

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”

UNIGRANRIO

YASMIM FERNANDES ABREU

**SEMICARBAZONAS COMO INIBIDORAS DE ENTRADA DO SARS-COV-2
EM CÉLULAS HOSPEDEIRAS: UM ESTUDO EXPERIMENTAL**

RIO DE JANEIRO

2025

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”
UNIGRANRIO

YASMIM FERNANDES ABREU

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza
Herdy”, como requisito parcial para a obtenção do título
de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Dr. Rômulo José Soares Bezerra

Coorientador: MSc. Andreon Santos Machado da Silva

RIO DE JANEIRO
2025

YASMIM FERNANDES ABREU

**SEMICARBAZONAS COMO INIBIDORAS DE ENTRADA DO SARS-COV-2
EM CÉLULAS HOSPEDEIRAS: UM ESTUDO EXPERIMENTAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza
Herdy”, como requisito parcial para a obtenção do título
de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Dr. Rômulo José Soares Bezerra

Coorientador: MSc. Andreon Santos Machado da Silva

Aprovada em:

Duque de Caxias, _____ de _____ de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Rômulo José Soares Bezerra (orientador)

MSc. Andreon Santos Machado da Silva (Coorientador)

Prof. Letícia Maria da Silva Antônio (Interno)

Dra. Natiele Carla da Silva Ferreira (Externo)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus, primeiramente, por me conceder o dom da vida, a saúde e a força para seguir mesmo diante dos momentos mais desafiadores. Agradeço pela luz que guiou meus passos, pela serenidade nos dias de incerteza e por colocar em meu caminho pessoas que foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

À minha mãe, meu exemplo de amor, garra e dedicação. Obrigada por cada palavra de incentivo, por cada gesto de cuidado e por acreditar em mim quando eu mesma duvidava.

À minha avó, que esteve comigo em tantos momentos importantes, sempre com uma palavra de apoio e um gesto de carinho.

Ao meu esposo, que desde então se tornou parte inseparável da minha história. Você não foi apenas apoio, mas presença constante, abraço seguro e incentivo diário. Esteve comigo em todos os capítulos dessa jornada, mostrando que o amor verdadeiro se constrói na parceria e no cuidado diário. Obrigada por acreditar em mim, por celebrar cada conquista como se fosse sua e por transformar os momentos mais difíceis em lembranças de superação.

Ao meu orientador, Dr. Rômulo José Soares Bezerra, sua dedicação e seu conhecimento foram essenciais para meu crescimento acadêmico e profissional. Obrigada pela oportunidade e por ter aberto portas que me permitiram crescer como profissional e como pessoa.

Ao meu coorientador, MSc. Andreon Santos Machado da Silva, pela disponibilidade, pelo apoio técnico e científico e por sempre encontrar tempo para esclarecer minhas dúvidas e oferecer conselhos valiosos. Sua contribuição foi indispensável para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 METODOLOGIA.....	12
2.1 Cultivo das células de linhagens.....	12
2.2 Avaliação da recuperação viral pelo método de contagem de PFU	12
2.3 Avaliação de citotoxicidade (LDH)	13
2.4 Ensaio de GRIESS	13
3 RESULTADOS	13
5 CONCLUSÃO.....	20
6 REFERENCIAS	21

SEMICARBAZONAS COMO INIBIDORAS DE ENTRADA DO SARS-COV-2 EM CÉLULAS HOSPEDEIRAS: UM ESTUDO EXPERIMENTAL

Yasmim Fernandes Abreu¹

Msc. Andreon Santos Machado da Silva²

Dr. Rômulo José Soares Bezerra³

RESUMO

Os números elevados de COVID-19 evidenciam a necessidade de identificar e desenvolver novos compostos com ação antiviral eficaz e segura contra o SARS-CoV-2. O estudo investiga a atividade antiviral e a segurança dos compostos Semicarbazona-ISATINA e Semicarbazona-ISAPROP, avaliando sua capacidade de inibir a replicação do SARS-CoV-2 e seus efeitos imunológicos, utilizando variadas concentrações dos compostos, em diferentes linhagens celulares (Vero E6, THP-1, H1299 e HepG2). Os resultados do ensaio de plaque sugerem que os compostos ISATINA e ISAPROP apresentaram atividade antiviral contra a variante Cepa A nos MOIs 0,6 (100%, 99,9%), 0,06 (100%, 99,9%), 0,006 (100%, 99,9%), 0,0006 (100%, 99,9%) e 0,00006 (100%, 99,9%). Contra a variante B.1.1.33, foi observada atividade antiviral nos MOIs 0,006 (100%, 100%), 0,0006 (100%, 100%) e 0,00006 (100%, 100%). Os resultados do LDH sugerem que não houve citotoxicidade nas concentrações de ISATINA (1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM) e de ISAPROP (1 µM, 4 µM, 16 µM e 24 µM). Em relação aos níveis de óxido nítrico (NO), as linhagens Vero CCL81, H1299 e THP-1 apresentaram valores semelhantes ao controle negativo em todas as concentrações testadas de ISATINA e ISAPROP. Na linhagem HepG2, resultados próximos ao controle negativo foram observados nas concentrações de 1 µM e 5 µM para ISATINA e 16 µM e 24 µM para ISAPROP. Embora o ensaio de plaque ainda esteja em fase piloto, os compostos testados demonstram ação antiviral contra o SARS-CoV-2, sem citotoxicidade e ativação celular, sendo promissores para o desenvolvimento de novas estratégias antivirais.

Palavras-chave: SARS-CoV-2. Semicarbazona-ISATINA. Semicarbazona-ISAPROP. Antiviral. Citotoxicidade. LDH. Ensaio de Griess.

¹ Graduando(a) do curso de Biomedicina na Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO.

² Biomédico, Mestre em medicina tropical pela Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

³ Farmacêutico, Doutor em Biologia Celular e Molecular ênfase em Farmacologia e Imunologia pela Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

ABSTRACT

The high numbers of COVID-19 cases highlight the need to identify and develop new compounds with effective and safe antiviral action against SARS-CoV-2. This study investigates the antiviral activity and safety of the compounds Semicarbazone-ISATIN and Semicarbazone-ISAPROP, evaluating their ability to inhibit SARS-CoV-2 replication and their immunological effects, using varying concentrations of the compounds in different cell lines (Vero E6, THP-1, H1299, and HepG2). The results of the plaque assay suggest that the compounds ISATINA and ISAPROP showed antiviral activity against the A strain variant at MOIs of 0.6 (100%, 99.9%), 0.06 (100%, 99.9%), 0.006 (100%, 99.9%), and 0.00006 (100%, 99.9%). Against the B.1.1.33 variant, antiviral activity was observed at MOIs of 0.006 (100%, 100%), 0.0006 (100%, 100%), and 0.00006 (100%, 100%). The LDH results suggest that there was no cytotoxicity at the concentrations of ISATINA (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M) and ISAPROP (1 μ M, 4 μ M, 16 μ M, and 24 μ M). Regarding nitric oxide (NO) levels, the Vero CCL81, H1299, and THP-1 cell lines showed values similar to the negative control at all tested concentrations of ISATINA and ISAPROP. In the HepG2 cell line, results close to the negative control were observed at concentrations of 1 μ M and 5 μ M for ISATINA and 16 μ M and 24 μ M for ISAPROP. Although the plaque assay is still in the pilot phase, the tested compounds demonstrate antiviral activity against SARS-CoV-2, without cytotoxicity or cell activation, showing promise for the development of new antiviral strategies.

Keywords: SARS-CoV-2. Semicarbazone-ISATIN. Semicarbazone-ISAPROP
Antiviral. Cytotoxicity. LDH. Griess assay.

1 INTRODUÇÃO

No final de dezembro de 2019, um novo coronavírus chamado de SARS-CoV-2 foi localizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em Wuhan, uma cidade central na China (Mohamadian et al., 2021). Em 30 de janeiro de 2020, a OMS declarou a doença respiratória epidêmica, uma Emergência de Saúde Pública de Interesse Internacional (Mohamadian et al., 2021). Em 11 de março de 2020, o diretor-geral da OMS, Tedros Adhanom Ghebreyesus, decretou a situação com o novo coronavírus como uma pandemia mundial. (Mohamadian et al., 2021). Em 1º de julho de 2020, o SARS-CoV-2 afetou mais de 200 países, resultando em mais de 10 milhões de casos identificados com 508.000 mortes confirmadas (Wiersinga et al., 2020).

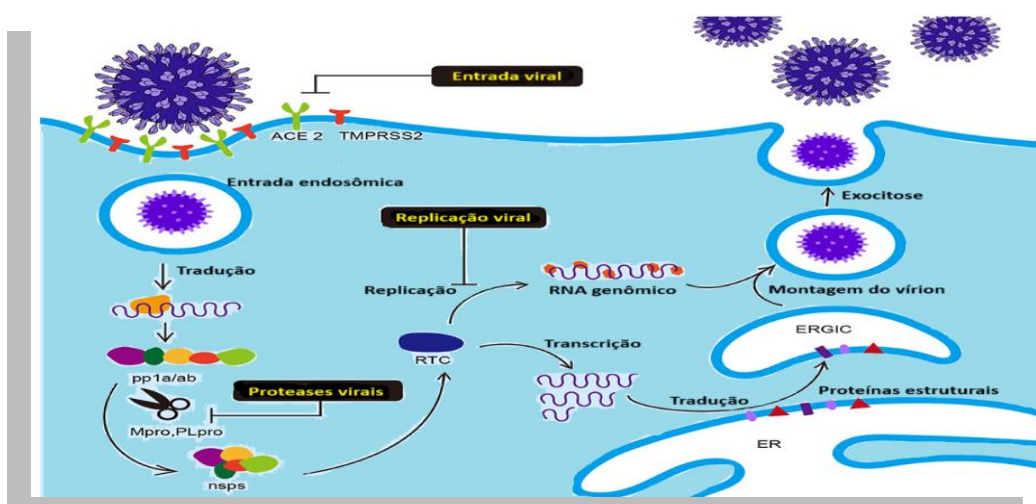
A doença causada pelo SARS-CoV-2 recebeu o nome oficial “Coronavirus Disease 19” (COVID-19) (Cruz-Fierro et al., 2022). Desde então, a epidemia causada pela COVID-19, que atingiu o mundo ainda é um problema devido ao crescimento de novos casos, totalizando cerca de 160.699 casos notificados no mundo e 1.271 óbitos (Dados atualizados em 15/10/2025) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2025). O Brasil registra cerca de 39.318.227 casos confirmados, 716.626 óbitos e 18709,9 de incidência por COVID-19 (dados do dia 15/10/2025) (BRASIL, 2025).

Atualmente, sete coronavírus humanos (HCoV) são reconhecidos (Cascella et al., 2023). O SARS-CoV-2 apresenta estrutura composta por RNA fita simples de polaridade positiva, envolta por um capsídeo, que por sua vez é recoberto por uma membrana lipídica com duas proteínas embebidas, a proteína de membrana (M) e a espícula (S) (JACKSON; FARZAN; CHEN; CHOE, 2022). A proteína S é composta por duas subunidades, a S1, responsável pela interação com o receptor e a S2, responsável pela fusão de membrana (Perlman; Netland, 2009). Estruturalmente similar ao SARS-CoV e ao MERS-CoV, foi classificado no gênero betacoronavírus e apresenta 79,5% de homologia genética com o SARS-CoV-2 (Shang et al., 2020; Wang et al., 2020).

Após se ligar às células epiteliais no trato respiratório, o SARS-CoV-2 começa a se replicar e migrar para as vias aéreas e entra nas células epiteliais alveolares nos pulmões (Hu et al., 2020). A replicação ativa e a liberação do vírus nas células pulmonares levam a sintomas não específicos, como febre, mialgia, dor de cabeça e

sintomas respiratórios (Cevik; Bamford; Ho, 2020). A ampla distribuição dos receptores da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), em diversos tecidos do organismo está relacionado a variedade de manifestações clínicas observadas em pacientes (Da Costa et al., 2021; Monteil et al., 2020). A expressão de ECA2, no epitélio intestinal, nas células endoteliais renais e nos vasos sanguíneos, pode estar associada à ocorrência de sintomas gastrointestinais, disfunções cardiovasculares e lesão renal aguda, frequentemente relatados em quadros clínicos de infecção por SARS-CoV-2 (Da Costa et al., 2021; Monteil et al., 2020).

Figura 1. Ciclo viral



Representação do ciclo de replicação do SARS-CoV-2, destacando as etapas de entrada viral, tradução das proteínas, formação do complexo de replicação, produção de proteínas estruturais, montagem e liberação de novos vírions.
Fonte: Modificado de Chakraborty, 2020.

Com base nos mecanismos de ação de drogas antivirais, diversas abordagens terapêuticas têm sido propostas, com destaque para os inibidores da polimerase e os inibidores de protease (Tao et al., 2021). Entretanto, outras abordagens terapêuticas vêm sendo também avaliadas (Connors; Levy, 2020). Tratamentos que abordam a resposta do hospedeiro à infecção, como anti-inflamatórios esteroidais e anticoagulantes, são respaldados pelos achados anatomopatológicos de pacientes que foram a óbito, onde trombo-inflamação pulmonar (Connors; Levy, 2020) e coagulação intravascular disseminada (CID) são importantes achados (Xiong; Liang; Wei, 2020).

Recentemente, o MS emitiu uma nota técnica de atualização, referente ao tratamento da COVID-19, que incorpora a associação dos medicamentos Nirmatrelvir

e Ritonavir para casos não graves em adultos, que não requerem oxigênio suplementar, mas que apresentam risco aumentado de progressão para doença grave (BRASIL, 2022). Entretanto, a combinação dos antivirais nirmatrelvir e ritonavir são comercializados pela indústria farmacêutica e apresentam custos elevados que impactam consideravelmente os gastos para a saúde pública (G1, 2023).

No início de 2020, nenhum tratamento específico havia sido desenvolvido para COVID-19, então o *Solidarity* começou com medicamentos reaproveitados para outras condições, como o Remdesivir (WHO SOLIDARITY TRIAL CONSORTIUM, 2022). Como base no estudo, embora o remdesivir tenha mostrado algum benefício em termos de recuperação clínica, as evidências atuais sugerem que ele não reduz a mortalidade ou a necessidade de ventilação mecânica em pacientes hospitalizados com COVID-19 (WHO SOLIDARITY TRIAL CONSORTIUM, 2022). Em contrapartida, a inclusão da dexametasona nas estratégias terapêuticas complementares destacou-se como uma abordagem viável para pacientes graves, sendo uma opção acessível, pois reduziu a mortalidade em 28 dias, mas apenas naqueles que necessitavam de ventilação mecânica invasiva ou oxigenoterapia de suporte (Null, 2021).

A ampla variedade de mecanismos de ação atribuídos às semicarbazonas e aos seus complexos metálicos evidencia o potencial dessa classe de compostos como candidatos terapêuticos (Beraldo, 2004). Sua capacidade de atuar como inibidores enzimáticos, interagir com o DNA, modular reações redox e até mimetizar a ação de enzimas, somada a efeitos adicionais, como a inibição da produção de óxido nítrico observada em derivados específicos, reforça a relevância farmacológica das semicarbazonas e justifica o interesse contínuo em seu estudo (Beraldo, 2004).

A ISATINA (1H-indol-2,3-diona) pode ser encontrado na natureza, como em plantas do gênero *Isatis*, na secreção da glândula parótida de sapos do gênero *Bufo* e no corpo humano, como um metabólito do hormônio adrenalina (Mesquita, 2019). Além disso, o composto também pode ser obtido e manipulado de forma sintética, para se gerar outros compostos como o ISAPROP (Mesquita, 2019). A partir de algumas reações químicas, os compostos nucleofílicos como hidroxilaminas, tiosemicarbazidas, semicarbazidas e aminoguanidinas, reagem com a isatina, mais especificamente, no carbono C-3, para formar uma gama de substâncias com atividades anticorrosiva, pesticida e farmacológica (Mesquita, 2019).

Portanto, além de reposicionamento de fármacos e compostos fitoquímicos, compostos derivados de síntese química, como os Semicarbazona-ISAPROP

(C₁₂H₁₀N₄O₂) e Semicarbazona-ISATINA (C₉H₈N₄O₂) também são potenciais candidatos ao tratamento para Covid-19, pois o Semicarbazona-ISATINA possui ação anti-inflamatória, de regulação de efeito citopático e de citotoxicidade, que foram descritas em estudos *in vitro*, frente a infecção por HIV e Tuberculose (Varpe et al., 2021). A ação antiviral da isatina, especialmente na forma de seus compostos, como a isatina isopropílica, pode ser explicada pela alteração estrutural da molécula, o que potencializa suas propriedades biológicas (Silva, 2013). Um estudo recente demonstrou que ribonucleosídeos de isatina (resultantes da associação entre isatina e ribonucleosídeos) exibiram atividade antiviral contra o HSV-1 (Herpes Simplex Virus tipo 1), com taxas de inibição variando entre 15% e 66% (Beraldo, 2004).

Novos fármacos, derivados exclusivamente de dados observacionais ou de testes clínicos realizados com amostragem pequena, podem possivelmente introduzir um risco maior de viés ou imprecisão nos resultados dos estudos. Assim, o estabelecimento de tratamentos naturais, aprovados pela ANVISA e em ensaios pré-clínicos em modelos *in vitro*, permitem maior agilidade na obtenção de resultados, para o direcionamento de novos ensaios clínicos em humanos, chegando rapidamente na população em exposição a doença.

A busca por tratamentos eficazes e rápidos contra o SARS-CoV-2 ainda é um desafio importante, e por isso a avaliação de novos fármacos se torna essencial para o desenvolvimento de terapias mais seguras e eficientes. Entre as possibilidades, os compostos sintéticos Semicarbazona-ISAPROP e Semicarbazona-ISATINA despertam interesse por reunirem potencial antiviral e capacidade de modular respostas inflamatórias e imunológicas. Para compreender melhor seus efeitos, utilizamos diferentes linhagens celulares neste trabalho, mas para realizar o ensaio de plaque escolhemos a Vero E6, pois esta célula é um dos melhores modelos para infecção. Seguimos para o ensaio de plaque com as variantes Cepa A e B.1.1.33 do SARS-CoV-2, permitindo uma visão ampla da resposta celular. Nesse contexto, foram realizados ensaios de plaque para verificar a redução do efeito citopático, testes de citotoxicidade a partir dos sobrenadantes coletados em diferentes tempos e concentrações, além da quantificação de nitritos como marcador de ativação celular. Também foi analisado o perfil anti-inflamatório associado ao tratamento, com o objetivo de revelar o potencial terapêutico desses compostos no enfrentamento da infecção viral.

2 METODOLOGIA

Este Projeto de Pesquisa foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LADTV) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz). O SARS-CoV-2 foi adquirido diretamente do Laboratório de Referência de Vírus Respiratório e Sarampo (LVRS) do IOC/Fiocruz. Os compostos sintéticos foram fornecidos pelo Laboratório de Química da Universidade Federal Fluminense (UFF). As células de linhagem Vero E6, Vero CCL81, THP-1 e HepG2 foram comercializadas pelo The Global Bioresource Center (ATCC), e a célula H1299 foi disponibilizada pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

2.1 Cultivo das células de linhagens

Todas as células utilizadas neste trabalho foram mantidas em meio de cultura DMEM e RPMI (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Sigma-Aldrich), com troca de meio fresco a cada 48 horas, de acordo com o protocolo do fornecedor.

2.2 Avaliação da recuperação viral pelo método de contagem de PFU

Visando determinar o efeito antiviral dos compostos, a partir da contagem das partículas virais infecciosas. O título viral foi calculado, em PFU/mL. Aproximadamente 24 horas, antes da titulação, foram preparadas placas de 24 poços com concentração de 2×10^5 células/poço. Após esse período, as células foram infectadas com as variantes de SARS-CoV-2, com carga viral de 1×10^9 cg/ μ L por 60 minutos a 37°C. Posteriormente, foi realizada a troca do meio para o descarte dos vírus não internalizados, seguido dos tratamentos com os compostos Semicarbazona-ISAPROP e Semicarbazona-ISATINA. Em seguida, adicionamos o meio diluído em CMC 3% e incubamos por 72 horas. Após esse período, realizamos a coloração da placa com solução de cristal violeta 0,02%, em formaldeído 5%, seguida da análise do PFU/mL.

2.3 Avaliação de citotoxicidade (LDH)

Para determinar o melhor tempo e a concentração dos compostos durante o tratamento, foram realizados ensaios de citotoxicidade nas células THP-1, Vero CCL81, H1299 e HepG2. A HepG2 foi utilizada por possuir um perfil celular adequado para estudos de biodisponibilidade e biotransformação de medicamentos. Após os períodos de tratamento de 24, 48 e 72 horas, coletaram-se os sobrenadantes das culturas e realizou-se a detecção de LDH no meio utilizando kit específico (Sigma-Aldrich).

2.4 Ensaio de GRIESS

As células foram cultivadas e tratadas com diferentes compostos, incluindo controles como Triton, DMSO e dexametasona, e tratamentos com Semicarbazonas. Após incubação de 24, 48 e 72 horas, coletaram-se os sobrenadantes e realizou-se a análise pela adição dos reagentes de Griess, com leitura da absorbância a 540 nm, visando avaliar a produção de NO, um biomarcador inflamatório, e determinar possíveis efeitos inibitórios dos compostos sobre essa resposta.

2.5 Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram inicialmente tratados com a identificação de outliers, e a normalidade foi avaliada por meio da análise de curva gaussiana. A partir dos resultados da normalidade, realizaram-se testes paramétricos ou não paramétricos adequados, utilizando como parâmetro de significância $p < 0,05$ (Instat GraphPad Prism).

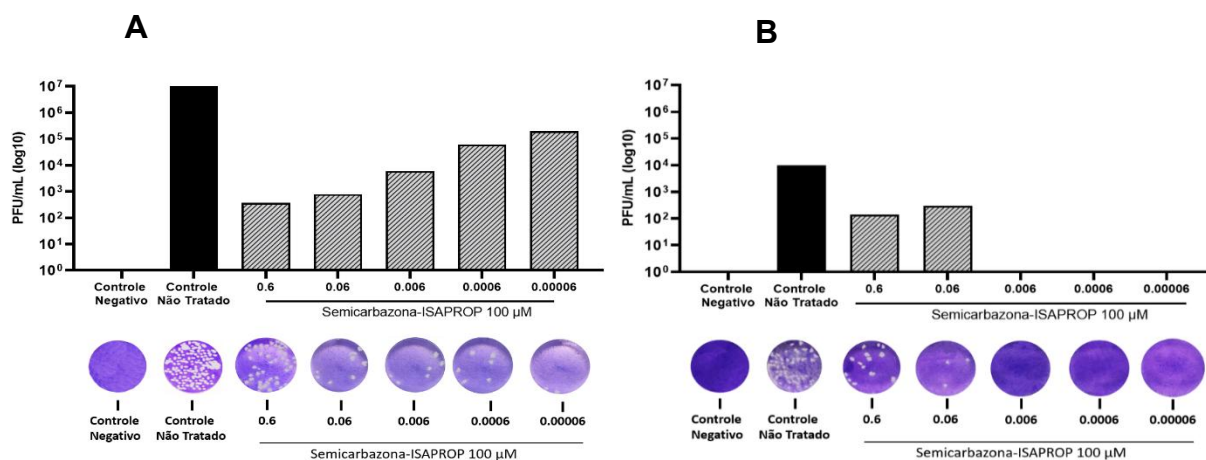
3 RESULTADOS

Durante a pandemia de COVID-19, tornou-se evidente a urgência em identificar fármacos com eficácia antiviral comprovada e que pudessem ser disponibilizados a baixo custo. Essa busca refletiu não apenas uma necessidade científica, mas também um desafio global de saúde pública. Para isso, o uso de ensaios laboratoriais se mostrou essencial na avaliação da atividade de diferentes compostos frente ao SARS-CoV-2.

Neste sentido, nós iniciamos os estudos determinando a capacidade de inibição do efeito citopático dos compostos sintéticos Semicarbazona-ISATINA e Semicarbazona-ISAPROP. Nos ensaios preliminares, nós testamos na célula VERO E6, o tratamento com os compostos sintéticos, frente a infecção pelas variantes B.1.1.33 e Cepa A, no tempo de incubação de 72 horas.

Os ensaios pilotos demonstraram que a Semicarbazona-ISAPROP exibiu atividade antiviral contra a variante Cepa A nos MOIs 0,6 ($3,7 \times 10^2$, 99,9%); 0,06 (8×10^2 , 99,9%); 0,006 (6×10^3 , 99,9%); 0,0006 (6×10^4 , 99,9%) e 0,00006 (2×10^5 , 99,9%) (Figura 2A). Além disso, as mesmas ações antivirais foram observadas contra a variante B.1.1.33 nos seguintes MOIs 0,6 ($1,4 \times 10^2$, 98,6%); 0,06 (3×10^2 , 97%); 0,006 (0, 100%); 0,0006 (0, 100%) e 0,00006 (0, 100%) (Figura 2B).

Figura 2. Avaliação piloto do composto Semicarbazona Isaprop

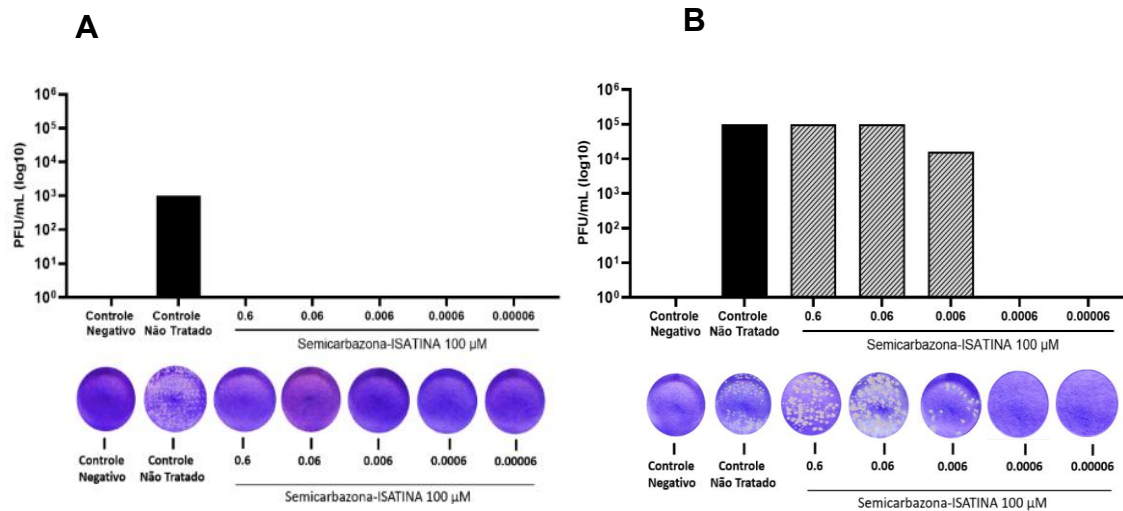


Avaliação piloto da atividade antiviral contra variantes de SARS-CoV-2, em diferentes multiplicidades de infecção (MOI), a partir dos compostos Semicarbazona-ISAPROP e as variantes Cepa A (A) e B.1.1.33 (B). Ensaio de plaque, com tratamento e infecção de 1 hora, por diferentes MOIs (0,6; 0,06; 0,006; 0,0006; e 0,00006), em Vero-E6, plaqueadas com *imput* de 2×10^5 células/poço, em DMEM com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). Posteriormente, as células foram incubadas em 72 horas com Carboximetilcelulose (CMC), fixadas em solução de Cristal de Violeta, contadas em microscópio óptico e analisadas com GraphPad Prism 9.

Surpreendentemente, o composto Semicarbazona-ISATINA demonstrou uma completa ação antiviral frente a variante Cepa A, nos MOIs 0,6 (0, 100%); 0,06 (0, 100%); 0,006 (0, 100%); 0,0006 (0, 100%) e 0,00006 (0, 100%) (Figura 3A). Entretanto, o mesmo não foi observado contra a variante B.1.1.33, pois o composto

somente apresentou atividade antiviral em alguns MOIs, que se seguem 0,6 (1×10^5 , 0%); 0,06 (1×10^5 , 0%); 0,006 ($1,6 \times 10^4$, 100%); 0,0006 (0, 100%) e 0,00006 (0, 100%) (Figura 3B).

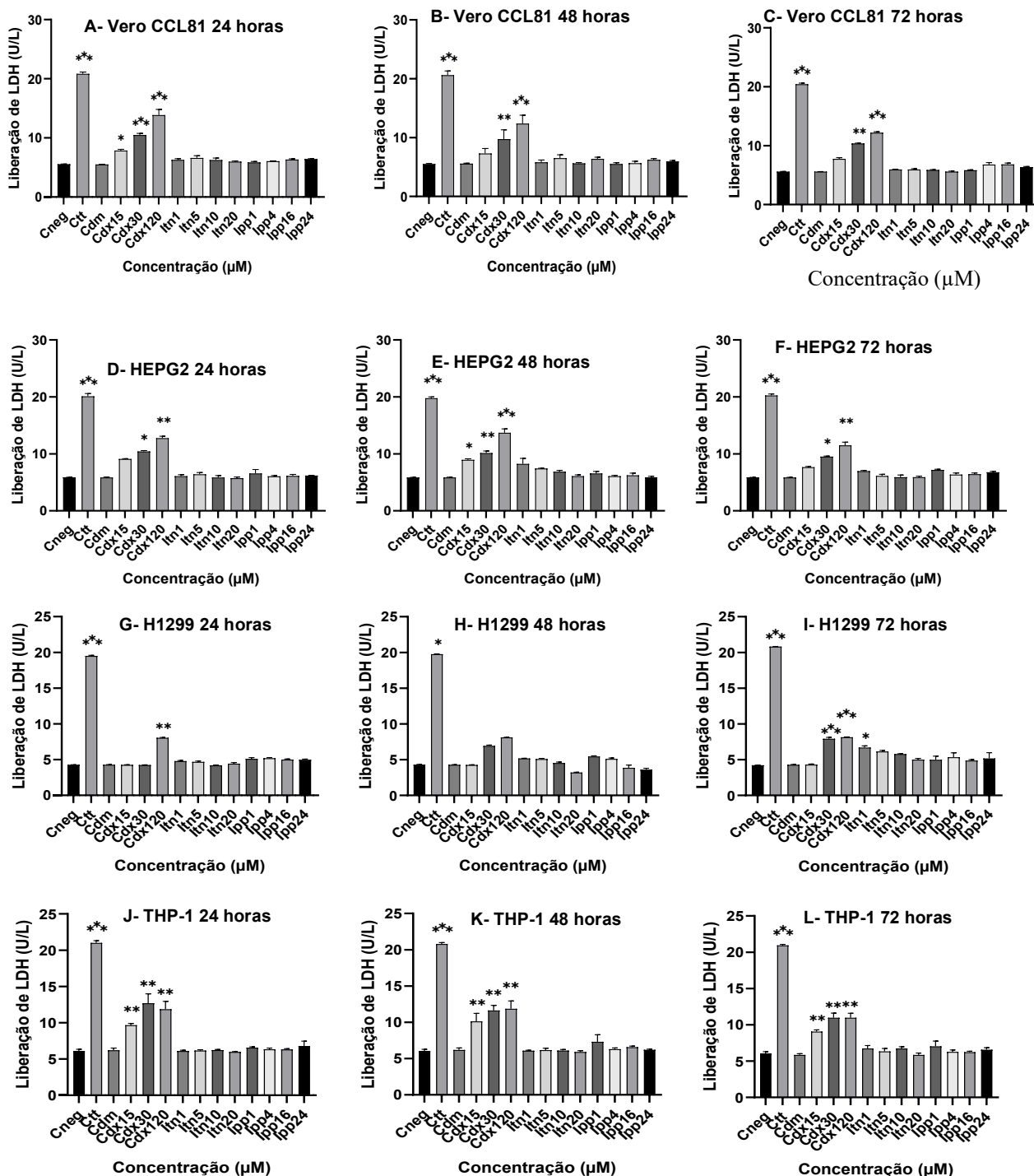
Figura 3. Avaliação piloto do composto Semicarbazona Isatina



Avaliação piloto da atividade antiviral contra variantes de SARS-CoV-2, em diferentes multiplicidades de infecção (MOI), a partir dos compostos Semicarbazona-ISATINA e as variantes Cepa A (A) e B.1.1.33 (B). Ensaio de plaque, com tratamento e infecção de 1 hora, por diferentes MOIs (0,6; 0,06; 0,006; 0,0006; e 0,00006), em Vero-E6, plaqueadas com input de 2×10^5 células/poço, em DMEM com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). Posteriormente, as células foram incubadas em 72 horas com Carboximetilcelulose (CMC), fixadas em solução de Cristal de Violeta, contadas em microscópio óptico e analisadas com GraphPad Prism 9.

Após a análise do PFU, foram realizados ensaios para avaliar a citotoxicidade dos compostos e a produção de NO. A citotoxicidade dos compostos Semicarbazona-ISATINA e Semicarbazona-ISAPROP foi investigada por meio do ensaio de LDH nas linhagens Vero CCL81, HepG2, H1299 e THP-1, utilizando a liberação de LDH como marcador de integridade da membrana celular e indicativo de toxicidade (Kumar; Nagarajan; Uchil, 2018).

Figura 4. Resultado do ensaio de LDH



Os compostos Semicarbazona isatina (Itn) e Semicarbazona Isaprop (Ipp) apresentaram baixa citotoxicidade nas células de linhagem Vero CCL81 (n=5) (A-C), HEPG2 (n=5) (D-F), H1299 (n=5) (G-I) e THP-1 (n=5) (J-L). A concentração de Lactato Desidrogenase (LDH) [U/L] foi medida nas células de linhagem após 24 horas, 48 horas e 72 horas de cultivo. O controle negativo (Cneg) não recebeu tratamento, enquanto o controle positivo (Ctt) foi tratado com 0,01% de Triton. Também foram avaliados tratamentos com 0,05% de DMSO (Cdm), 15 μM de dexametasona (Cdx15), 30 μM de dexametasona

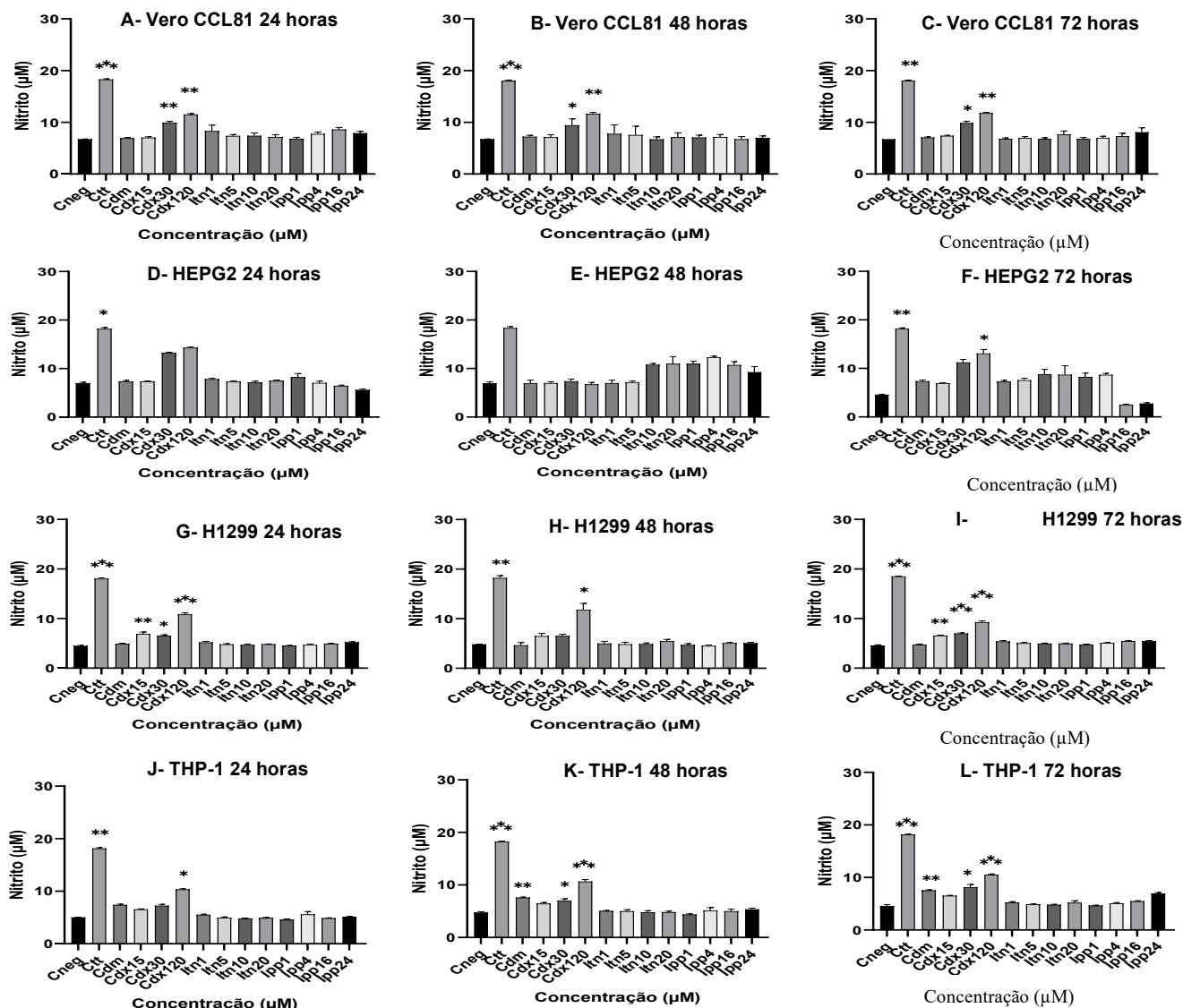
(Cdx30), 120 μ M de dexametasona (Cdx120), e diferentes concentrações dos compostos sintéticos Semicarbazona Isatina: 1 μ M (Itln1), 5 μ M (Itln5), 10 μ M (Itln10), 20 μ M (Itln20) e Semicarbazona Isaprop: 1 μ M (Ipp1), 4 μ M (Ipp4), 16 μ M (Ipp16) e 24 μ M (Ipp24). Os resultados são expressos como mediana e percentis 25°/75°. *P < 0,05, **P < 0,005, ***P < 0,0005, em comparação ao controle negativo.

Os compostos Semicarbazona-ISATINA e Semicarbazona-ISAPROP apresentaram baixa citotoxicidade nas linhagens celulares Vero CCL81, HepG2, H1299 e THP-1, conforme a análise de LDH após 24, 48 e 72 horas de tratamento. Na linhagem Vero CCL81 todas as concentrações de Semicarbazona-ISATINA e Semicarbazona-ISAPROP foram as mais próximas dos valores do controle negativo, o que sugere que essa concentração não causa danos celular (Figura 4A-C). O mesmo padrão foi observado na linhagem HepG2, na qual todas as concentrações de Semicarbazona-ISATINA e Semicarbazona-ISAPROP se mantiveram próximas ao controle negativo (Figura 4D-F). Ao observar a linhagem H1299, todas as concentrações de Semicarbazona-ISATINA mantiveram-se próximas ao controle negativo. Para Semicarbazona-ISAPROP, as concentrações próximas ao controle negativo foram 1 μ M, 16 μ M e 24 μ M (Figura 4G-I). Na linhagem THP-1, todas as concentrações de Semicarbazona-ISATINA e Semicarbazona-ISAPROP foram próximas ao controle negativo (Figura 4J-L).

Além da avaliação do LDH, avaliamos a produção de NO, pois buscamos entender se os compostos poderiam estimular algum nível de ativação nas células. Para isso, usamos o ensaio de Griess, que mede a produção de óxido nítrico (NO), por meio da detecção de nitrito no meio de cultura.

Neste estudo, células das linhagens HepG2, Vero CCL81, THP-1 e H1299 foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos Semicarbazona Isatina e Semicarbazona Isaprop, com o objetivo de avaliar a produção de NO e sua possível associação com a citotoxicidade. Na Vero CCL81 todas as concentrações de Isatina e Isaprop, apresentaram níveis de NO semelhante ao controle negativo (Figura 5A-C). Na HepG2, os valores próximos ao controle negativo foram observados 1 μ M e 5 μ M de Isatina, e 16 μ M e 24 μ M de Isaprop (Figura 5D-F). Para a linhagem H1299, todas as concentrações de Isatina e Isaprop, também se aproximaram dos valores do controle negativo (Figura 5G-I). Já na THP-1, todas as concentrações de Isatina e Isaprop, apresentaram resultados similares ao controle (Figura 5J-L).

Figura 5. Resultado do ensaio de GRIESS



Os compostos Semicarbazona isatina (Itn) e Semicarbazona Isaprop (Ipp) apresentaram baixos níveis de liberação de Óxido Nítrico (NO) nas células de linhagem Vero CCL81 (n=5) (A-C), HEPG2 (n=5) (D-G), H1299 (n=5) (G-I) e THP-1 (n=5) (J-L). A concentração de Óxido Nítrico foi medida nas células de linhagem após 24 horas, 48 horas e 72 horas de cultivo. O controle negativo (Cneg) não recebeu tratamento, enquanto o controle positivo (Ctt) foi tratado com 0,01% de Triton. Também foram avaliados tratamentos com 0,05% de DMSO (Cdm), 15 µM de dexametasona (Cdx15), 30 µM de dexametasona (Cdx30), 120 µM de dexametasona (Cdx120), e concentrações dos compostos sintéticos Isatina (Itn): 1 µM (Itn1), 5 µM (Itn5), 10 µM (Itn10), 20 µM (Itn20) e Semicarbazona Isaprop: 1 µM (Ipp1), 4 µM (Ipp4), 16 µM (Ipp16) e 24 µM (Ipp24). Os resultados são expressos como mediana e percentis 25º/75º. *P<0,05, **P<0,005, ***P<0,0005 em comparação ao controle negativo.

4 DISCUSSÃO

Os resultados do ensaio de plaque é um ensaio piloto, porém evidenciaram que os compostos ISAPROP e ISATINA têm potencial para inibir a replicação do SARS-CoV-2, reduzindo o número de partículas virais infectivas. Esse achados são importantes, pois demonstram que ambos os compostos atuam de maneira direta sobre o vírus, em um modelo experimental clássico e confiável para medir infectividade viral (I. Morsy et al., 2024).

Para que os dados obtidos no ensaio de plaque tivessem relevância biológica, era essencial garantir que a redução da replicação viral não fosse simplesmente consequência de toxicidade celular, mas ainda é necessário aprofundar a pesquisa e amplificar o número amostral. Dessa forma, seguimos para o ensaio de LDH, que foi fundamental permitindo avaliar a integridade das células na ausência de infecção viral. Observou-se que, mesmo com diferentes concentrações e períodos de exposição, tanto Semicarbazona-ISAPROP quanto Semicarbazona-ISATINA não provocaram liberação significativa de LDH nas linhagens testadas, uma vez que se mantiveram próximos do controle negativo, confirmando um perfil de baixa citotoxicidade. Esse resultado mostra que os compostos não comprometem a viabilidade celular, um critério indispensável para qualquer candidato antiviral (Schmidt et al., 2018).

Além de confirmar a segurança celular, queríamos entender se os compostos poderiam ativar respostas celulares. A produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada pelo ensaio de Griess, que foi feito em ausência de vírus, e os resultados mostraram que Semicarbazona-ISATINA e Semicarbazona-ISAPROP não aumentaram significativamente a liberação de NO. Isso indica que os compostos não desencadeiam uma ativação inflamatória exacerbada nas células em condições basais, o que é bom do ponto de vista terapêutico. Considerando que níveis elevados de NO podem levar a estresse oxidativo e danos celulares, a ausência de aumento neste marcador reforça a segurança inicial desses compostos (V. Pinto et al., 2020).

Quando analisamos o conjunto de resultados, observamos que os ensaios se complementam. O ensaio de plaque mostrou que os compostos têm efeito antiviral promissor, principalmente quando observamos os resultados de plaque com a Cepa A de SARS-COV-2, onde tivemos uma boa redução das partículas virais infecciosas, enquanto os ensaios de LDH e Griess demonstraram que essa ação não está associada a toxicidade ou a ativação celular descontrolada.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho indicaram que os compostos Semicarbazona-ISATINA e Semicarbazona-ISAPROP apresentam potencial antiviral frente ao SARS-CoV-2, com redução no número de partículas virais infecciosas observada nos ensaios de plaque, sugerindo uma possível ação direta sobre o vírus. No entanto, não houve significância estatística, sendo necessário aumentar o número amostral para confirmação dos efeitos observados.

A avaliação de citotoxicidade também foi essencial para validar a segurança desses compostos. Nos ensaios de LDH, realizados sem infecção viral, observou-se que tanto Semicarbazona-ISATINA quanto Semicarbazona-ISAPROP mantiveram a integridade celular mesmo em diferentes concentrações e tempos de exposição, indicando baixa toxicidade. Esse resultado comprova que os compostos não comprometem a viabilidade das células e possuem um perfil de segurança compatível com o uso terapêutico.

Além disso, o ensaio de Griess mostrou que Semicarbazona-ISATINA e Semicarbazona-ISAPROP não induziram aumento na produção de óxido nítrico (NO), indicando que não promovem ativação inflamatória nas células em condições basais. Esse achado reforça ainda mais a segurança dos compostos, uma vez que o excesso de NO pode estar associado a processos de estresse oxidativo e danos celulares.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que os compostos avaliados apresentaram baixa citotoxicidade nas linhagens celulares testadas, reforçando sua segurança em condições não infecciosas. A análise por meio do ensaio de liberação de LDH confirmou a integridade das membranas celulares após o tratamento, enquanto o ensaio de Griess mostrou que os níveis de óxido nítrico permaneceram semelhantes aos do controle negativo, indicando que os compostos não induzem ativação inflamatória nas células. Esses achados evidenciam que os efeitos antivirais observados nos ensaios de plaque não estão relacionados a toxicidade ou ativação celular indesejada. Dessa forma, os resultados de Semicarbazona-ISATINA e Semicarbazona-ISAPROP sugerem que eles podem apresentar eficácia antiviral combinada com segurança celular, consolidando seu perfil como candidatos promissores para futuras investigações.

6 REFERENCIAS

1. BERALDO, Heloisa. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. **Química Nova**, v. 27, p. 461–471, jun. 2004.
2. CASCELLA, Marco *et al.* Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19). *In: StatPearls [Internet]. [S.l.]: StatPearls Publishing, 2023.*
3. CEVIK, M.; BAMFORD, C. G. G.; HO, A. COVID-19 pandemic-a focused review for clinicians. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 26, n. 7, p. 842–847, jul. 2020.
4. **Combinação dos antivirais nirmatrelvir e ritonavir é mantida para o tratamento da Covid-19.** Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2024/marco/combinacao-dos-antivirais-nirmatrelvir-e-ritonavir-e-mantida-para-o-tratamento-da-covid-19>>. Acesso em: 23 set. 2024.
5. CONNORS, Jean M.; LEVY, Jerrold H. Thromboinflammation and the hypercoagulability of COVID-19. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 18, n. 7, p. 1559–1561, jul. 2020.
6. **Coronavírus Brasil.** Disponível em: <<https://covid.saude.gov.br/>>. Acesso em: 22 set. 2024.
7. **COVID-19 deaths | WHO COVID-19 dashboard.** Disponível em: <<https://data.who.int/dashboards/covid19/cases>>. Acesso em: 22 set. 2024.
8. CRUZ-FIERRO, Norma *et al.* COVID-19: the impact on oral health care. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 27, p. 3005–3012, 22 jul. 2022.
9. DA COSTA, Rafael Lessa *et al.* Acute kidney injury in patients with Covid-19 in a Brazilian ICU: incidence, predictors and in-hospital mortality. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 43, n. 3, p. 349–358, 2021.
10. HU, Ben *et al.* Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 141, 6 out. 2020.

11. I. MORSY, Alaa R. *et al.* Antiviral activity of pyrazole derivatives bearing a hydroxyquinoline scaffold against SARS-CoV-2, HCoV- 229E , MERS-CoV, and IBV propagation. **RSC Advances**, v. 14, n. 38, p. 27935–27947, 2024.
12. KUMAR, Priti; NAGARAJAN, Arvindhan; UCHIL, Pradeep D. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 6, p. pdb.prot095497, jun. 2018.
13. **Mecanismos de entrada do SARS-CoV-2 nas células - PMC**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8491763/>>. Acesso em: 23 set. 2024.
14. MESQUITA, Cláudia Moreira de. Síntese de derivados isatínicos como potenciais inibidores de corrosão do aço-carbono para aplicação na indústria de petróleo e gás. 19 set. 2019.
15. MOHAMADIAN, Malihe *et al.* COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. **The Journal of Gene Medicine**, v. 23, n. 2, p. e3303, 2021.
16. MONTEIL, Vanessa *et al.* Inhibition of SARS-CoV-2 Infections in Engineered Human Tissues Using Clinical-Grade Soluble Human ACE2. **Cell**, v. 181, n. 4, p. 905- 913.e7, 14 maio 2020.
17. NULL, null. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 8, p. 693–704, 24 fev. 2021.
18. **Paxlovid: remédio da Pfizer contra a Covid começa a ser vendido nas farmácias e custa mais de R\$ 4 mil | Saúde | G1**. Disponível em: <<https://g1.globo.com/saude/noticia/2023/01/11/paxlovid-remedio-da-pfizer-contra-a-covid-comeca-a-ser-vendido-nas-farmacias-e-custa-mais-de-r-4-mil.ghml>>. Acesso em: 23 set. 2024.
19. PERLMAN, Stanley; NETLAND, Jason. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 7, n. 6, p. 439–450, 2009.

20. Remdesivir and three other drugs for hospitalised patients with COVID-19: final results of the WHO Solidarity randomised trial and updated meta-analyses. **Lancet (London, England)**, v. 399, n. 10339, p. 1941–1953, 21 maio 2022.
21. SCHMIDT, Jacob *et al.* Novel zinc- and silicon-phthalocyanines as photosensitizers for photodynamic therapy of cholangiocarcinoma. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 42, n. 1, p. 534–546, 1 ago. 2018.
22. SHANG, Jian *et al.* Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. **Nature**, v. 581, n. 7807, p. 221–224, maio 2020.
23. SILVA, Bárbara V. Isatin, a versatile molecule: studies in Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, p. 707–720, maio 2013.
24. TAO, Kaiming *et al.* SARS-CoV-2 Antiviral Therapy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 34, n. 4, p. e00109-21, [S.d.].
25. V. PINTO, Rosana *et al.* A Comparison of Different Approaches to Quantify Nitric Oxide Release from NO-Releasing Materials in Relevant Biological Media. **Molecules**, v. 25, n. 11, p. 2580, jan. 2020.
26. VARPE, Bhushan D. *et al.* Isatin Hybrids and Their Pharmacological Investigations. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 10, p. 1182–1225, [S.d.].
27. WANG, Ke *et al.* CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, p. 283, 4 dez. 2020.
28. WIERSINGA, W. Joost *et al.* Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. **JAMA**, v. 324, n. 8, p. 782–793, 25 ago. 2020.
29. XIONG, Mi; LIANG, Xue; WEI, You-Dong. Changes in blood coagulation in patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. **British Journal of Haematology**, v. 189, n. 6, p. 1050–1052, jun. 2020.