

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2003.10.14	(73) Titular(es): SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.P.A. VIALE SHAKESPEARE, 47 00141 ROMA	IT
(30) Prioridade(s): 2002.11.06 IT RM20020562		
(43) Data de publicação do pedido: 2005.08.31	(72) Inventor(es): ENRICO GARACI ANNA T. PALAMARA	IT IT
(45) Data e BPI da concessão: 2007.12.26 035/2008	(74) Mandatário: JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **UTILIZAÇÃO DE RESVERATROL PARA A PREPARAÇÃO DE UM MEDICAMENTO ÚTIL PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR VÍRUS DA INFLUENZA**

(57) Resumo:

RESUMO

"UTILIZAÇÃO DE RESVERATROL PARA A PREPARAÇÃO DE UM
MEDICAMENTO ÚTIL PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR VÍRUS
DA INFLUENZA"

Descreve-se a utilização de resveratrol para a preparação de um medicamento para o tratamento da gripe. O referido medicamento exerce a sua actividade terapêutica através da inibição da replicação viral.

DESCRIÇÃO

"UTILIZAÇÃO DE RESVERATROL PARA A PREPARAÇÃO DE UM MEDICAMENTO ÚTIL PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR VÍRUS DA INFLUENZA"

A invenção descrita na presente memória descritiva diz respeito à utilização de resveratrol como um componente activo na preparação de um medicamento que exerce uma acção inibidora sobre a replicação do vírus da gripe e útil para o tratamento de infecções provocadas pelo vírus da influenza.

Antecedentes da invenção

O resveratrol, isto é, o 3,4,5-tri-hidroxi-estilbeno, foi estudado recentemente de maneira intensiva no que toca às propriedades benéficas conhecidas do vinho tinto, do qual constitui um dos componentes fundamentais (*Life Sci.*, 71, 2145-52, 2002).

O resveratrol encontra-se localizado nas peles das uvas pretas em quantidades compreendidas entre 50 e 100 µg/grama e a sua concentração no vinho tinto encontra-se compreendida entre 1,5 e 3 mg/l.

Numerosos estudos demonstraram uma actividade anticarcinogénica do resveratrol, cujos mecanismos de acção podem ser subdivididos como segue: inibição da activação do factor de transcrição NF-kB, susceptível de regular a expressão de diversos genes envolvidos nos processos inflamatórios e carcinogénicos (*Lancet*, 341, 1103-1104, 1993; *Science*, 275, 218-220, 1997; *Proc. Natl. Acad. Sc.*, 94, 14138-14143, 1997; *Life Science*, 61, 2103-2110, 1997;

Brit. J. Pharm., 126, 673-680, 1999; *J. Imm.*, 164, 6509-6519, 2000); inibição de diversas proteínas, incluindo a proteína quinase C (*Bioch.*, 38, 13244-13251, 1999), ribonucleotido redutase (*FEBS Lett.*, 421, 277-279, 1998) e ciclo-oxigenase-2(COX-2) em células epiteliais mamárias (*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 889, 214-223, 1999; *Carcinog.*, 21, 959-963, 2000); activação de caspases 2, 3, 6 e 9 (*FASEB J.*, 1613-1615, 2000) e modulação do gene p53, o qual é um supressor de tumor conhecido (*Cancer Research*, 59, 5892-5895, 1999; *Clin. Bioch.*, 34, 415-420, 2001).

De entre as acções benéficas do resveratrol deve fazer-se igualmente menção à sua actividade antioxidante, sugerida pela capacidade mencionada anteriormente de contra-atacar os efeitos prejudiciais produzidos pelas diversas substâncias e/ou condições que provocam um stress intracelular oxidativo (*Free Radic. Res.*, 33, 105-114, 2000).

O resveratrol pode induzir a relaxação vascular por meio da produção de óxido nítrico ao nível endotelial vascular (*Cancer Res.*, 59, 2596-01, 1999), inibir a síntese de tromboxano em plaquetas (*Clin. Chin. Acta*, 235, 207-219, 1995; *Int. J. Tissue React.*, 17, 1-3, 1995) e de leucotrienos em neutrófilos e prevenir a oxidação e a agregação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (*Lancet*, 341, 1103-1104, 1993; *Life Sci.*, 64, 2511-2521, 1999).

Recentemente, demonstrou-se uma actividade inibidora do resveratrol contra vírus de Herpes Simplex de ADN (*Antiv. Res.*, 43, 145-155, 1999) com base em sistemas experimentais *in-vitro*.

Os resultados obtidos pelos presentes autores e por outras equipas de investigadores revelaram que muitas substâncias antioxidantes são susceptíveis de inibir a replicação do vírus Sendai da parainfluenza (SV) tipo 1, do vírus de Herpes Simplex 1 (HSV-1) e do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) *in vitro* (*AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1997: 1537-1541; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992; 188, 1090-1096; *Antivir. Res.*, 1995, 27, 237-253). Em um modelo de SIDA murina (SIDAM) demonstrou-se a actividade antiviral das substâncias antioxidantes, bem como na queratite por HSV1 (*AIDS Res. HUM. Retroviruses*, 1996: 12, 1373-1381; *Exp. Eye. Res.*, 200: 70, 215-220).

A gripe é um problema epidemiológico de proporções mundiais de que resultam problemas graves para a saúde pública e repercussões grandes sob o ponto de vista económico nos cuidados de saúde. O vírus responsável pela influenza encontra-se muito espalhado e é altamente infeccioso. Infelizmente, as terapias correntemente disponíveis não são ainda completamente eficazes e conduzem, com frequência, à escolha de estirpes virais resistentes (*Fields, cap47, 1533-79, 2001*) e, ainda mais, as campanhas de vacinação, além das desvantagens inerentes à prevenção com base em vacinas, não proporcionam ainda uma cobertura satisfatória devido à extrema variabilidade antigénica do vírus (*Fields, cap47, 1533-79, 2001*).

De entre as diversas estratégias para o ataque da replicação viral, estudos recentes (*J. of Virol.*, 74, 1781-1786, 2000) referiram o papel importante da proteína M1 no transporte de ribonucleoproteínas específicas do vírus para o citoplasma. Isto parece constituir um estágio fundamental no ciclo da replicação do vírus, de tal modo que a inibição da replicação viral pode ser alcançada através da retenção

da nucleoproteína no núcleo da célula infectada devido à síntese inibida da proteína M. Este fenómeno pode ser atribuível à inibição das proteínas celulares com uma função quinase. De facto, demonstrou-se recentemente que a inibição das quinases provoca a retenção do NP nos núcleos das células (*Nature Cell. Biol.* 3, 301-5, 2001; *J. off Virol.*, 74, 1731-86, 2000), conjuntamente com uma acção inibidora potente contra a replicação do vírus da gripe.

Sabe-se que GSH constitui o antioxidante principal no sistema redox celular e tem sido associado com a replicação de diversos vírus. De facto, estudos anteriores conduzidos pelos presentes inventores, demonstraram que durante a infecção viral é possível observar uma redução dos níveis de GSH como uma consequência da infecção propriamente dita (Rotilio et al., "Oxidative stress on cell activation in viral infection", 143-53, 1993; Palamara et al., *Antiviral Research*, 27, 237-53, 1995).

A regulação aberrante do mecanismo conhecido de apoptose constitui o factor subjacente responsável por numerosas doenças humanas, tais como um número de doenças auto-imunes, infecciosas ou neurológicas, tais como SIDA e cancro.

Em estudos anteriores, descreveu-se que o resveratrol permite a eliminação das células de tumor através da indução da apoptose das células. Recentemente, estudos conduzidos por Tinhofer I. et al. (*FASEB J.*, 18, 1613-15, 2001) revelaram que os primeiros casos de apoptose induzida pelo resveratrol são caracterizados pela alteração do potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Phi_m$), pela libertação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e pela activação de caspases 2, 3, 6 e 9. Sabe-se igualmente que o vírus da gripe induz a apoptose em várias percentagens, de acordo com a estirpe viral e a multiplicidade da infecção.

Sumário da invenção

Verificou-se agora que o resveratrol exerce uma acção inibidora sobre a replicação do vírus da gripe. De uma maneira completamente surpreendente, verificou-se que o resveratrol exerce a sua acção inibidora sobre replicação do vírus da gripe não através da sua actividade antioxidante esperada, mas através de um mecanismo específico de inibição da proteína quinase C, uma enzima celular que desempenha um papel principal no processo de replicação do vírus da gripe. A vantagem principal proporcionada pela utilização do resveratrol consistiria, por consequência, na sua capacidade para atacar o vírus indirectamente, isto é, mediante interferência com uma estrutura celular funcional do vírus, em vez de com a partícula viral propriamente dita. Este tipo de abordagem pode, por consequência, conduzir à inibição do vírus, evitando a ocorrência do fenómeno de resistência aos fármacos antivirais mais comuns.

Por consequência, um objecto da presente invenção é a utilização de resveratrol para a preparação de um medicamento útil para a prevenção e/ou o tratamento de infecções provocadas pelo vírus da gripe. De acordo com uma aplicação preferida da presente invenção, utiliza-se o resveratrol contra o vírus da gripe em seres humanos. De acordo com uma aplicação mais lata da invenção, os seus objectivos podem incluir igualmente a utilização de resveratrol para a preparação de um medicamento útil para o tratamento de infecções provocadas pelo vírus da gripe no domínio veterinário.

A presente invenção será agora ilustrada em pormenor, também com o recurso aos exemplos e às figuras, em que:

A figura 1 ilustra o efeito do resveratrol sobre a replicação do vírus da gripe PR8 em células MDCK e, para ser preciso, na figura 1A, no caso da administração post-infecção, na figura 1B no caso da administração pré-infecção, e na figura 1C no caso da administração pré- e post-infecção;

A figura 2 ilustra o efeito do resveratrol sobre monocamadas confluentes de células MDCK não infectadas e, para se ser preciso, o número de células viáveis;

A figura 3 ilustra a caracterização da actividade antiviral do resveratrol, e, para ser preciso, na figura 3A o tratamento durante a adsorção viral e na figura 3B o efeito sobre as partículas virais;

A figura 4 ilustra a caracterização da actividade antiviral do resveratrol, e, para ser preciso, na figura 4A no caso da administração imediatamente após a infecção e a remoção em instantes de tempo diferentes, e, na figura 4B, no caso da adição em instantes de tempo diferentes em relação com a infecção;

A figura 5 ilustra a apoptose em células MDCK tratadas com resveratrol (diamantes: não infectadas, quadrados: infectadas);

A figura 6 ilustra a correlação entre o efeito antiviral do resveratrol e o estado redox intracelular;

A figura 7 ilustra o efeito do resveratrol sobre a síntese de proteínas virais do vírus PR8 da gripe;

A figura 8 ilustra o resultado de PCR para ARNm de proteínas virais tardias;

A figura 9 ilustra o efeito do resveratrol *in vivo* após a infecção com o vírus PR8 da gripe.

Descrição pormenorizada da invenção

Com a finalidade de ilustrar a eficácia da presente invenção, conduziram-se estudos *in vitro* utilizando o vírus da gripe A/PR8/34, subtipo H1N1 (no seguimento referido abreviadamente como vírus PR8). Utilizou-se esta estirpe puramente a título de exemplo, devendo entender-se que a presente invenção é aplicável ao vírus da gripe no sentido geral do termo.

Materiais e Métodos

O resveratrol é um produto que se encontra vulgarmente disponível no comércio ou o qual pode ser obtido utilizando processos conhecidos descritos na literatura. Utilizou-se a substância dissolvida em DMSO (80 mg/ml). As concentrações utilizadas para as experiências foram obtidas por meio de diluições sucessivas em RPMI 1640. Trataram-se todas as amostras testemunhas com DMSO para as mesmas doses utilizadas para dissolver o resveratrol. Para estas concentrações o DMSO não produziu quaisquer efeitos tóxicos sobre as células.

Culturas de celulares

Para o estudo da replicação do vírus da gripe utilizaram-se células MDCK (células epiteliais de rim de cão). Cultivaram-se as células em frascos T-25 ou em placas Libno com 6 e 24 cavidades em meio de cultura RPMI a que se adicionou L-glutamina, penicilina-estreptomicina e soro fetal de vitela a 10% (FCS) e manteve-se à temperatura de

37 °C numa atmosfera de CO₂ a 5%. Destacaram-se as monocamadas das células confluentes com uma solução de tripsina a 0,25%, centrifugaram-se e voltaram a semear-se em meio fresco. Realizou-se a contagem das células utilizando um hemocitómetro e determinou-se a viabilidade das células por meio de exclusão com corante de viabilidade de Azul de Tripano (0,02%).

Produção do vírus

Produziu-se o vírus por meio da inoculação de uma suspensão viral diluída apropriadamente na cavidade alantóide de ovos de frango embrionados com 10 dias. Após a incubação dos ovos à temperatura de 37°C durante 72 horas, clarificou-se o fluido alantóide que contém as partículas virais recentemente formadas mediante centrifugação à temperatura de +4 °C e guardaram-se à temperatura de -80 °C.

Titulação do vírus

Realizou-se a titulação do vírus utilizando a técnica de hemoaglutinina a qual se baseia na capacidade, peculiar deste vírus, para aglutinar células sanguíneas.

Titulou-se o vírus não diluído do fluido alantóide mediante diluição escalar com soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS) em placas com 96 cavidades, a que se adicionou mais tarde uma suspensão a 0,5% de células de sangue humano do grupo O Rh+. Deixaram-se então as placas à temperatura ambiente durante um intervalo de tempo suficiente para que a reacção de hemoaglutinação tivesse lugar. O título viral da amostra, expressa em unidades de hemoaglutinação (HAU), foi representado pela última

diluição que dá origem à hemoaglutinação completa. Avaliou-se a libertação do vírus na parte das células infectadas com o mesmo processo sobre os sobrenadantes das amostras infectadas que foram retiradas 24 e 48 horas após a infecção.

Infecção viral

Lavaram-se as monocamadas confluentes de células MDCK com PBS e infectaram-se com o vírus (multiplicidade de infecção igual a 0,2 [m.o.i.]). Em particular, diluiu-se apropriadamente o vírus em RPMI sem FCS e adicionou-se à célula no volume mínimo. Decorrida 1 hora de incubação à temperatura de 37 °C (período de adsorção do vírus), removeu-se o inóculo e mantiveram-se as monocamadas, após lavagem com PBS para eliminar o excesso de vírus não adsorvidos, em meio fresco que contém FCS a 2%. Adicionou-se resveratrol para diversas concentrações (1, 5, 10, 15, 20 e 40 µg/ml), de acordo com as seguintes escalas de tratamento: a) 24 horas antes da infecção (pre-); b) imediatamente após a adsorção do vírus pelas células de infecção (post-); e c) 24 horas antes e imediatamente após a adsorção do vírus pelas células de infecção (pre-post). Em todos os casos, deixou-se incubar a substância durante o tempo total da experiência. 24 e 48 horas após a infecção, titulou-se o vírus libertado no sobrenadante mediante avaliação das unidades de hemoaglutinação. Conforme se ilustra na Figura 1, o resveratrol adicionado post-infecção inibiu a replicação viral de uma maneira dose-dependente. Para a concentração de 20 µg/ml, o título viral foi reduzido de 87% quando comparado com as testemunhas infectadas e não tratadas, sem quaisquer efeitos tóxicos sobre as células não infectadas que estão a ser detectadas. Para as finalidades a determinar o grau possível de

toxicidade nas células MDCK, trataram-se estas últimas com resveratrol após a confluência da monocamada, para diversas concentrações (5, 10, 15, 20 e 40 µg/ml). Os resultados obtidos demonstram que para as doses que provocaram uma inibição significativa do vírus da gripe (10-20 µg/ml), se observou uma redução ligeira do número de células, provavelmente devida a um abrandamento da proliferação celular (Figura 2A). Para estas doses, no entanto, não se observaram quaisquer alterações morfológicas das células. Para a concentração de 40 µg/ml, para a qual a replicação viral foi completamente bloqueada, no entanto, observaram-se efeitos tóxicos com o aumento da mortalidade celular (Figura 2B). Com base neste resultado, nas experiências seguintes utilizou-se a dose de 20 µg/ml, a qual produziu uma actividade antiviral máxima sem efeitos secundários.

Caracterização da actividade antiviral

Com o objectivo de identificar as fases do ciclo de replicação viral controlado pelo resveratrol, adicionou-se a substância de acordo com diferentes escalas de tratamento em relação com diversas fases do ciclo de vida do vírus. Na primeira fase, para as finalidades de determinar se o resveratrol interfere com a entrada do vírus nas células, adicionou-se a substância para uma concentração de 20 µg/ml exclusivamente durante a fase de adsorção viral (durante uma hora à temperatura de 37 °C) e removeu-se em seguida. A medição da replicação viral decorridas 24 horas provou ser comparável com a replicação obtida nas células testemunhas, demonstrando deste modo que a entrada do vírus não era inibida pelo fármaco (Figura 3). Além disso, para determinar se o resveratrol era capaz de inactivar directamente o vírus, incubou-se este último com a

substância para uma concentração de 40 µg/ml durante uma hora à temperatura de 37 °C. Mais tarde, diluiu-se o vírus assim tratado até 1:500 e utilizou-se para infectar as células. Nestas condições, não se observou qualquer redução na replicação viral. Estes resultados sugerem que o resveratrol não inactiva de maneira directa a partícula viral. Numa segunda fase, infectaram-se as células e trataram-se com resveratrol, utilizando mais uma vez a mesma concentração (20 µg/ml), mas adicionou-se a substância em diversos instantes após a infecção (0, 3, 6 e 9 h). A replicação viral, determinada como HAU/ml 24 h após a infecção, revelou que esta era significativamente inibida apenas se se tivesse adicionado resveratrol durante as 3 horas da infecção (Figura 4B). Pelo contrário, se se remover o resveratrol, adicionado imediatamente após a infecção, em diversos instantes (0, 3, 6, 9 e 24 h), observou-se a inibição de replicação apenas se o tratamento durasse pelo menos 9 horas. Além disso, os resultados apresentados na Figura 4 mostram igualmente que a actividade antiviral, uma vez obtida, não era reversível quando se interrompia o tratamento.

Determinou-se igualmente a replicação viral com análises da ocorrência de antigénios virais sobre a superfície da célula infectada por meio de imunofluorescência. Realizou-se a análise das proteínas virais mediante imunofluorescência com um microscópio de fluorescência utilizando um filtro que emite no verde (FITC) (lentes 100x). Infectaram-se células MDCK, cultivadas em células de cobertura durante 24 horas e, 18 horas após a infecção, fixaram-se com metanol-acetona a 1:1 à temperatura de 4 °C durante 15 minutos. Mais tarde, lavaram-se as células duas vezes em PBS e permeabilizaram-se com uma solução a 0,1% de PBS-TRITON durante 5 minutos.

Realizou-se o bloqueamento dos sítios não específicos com leite a 1% dissolvido em PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente. Mais tarde, adicionaram-se anticorpos monoclonais específicos (murganho anti-gripe NP e murganho anti-gripe M) às proteínas virais, diluídas 1:50 em PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente. Detectou-se o anticorpo primário com um anticorpo secundário conjugado para a fluoresceína (FITC anti-murganho, Sigma).

Análises da síntese de proteínas virais e correlação com a actividade antiviral do resveratrol

Analísaram-se proteínas virais pelo método das manchas de Western. Para diferentes instantes após a infecção viral, submeteram-se as células a lise utilizando tampões de lise especiais. Carregaram-se então quantidades iguais de proteína sobre o gel de poliacrilamida em SDS. Após electroforese, transferiram-se as proteínas para sobre uma membrana de nitrocelulose e trataram-se com o anticorpo policlonal anti-gripe. Após incubação e lavagens apropriadas, trataram-se os filtros com um segundo conjugado de anticorpo para a peroxidase e iluminaram-se as proteínas virais por meio da técnica de quimioluminescência (ECL), utilizando um substrato de peroxidase (luminol) o qual, ao reagir com a enzima, emite uma luz e promove uma impressão sobre a placa auto-radiografia. Trataram-se as células com resveratrol para diversas concentrações (5, 10, 15 e 20 µg/ml). Para permitir uma melhor formação de imagem das proteínas virais, realizou-se a experiência de electroforese utilizando um gel de poliacrilamida a 10% (Figura 7A) e um gel gradiente (Figura 7B). O resveratrol, para concentrações de 15 e 20 µg/ml, inibiu quase completamente a síntese da hemoaglutinina no vírus de gripe tardia (H0-H1, H2) e as proteínas de matriz (M). Pelo

contrário, inibiu-se a expressão das proteínas de nucleocapside precoce (nucleoproteína [NP] e proteína de polimerase [P]), muito embora num menor grau do que o das proteínas tardias.

Análise da síntese dos ARNs mensageiros

Com o objectivo de identificar o mecanismo de inibição das proteínas virais, analisaram-se células MDCK, infectadas e tratadas com resveratrol para as diferentes concentrações descritas anteriormente, por meio da técnica PCR descrita por Tobita et al. (J. General Virol., 78, 563-566, 1997). Homogeneizaram-se células MDCK infectadas com o vírus e/ou tratadas com resveratrol com o reagente GIBCO BRL TRIZOL. Após incubação à temperatura ambiente durante 5 minutos, adicionou-se clorofórmio (0,2 ml por amostra) e incubaram-se as amostras a uma temperatura compreendida entre 15 e 30 °C durante 3 minutos. Em seguida, centrifugaram-se a 10 000 rpm durante 15 minutos à temperatura de +4°C e isolou-se a fase aquosa que contém o ARN. Adicionou-se 0,5 ml de isopropanolol e incubaram-se as amostras a uma temperatura compreendida entre 15 e 30 °C durante 10 minutos após o que se centrifugaram. Removeram-se os sobrenadantes obtidos e tratou-se o precipitado ARN com etanol a 75% a 8 000 rpm durante 5 minutos a uma temperatura compreendida entre 2 e 8 °C. Por último, secou-se o precipitado ao ar e dissolveu-se em 20 µg de água-DEPC (pirocarbonato de dietilo).

Transcreveu-se o ARN obtido utilizando transcriptase inversa. Realizou-se a retrotranscrição sobre 5 µg de ARN de cada amostra numa mistura que consiste em iniciadores aleatórios, os quatro desoxinucleotidos (dNTP=dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ditiotreitól (DTT) e o tampão RT (Life

Technologies). Realizou-se a síntese do ADN complementar (ADNc) deixando a mistura durante 10 minutos a uma temperatura de 22 °C, em seguida durante 60 minutos à temperatura de 42 °C e finalmente inactivou-se a reacção durante 10 minutos à temperatura de 75 °C. Utilizou-se então o ADNc assim obtido em PCR.

Utilizou-se a polimerase Taq em PCR. Conduziu-se PCR nas suas três fases de desnaturação, recozimento e elongação para as temperaturas respectivas de 95, 48 e 72 °C. Repetiu-se o ciclo 20 vezes. Os oligonucleotidos utilizados para a amplificação do ARN viral foram: para o gene viral que codifica para a proteína hemoaglutinina (HA) iniciador 5': 5'-ACCAAAATGAAGGCAAACC-3', iniciador 3': 5'-TTACTGTTAGACGGGTGAT-3'; para o gene viral que codifica para a proteína da matriz (M) iniciador 5': 5'-ATGAGTCTTCTAACCG-3', iniciador 3': 5'-ACTGCTTTGTCCATGT-3'. Realizou-se a experiência do produto PCR em electroforese (100 volts) em um gel de agarose a 1% em um tampão em que se colocou brometo de etídio para mostrar o DNA com um transiluminador de UV.

Avaliaram-se as amostras obtidas a 4, 8 e 20 horas, respectivamente, após a infecção viral. Os ARNs mensageiros para as proteínas HA e M não foram observados às 4 horas quer na testemunha ou no grupo tratado com resveratrol. Os resultados mostram que a síntese dos ARNs 20 horas após a infecção não é afectada pelo tratamento com resveratrol. A observação às 4 horas mostra que o resveratrol promove apenas um atraso na síntese do mensageiro para estas proteínas (Figura 8). Estes resultados sugerem que o resveratrol para as doses de 20 µg/ml provocam um atraso na libertação dos ARNs mensageiros para as proteínas virais tardias (HA e M), avaliadas 8 horas após a infecção.

Localização da proteína NP

Considerando que a inibição da proteína quinase C nas células infectadas pelo vírus da gripe provocam uma redução substancial da expressão da proteína M, conjuntamente com a retenção da nucleoproteína dos núcleos da célula infectada (*J. Virol.*, 74, 1781-86, 2000), coraram-se células MDCK infectadas com o vírus PR8 e trataram-se ou não com resveratrol para a concentração de 20 µg/ml com anticorpos específicos anti-M e anti-NP e observaram-se ao microscópio de fluorescência. Os resultados revelaram que, muito embora nas células infectadas se observa-se NP tanto no núcleo como no citoplasma e M1 prevalentemente no citoplasma, nas células tratadas com resveratrol a NP é retida no núcleo e M, que é inibida significativamente, pode ser igualmente observada apenas no núcleo. Este fenómeno é susceptível de ser atribuível à inibição de proteínas celulares com uma função quinase. Os resultados sugerem então que o mecanismo de acção antiviral pode encontrar-se relacionado com a inibição de proteínas com uma função quinase descritas anteriormente (*FEBS Letters*, 45, 63-7, 1999).

Ensaio da glutathiona reduzida e oxidada

Realizou-se o ensaio da glutathiona como um resultado da formação de derivados de S-carboximetilo de tióis livres em ácido iodoacético seguida pela conversão dos grupos NH₂ terminais em derivados de 2,4-dinitrofenilo após a redução de 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno (*Anal. Biochem.*, 106, 55-62, 1980).

Destacaram-se as células MDCK por meio de uma técnica de raspagem. Mais tarde, centrifugaram-se as células a 1 200 rpm durante 5 minutos. Lavaram-se as células duas

vezes em PBS e voltou a suspender-se o precipitado, obtido após centrifugação, em 200 µg de tampão. Desproteinizaram-se os lisados celulares, obtidos com ciclos repetidos de congelação e descongelação, mediante precipitação em ácido metafosfórico a 5%. Após centrifugação a 22 300 g, derivatizaram-se os tióis de peso molecular reduzido presentes no sobrenadante com ácido iodoacético a 10% (v/v) e neutralizaram-se com NaHCO₃ em forma de pó. Decorrida 1 hora de incubação no escuro adicionou-se uma solução de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno a 1,5% (v/v) (1,5 ml/98,5 ml de etanol absoluto). Após adição de reagente de Sanger, incubaram-se as amostras durante 12 horas no escuro, e realizou-se a separação das diversas espécies de glutatona por meio de uma coluna µBondapal 3,9 x 300 mm de NH₂ HPLC (Millipore). Para medir o teor total de GSH fez-se referência a uma curva padrão obtida com GSH purificado. O teor de GSH é expresso em GSH mmol/mg de proteínas presentes na amostra de lisado. Calculou-se a concentração e proteína utilizando o método de Lowry (Biol. Chem., 193, 265-75, 1951). Este método explora a capacidade das proteínas para reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu numa solução alcalina com iões Cu²⁺, graças à presença dos grupos fenol num número de aminoácidos tais como triptofano, tirosina, cisteína e histidina. O triptofano e a tirosina reagem por meio dos seus grupos fenóis particularmente reactivos; a cisteína através do grupo -SH e a histidina com o anel do imidazol. Detectou-se o produto da reacção de redução pela formação de compostos corados pela reacção com os aminoácidos aromáticos das proteínas. De facto, a solução assume uma cor azul particularmente intensa que apresenta um pico de absorção a 695 nm. Com base nas proporções da absorção, obteve-se assim a concentração de proteínas relativamente à curva de

calibração de linha recta obtida utilizando diversas concentrações de albumina de soro bovino como padrão.

Com o objectivo de avaliar a correlação possível entre a actividade antiviral e a modulação do estado redox, determinou-se a concentração GSH celular de células MDCK, tratadas com diferentes concentrações de resveratrol e infectadas ou não com o vírus, mediante análise de HPLC 24 horas após a injeção. De maneira surpreendente, o resveratrol adicionado às células MDCK não infectadas produziu uma redução nos níveis de GSH intracelular em comparação com as células não tratadas (Figura 6). A adição de resveratrol às células infectadas, muito embora iniba a replicação viral, não restaura os níveis de GSH reduzidos pela infecção.

Análise da apoptose

No que diz respeito à análise de apoptose, infectaram-se células de MDCK com o vírus PR8. Após adsorção viral, trataram-se as células com resveratrol para as diversas concentrações (5, 10, 15 e 20 µg/ml). Vinte e quatro horas após a infecção, destacaram-se as células utilizando uma solução de tripsina a 0,25% e centrifugaram-se então a 1 200 rpm durante 5 minutos. Analisou-se o precipitado assim obtido por meio de uma técnica FACS após marcação com iodeto de propídio.

Com a finalidade de determinar se a indução da morte celular pela apoptose se encontrar envolvida no efeito antiviral do resveratrol, infectaram-se ou não células MDCK com o vírus e trataram-se com a substância para as diferentes concentrações. Avaliou-se a morte celular por apoptose por meio de FACS após marcação com iodeto de

propídio. Conforme se ilustra na Figura 5, o resveratrol provocou um certo grau de morte celular por apoptose em células não infectadas compreendido entre 8 e 32% de acordo com as doses (5 e 20 µg/ml, respectivamente). A infecção propriamente dita induziu a apoptose em 12% das células infectadas. Muito embora a adição de doses crescentes tivesse provocado um aumento da mortalidade, não se observou qualquer diferença significativa entre as células infectadas e as células não infectadas tratadas com doses antivirais do fármaco (35 e 37% de apoptose, respectivamente).

A título de confirmação ulterior dos resultados da presente invenção, e a títulos de exemplos, descrevem-se os seguintes estudos *in-vivo*.

Exemplo

Utilizaram-se murganhos fêmeas de procriação consanguínea com quatro semanas de idade Balb/c AnCrIBR. Administrou-se o resveratrol, dissolvido em PBS, aos animais através da via intraperitoneal em diversos instantes de tempo após a infecção com o vírus da gripe. Escolheram-se as concentrações de resveratrol de modo a obter-se uma gama de doses no sangue dos animais semelhante à gama eficaz *in vitro* (10 a 20 µg/ml).

Inocularam-se os murganhos por via intranasal (i.n.) com uma suspensão que contém o vírus da gripe A/PR para uma multiplicidade de infecção de 2 HAU/murganho, após anestesia suave com éter. Com base nos resultados experimentais anteriores, o vírus da gripe para esta multiplicidade de infecção produz pneumonia hemorrágica que conduz à morte de 80% dos animais durante uma semana após a

infecção. Com o objectivo de monitorizar a tendência da infecção, monitorizaram-se tanto os parâmetros virológicos como imunológicos além de se ter realizado o estudo das curvas de sobrevivência.

Como um parâmetro virológico, determinou-se a carga viral. Para diferentes instantes após a infecção, retomaram-se os pulmões de murganhos infectados e testemunhas como amostras, pesaram-se e homogeneizaram-se em RPMI que contém antibióticos. Após centrifugação, diluíram-se apropriadamente os sobrenadantes e analisou-se a carga viral por meio do ensaio de CPE-50%. Com base neste método, infectaram-se células MDCK confluentes com os sobrenadantes diluídos seriamente em RPMI a que se adicionaram antibióticos para FCS a 2% e incubaram-se durante três dias à temperatura de 37 °C numa atmosfera com 5% de CO₂. Por último, para cada diluição, contaram-se as cavidades que mostram efeitos positivos e compararam-se com as que apresentam efeitos citopáticos negativos de acordo com a fórmula de Reed e Muench. Calculou-se o título de CPE-50% em unidades/ml.

Como um parâmetro imunológico, avaliaram-se os níveis de citocinas inflamatórias utilizando o método ELISA. Utilizou-se uma placa de 96 cavidades para a experiência. Revestiu-se a placa com anticorpos monoclonais para as citocinas a serem estudadas e incubou-se durante a noite à temperatura de 4 °C. Mais tarde, adicionaram-se 200 µl/cavidade de BSA a 1% em tampão de carbonato durante 30 minutos à temperatura de 37 °C. Realizaram-se lavagens com TBS a 0,25% + Tween 20 e adicionaram-se as amostras durante 4 horas à temperatura de 37 °C. Como referência utilizou-se uma curva de referência de citocinas recombinantes em diluição escalar. Realizaram-se então as lavagens e

adicionou-se um anticorpo policlonal anti-citoquina, diferente do primeiro e deixou-se durante a noite à temperatura de +4 °C. Mais tarde, às lavagens com TBS a 0,5% + Tween 20, adicionou-se $MgCl_2$ 2 nM o terceiro conjugado de anticorpo para a fosfatase de enzima alcalina durante 4 horas à temperatura de 37 °C. Por último, adicionou-se um substrato para a enzima (100 µl/cavidade) e tomou-se a leitura utilizando o leitor ELISA e um filtro de 405 nm. Analisaram-se os anticorpos seguintes: 1) rato monoclonal anti-murganho TNF-alfa/murganho recombinante IL-6; 2) murganho recombinante TNF-alfa/murganho recombinante IL-6; 3) coelho policlonal anti-murganho TNF-alfa/cabra policlonal anti-murganho IL-6; 4) cabra anti-coelho IgG-fosfatase alcalina/anti-cabra IgG fosfatase alcalina.

Estudou-se a eficácia do resveratrol num modelo experimental de infecção pelo vírus da gripe em murganhos. Neste modelo, a inoculação intranasal do vírus provoca uma pneumonia hemorrágica grave a qual conduz à morte dos animais no decurso de 7 a 10 dias de infecção. O modelo experimental visa a avaliação da eficácia terapêutica da substância em estudo, conforme se determinou com base na sobrevivência dos animais infectados. Para esta finalidade, administrou-se o resveratrol aos animais em diferentes doses, numa base diária durante 7 dias, com início decorridos algumas horas após a infecção. Os resultados obtidos mostram que, muito embora a mortalidade dos animais tratados fosse elevada da ordem de 80%, a administração do resveratrol (1 mg/kg) reduziu de maneira significativa a mortalidade e 60% dos animais sobreviveram à infecção (Figura 9).

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de resveratrol como componente activo na preparação de um medicamento que exerce uma acção inibidora sobre a replicação do vírus da influenza e útil para a prevenção e/ou o tratamento de infecções provocadas pelo mesmo vírus da influenza.
2. Utilização de acordo com a reivindicação 1., em que o referido vírus é o vírus da influenza humano.
3. Utilização de acordo com a reivindicação 1., em que o referido medicamento é útil para o tratamento de infecções virais no domínio veterinário.

Lisboa, 8 de Fevereiro de 2008

Figura 1
Efeito do resveratrol sobre a replicação da gripe pr8 em células MDCK

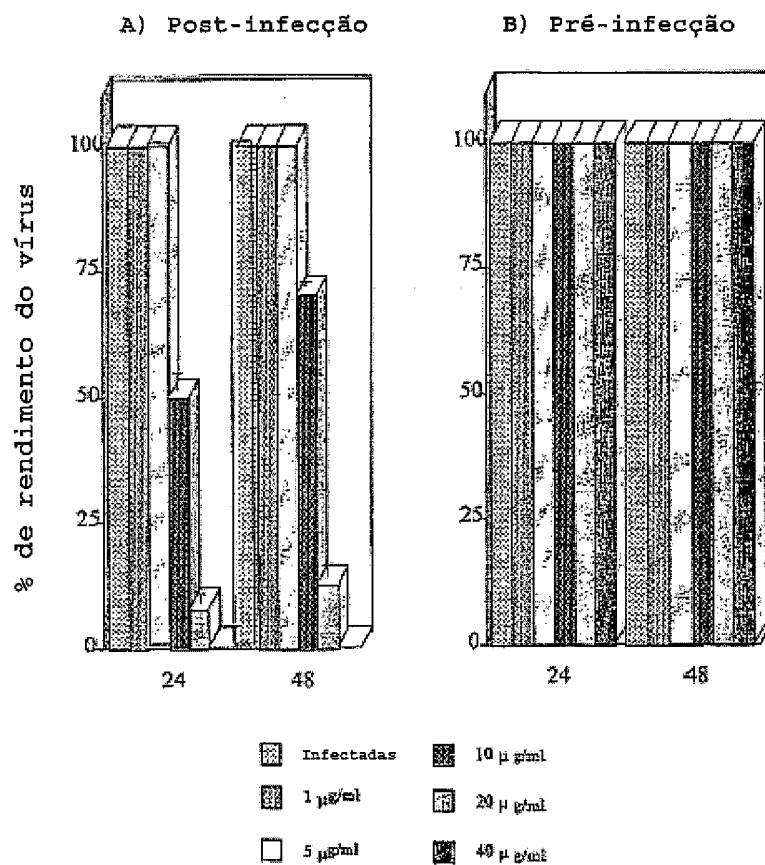


Figura 1 (continuação)

C) Pré-post infecção

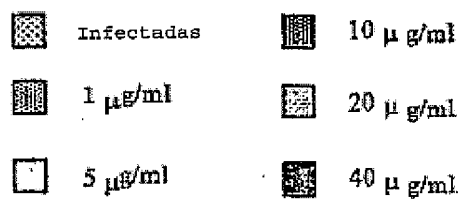
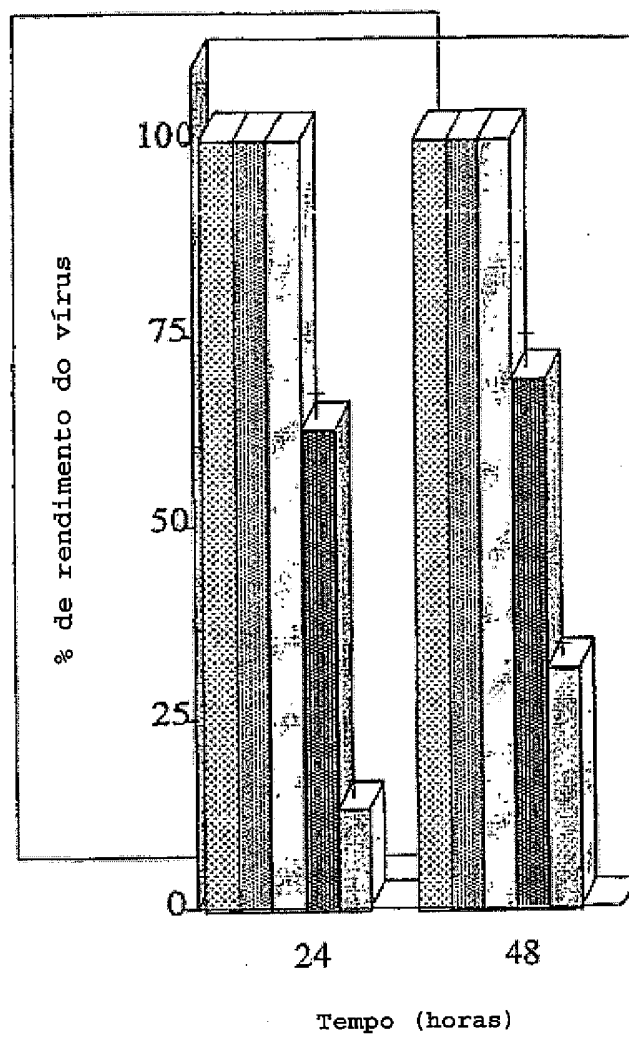


Figura 2A

Efeito do Resveratrol sobre a monocamada confluyente de células MDCK não infectadas

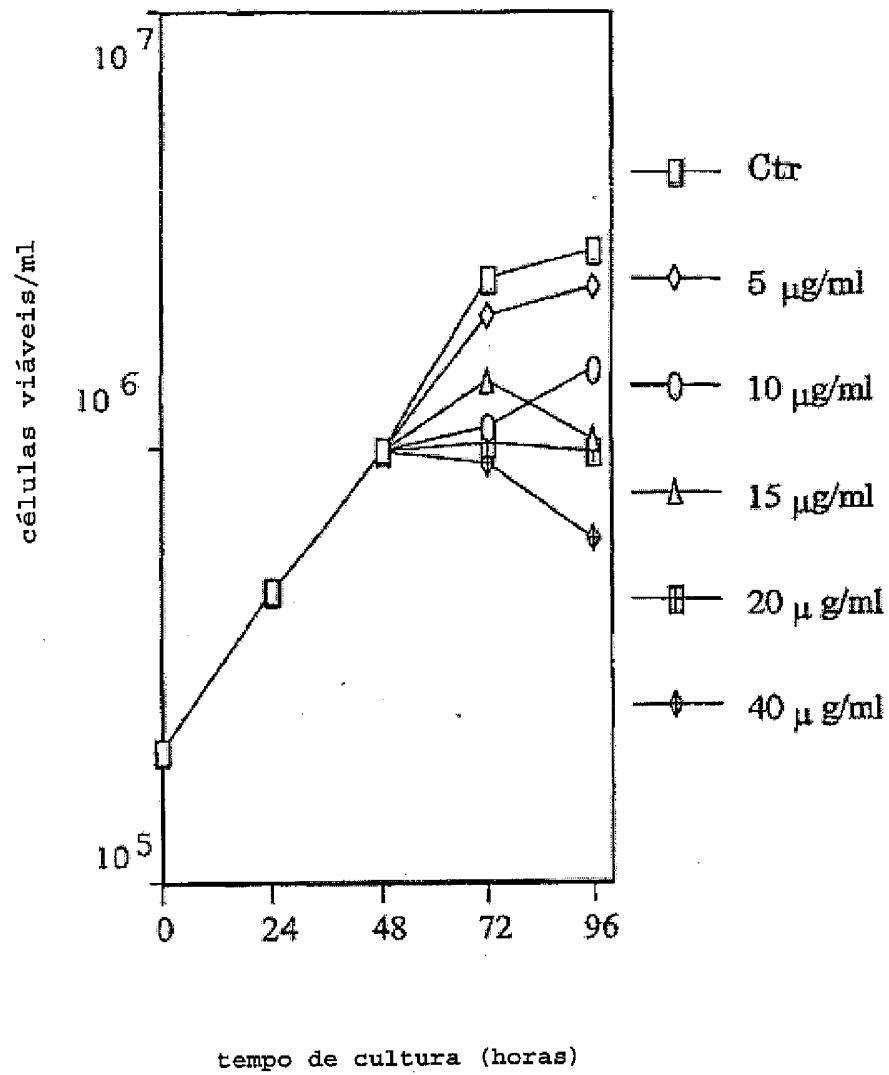


Figura 2B (continuação)

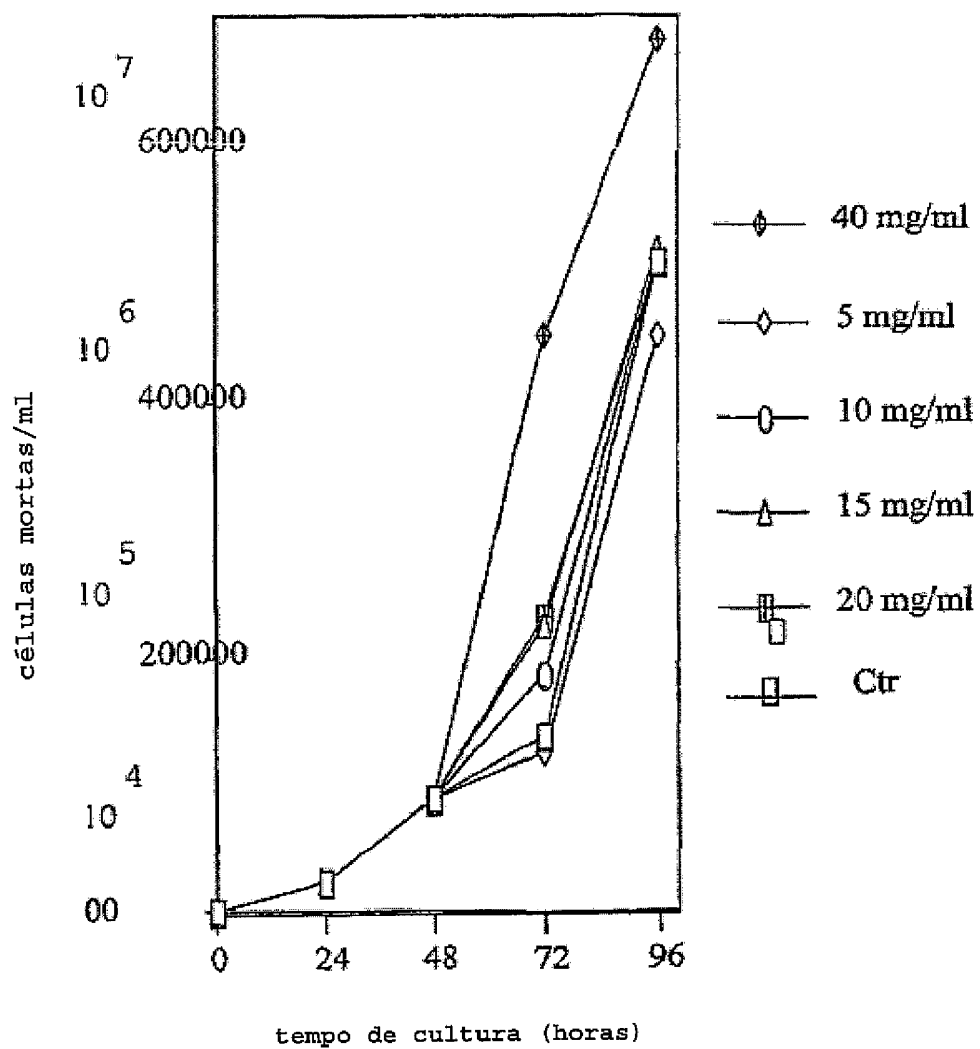


Figura 3
Caracterização da actividade antiviral do Resveratrol

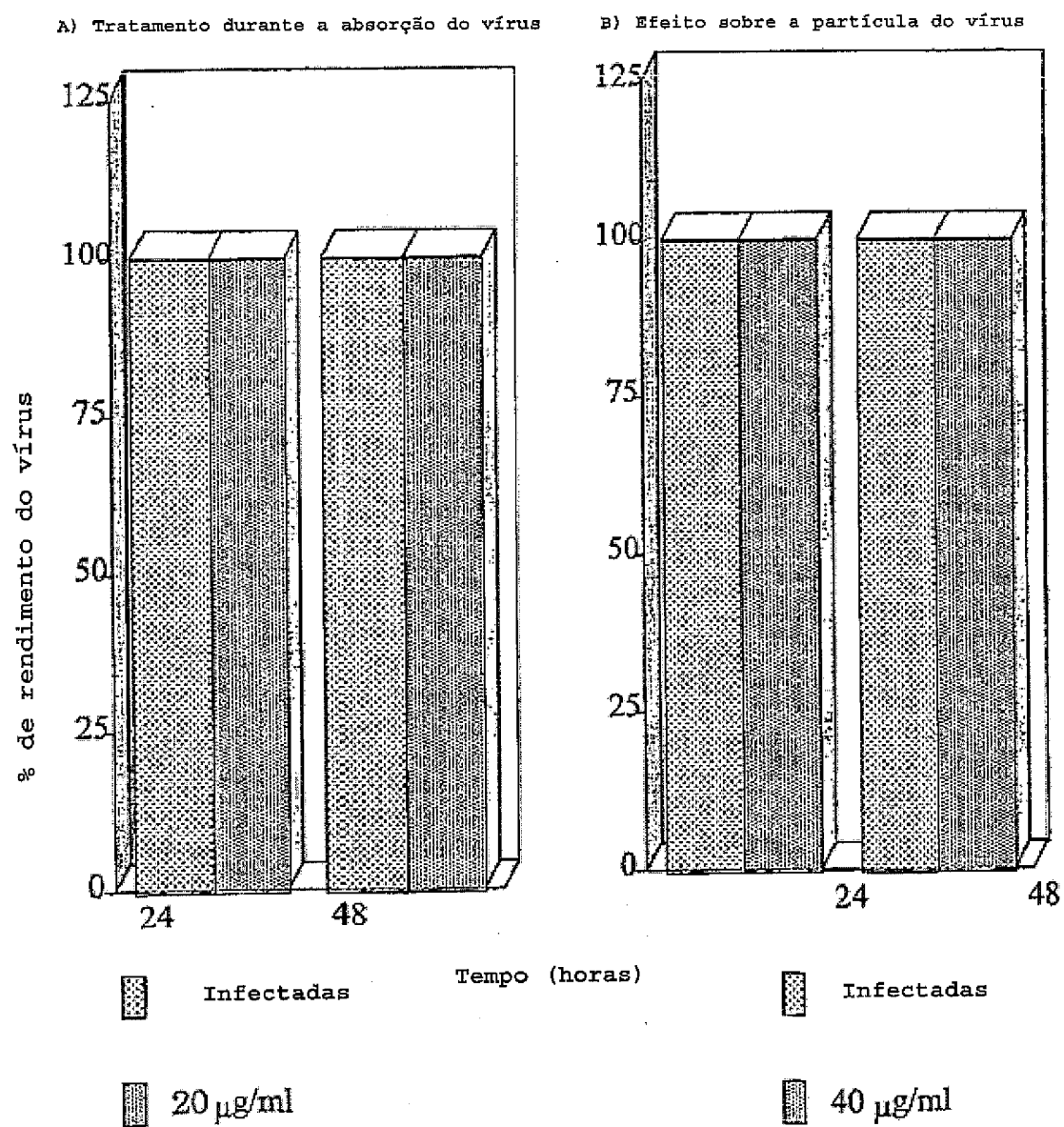


Figura 4A
Caracterização da actividade antiviral do Resveratrol

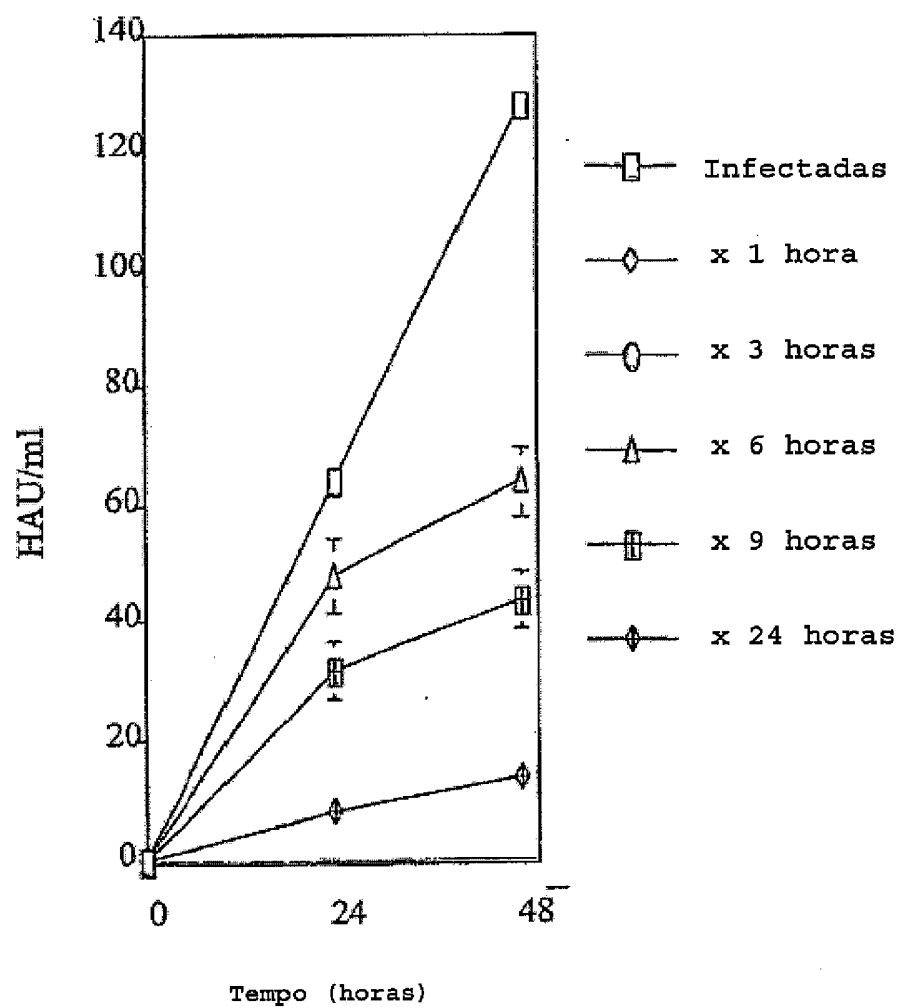


Figura 4B
Caracterização da actividade antiviral do Resveratrol

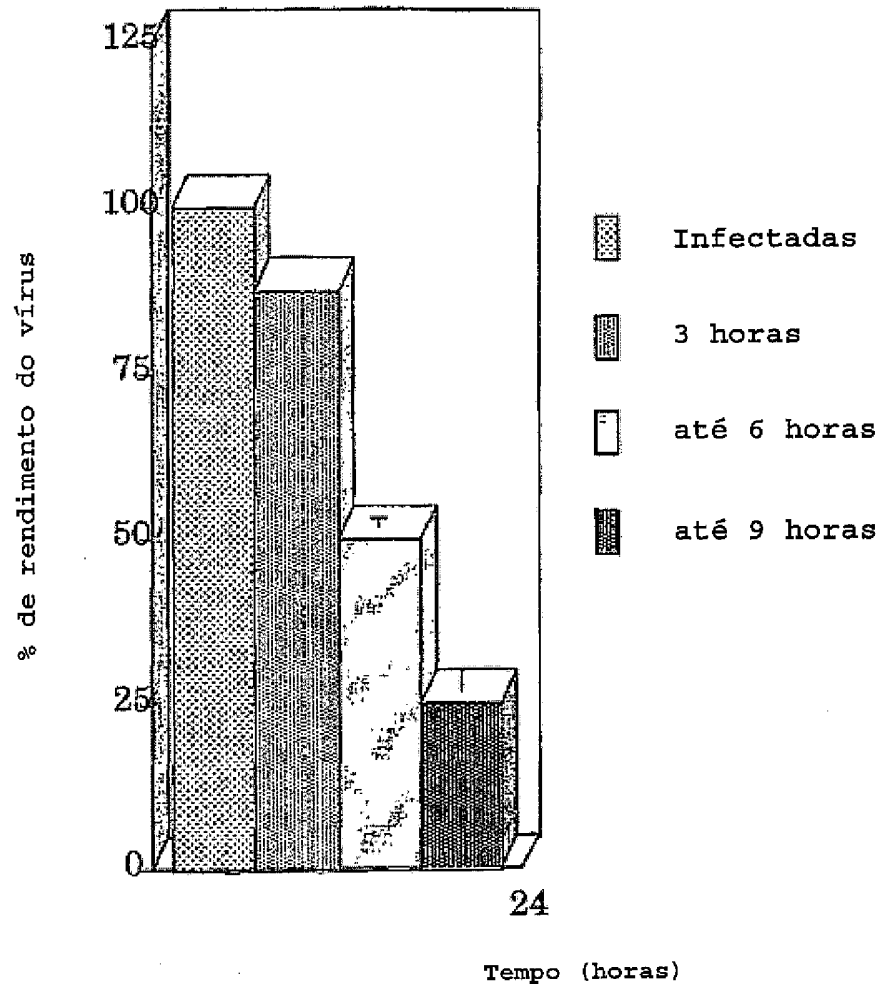


Figura 5
Apoptose em células MDCK tratadas com Resveratrol

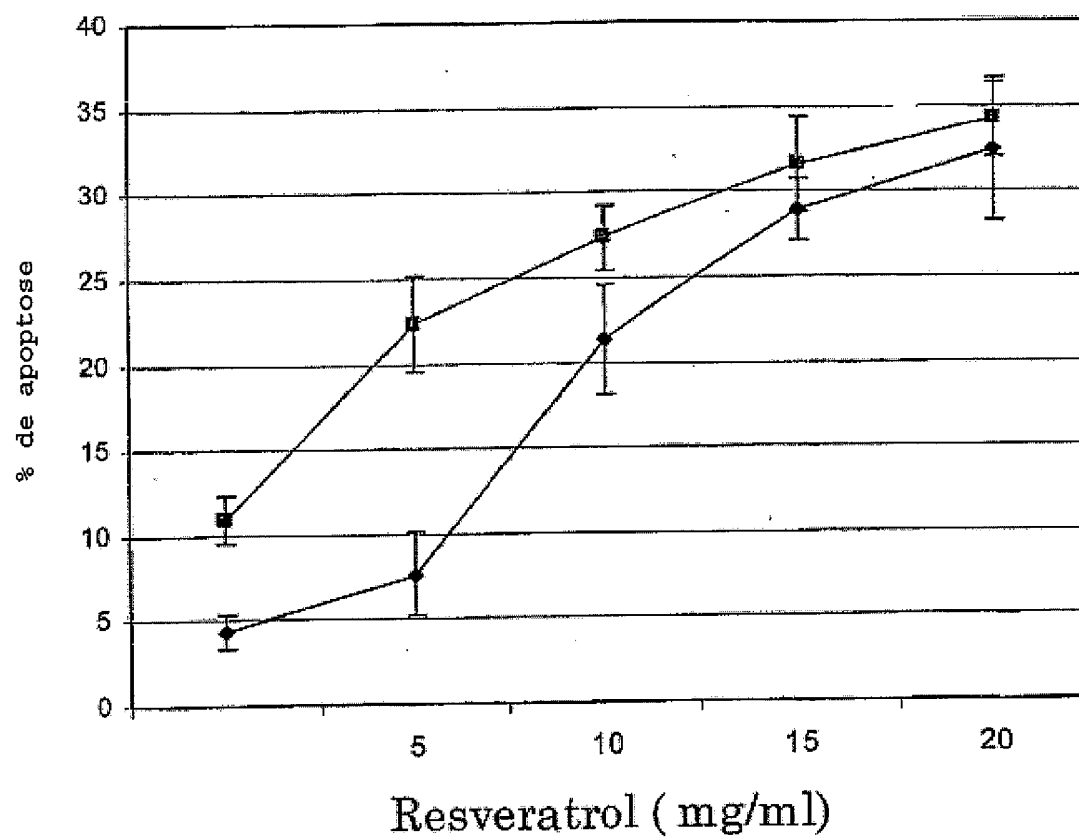
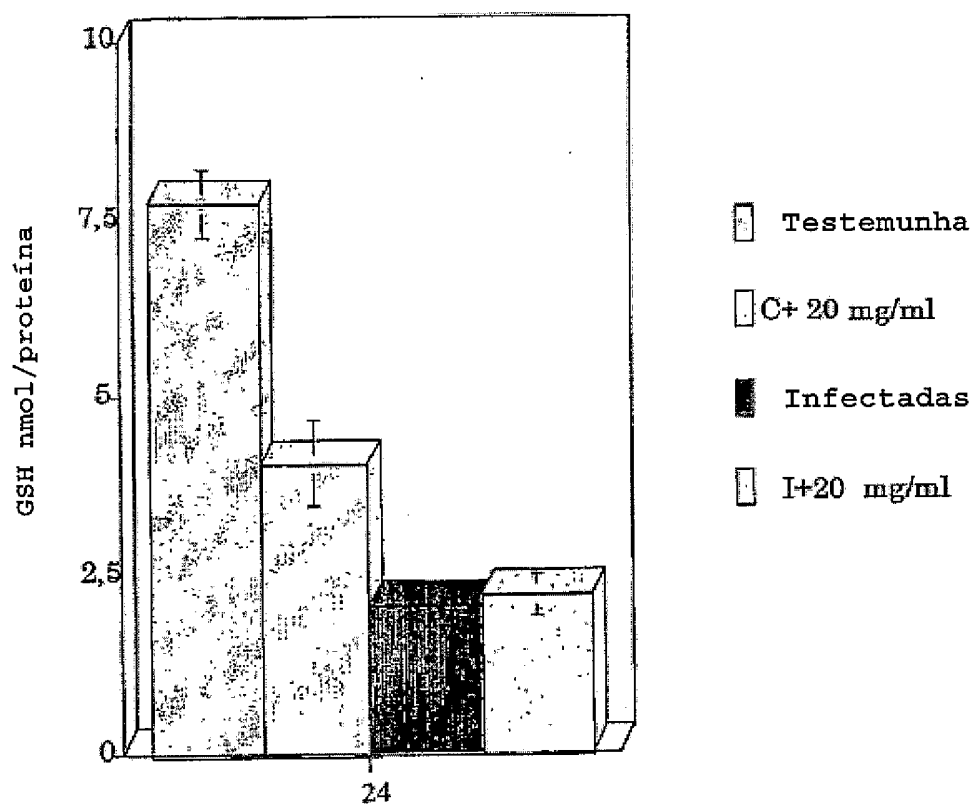


Figura 6
Correlação do efeito antiviral do resveratrol com estado redox intracelular



10/12

Figura 7

Efeito do Resveratrol sobre a síntese de proteínas virais de gripe pr8

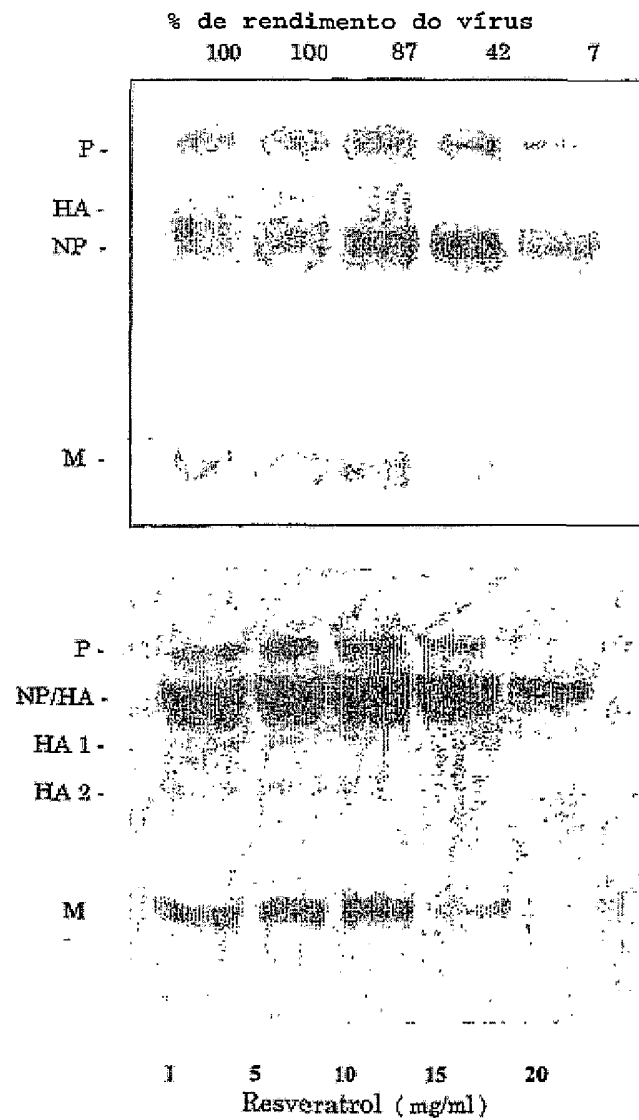
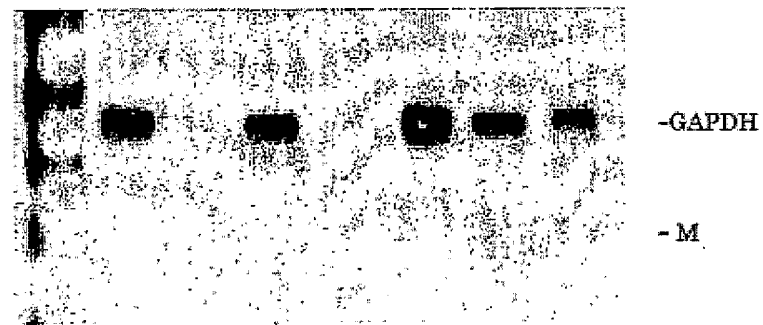
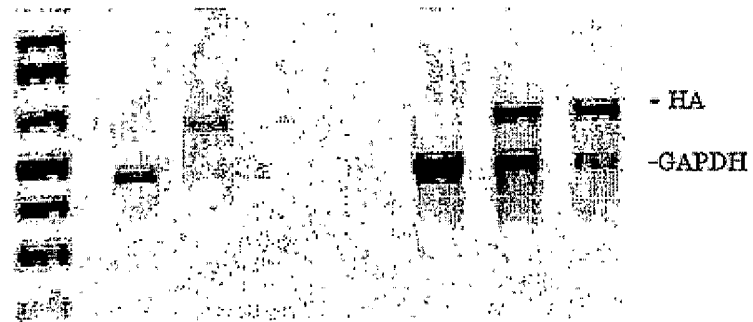


Figura 8
RT-PCR de ARNm para proteínas virais tardias



C I I+20 C I I+20

Resveratrol (mg/ml)

Figura 9
Efeito do Resveratrol administrado após injeção viral de gripe pr8 in vivo

