–7.
<https://doi.org/10.1002/ardp.201800108>