

PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO P34 ATUA SOBRE ENVELOPE DO HERPESVÍRUS VÍRUS BOVINO TIPO 1 E RECEPTORES PRESENTES NAS CÉLULAS MDBK

**CASTRO, CLARISSA CAETANO DE¹; SILVA, DÉBORA SCOPEL E²;
FERNANDES, MAUREEN HOCH VIEIRA³; CORRÊA, RAYRA ALMEIDA³; MOTTA,
AMANDA DE SOUZA DA⁴; HÜBNER, SILVIA DE OLIVEIRA⁵**

¹ *Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Veterinária – Laboratório de Virologia e Imunologia Animal/ LabVir - clarissac.decastro@gmail.com*

² *Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Veterinária – Laboratório de Virologia e Imunologia Animal/ LabVir*

³ *Bolsistas de Iniciação Científica do Laboratório de Virologia e Imunologia Animal/ LabVir*

⁴ *Instituto de Ciências Básicas da Saúde - Departamento de Microbiologia – UFGRS*

⁵ *Professora Adjunta da Disciplina de Imunologia/ Faculdade de Veterinária – sohubner@yahoo.com.br*

1. INTRODUÇÃO

Várias pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos antivirais têm sido realizadas com base em substâncias sintéticas, mas grandes esforços têm sido conduzidos para avaliar a potencial atividade antiviral de produtos naturais, a fim de isolar e caracterizar novos compostos, os quais poderiam inibir a replicação viral ou servir como modelo de novas moléculas (JENSSEN et al., 2006). Neste contexto a pesquisa, a purificação e a caracterização química, biológica e estrutural de novas substâncias antimicrobianas provenientes da fauna e flora brasileira são valiosas. Algumas substâncias antimicrobianas são peptídeos que têm sido isolados a partir de diversas espécies vivas, incluindo bactérias, fungos, insetos, moluscos, crustáceos, aracnídeos, plantas, pássaros, anfíbios, peixes e mamíferos. Alguns destes peptídeos também têm demonstrado potencial para tratamento antiviral (ANDREU; RIVAS, 1999; JENSSEN et al., 2006).

Recentemente foi pesquisada a presença de atividade antimicrobiana entre várias linhagens bacterianas isoladas da região Amazônica, na busca de novos produtos naturais que possam ser desenvolvidos para o tratamento de doenças infecciosas (MOTTA et al., 2004). Uma bactéria produtora de atividade antimicrobiana foi isolada do conteúdo intestinal do peixe Piau-com-pinta (*Leporinus sp.*) e foi identificada como *Bacillus* sp. linhagem P34. A partir dessa linhagem foi isolado e caracterizado um peptídeo com atividade antimicrobiana (P34) frente a diferentes bactérias deteriorantes e patogênicas (MOTTA et al., 2007).

Estudos realizados pelo nosso grupo evidenciaram também uma grande capacidade de supressão exercida pelo peptídeo P34 sobre herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) (MEDEIROS et al. 2010) e outros vírus, *in vitro* (SCOPEL et al. 2011). A atividade antiviral dos peptídeos antimicrobianos frequentemente parece estar relacionada ao processo de adsorção e penetração viral, ou é o resultado de um efeito direto que leva à inativação viral. Contudo há descrições de atuações durante estágios de replicação viral (JENSSEN et al., 2006). Alguns peptídeos demonstraram capacidade de inibir a infecção viral, bloqueando a adsorção nas células suscetíveis ou penetração. Segundo SHIEH (1992), alguns peptídeos podem reduzir infecções virais ao interagir com o sulfato de heparina, um importante glicosaminoglicano encontrado em todos os tipos de tecidos e sobre a superfície celular, capaz de se ligar em pequenos cátions, proteínas, enzimas, fatores de

crescimento, citocinas, e quimocinas. Por vezes, peptídeos antimicrobianos atuam diretamente no transporte intracelular (COLE et al., 2002).

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o mecanismo de atuação do peptídeo antimicrobiano P34 frente ao BoHV-1, buscando verificar capacidade de inativação do vírus e ligação em receptores presentes em células *Madin-Darby Bovine Kidney* (MDBK).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os testes foram feitos em cultivos de células MDBK realizados em microplacas de fundo chato com 96 cavidades, suplementadas com meio essencial mínimo com sais de Eagle (E-MEM; Invitrogen) contendo 10% de soro fetal bovino (Invitrogen). As células foram mantidas a 37° C com 5% de CO₂. Todas as avaliações foram feitas em triplicata.

Competição com receptores celulares foi avaliada mediante incubações nas células confluentes: foram adicionados por 1 h a 37° C somente vírus (100 doses infectantes/DI), ou vírus (100 DI) e o P34 na diluição não tóxica à célula, ou somente o P34 (1/460). Após, as células foram lavadas com E-MEM e adicionado 100 µl de E-MEM. Onde havia sido adicionado somente o P34 após a lavagem foi colocado 100 DI do BoHV-1 por 1 h, após foi feita nova lavagem e, por fim, adicionado E-MEM. As microplacas foram deixadas em estufa por um período de 48 horas. Ao término deste período, foram realizadas titulações destas amostras.

Foi também verificada capacidade de inibição da produção de partículas virais. O vírus (100 DI) foi adicionado ao cultivo de células por 1 h em estufa a 37° C contendo 5% de CO₂ e, após a retirada com E-MEM o cultivo celular foi tratado ou não tratado com o peptídeo P34. Após incubação de 24 e 48 horas foram realizadas titulações virais.

Para avaliar atuação na penetração do peptídeo P34 na monocamada celular foi adicionado vírus (100 DI) por 4 horas a 4° C para permitir a ligação do vírus nos receptores celulares. Após lavagem, o P34 foi adicionado e as células colocadas por 10 min a 37° C, para permitir a penetração viral. Em seguida, foi adicionado tampão fosfato-salino (PBS; pH 3) para inativar o vírus que não penetrou nas células e por fim foi adicionado E-MEM. As células foram mantidas por 3 dias a 37° C e então realizadas as titulações.

Todas as titulações virais foram feitas pelo método de diluição final, em base logarítmica de 10, entre 10⁻¹ e 10⁻⁷ conforme descrito por Behrens e Kärber (1935). O título foi determinado como dose infectante em 50% de tecido celular (TCID₅₀/100µl). A leitura do título viral foi feita tendo como base a ausência ou presença de efeito citopático, verificado em microscópio invertido.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

No teste de competição com receptores os títulos virais apresentados (média) foram significativamente reduzidos quando houve a presença do P34. A adição apenas do vírus produziu um título de 10^{2,25} TCID₅₀/100µl após 48 horas. Quando foi adicionado o P34 por 1h e posteriormente o vírus por 1h, o título foi de 10^{0,75} TCID₅₀/100µl e, quando vírus e P34 foram adicionados às células simultaneamente, não houve título, ou seja, não foi visualizado efeito citopático nas células. Esses resultados indicam que o peptídeo P34 liga-se ao vírus e a receptores celulares.

No teste de inibição da produção de partículas virais, após adição do peptídeo em células já infectadas, o título do BoHV-1 na ausência do peptídeo P34 foi de $10^{2.5}$ TCID₅₀/100µl em 24 horas e 10^4 TCID₅₀/100µl em 48 horas e, na presença do peptídeo P34 não foi observado efeito do vírus sobre as células tanto em 24 como em 48 horas de incubação. O referido teste indica que o P34 também exerce efeito antiviral após a penetração do vírus, possivelmente devido ao bloqueio de receptores de células ainda não infectadas exercido pelo P34.

No teste de inibição de penetração a média dos títulos do BoHV-1 sem a presença do P34 foi de $10^{1.5}$ TCID₅₀/100µl e com a adição do P34 não houve penetração do vírus nas células. Desse modo, o resultado sugere que o P34 liga-se ao vírus, provavelmente em locais diferentes do local de adsorção e/ou liga-se em receptor celulares que impeçam a penetração do vírus.

4. CONCLUSÕES

O peptídeo antimicrobiano P34 demonstrou atuação mediante ligação no BoHV-1 e em receptores celulares, diminuindo ou inibindo a infecção do vírus nas células MDBK.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREU, D.; RIVAS, L. Animal antibacterial peptides: an overview. **Biopolymers (Peptide Science)**, Michigan, v. 47, p.415-433, 1999.

BEHRENS, B.; KÄRBER, C. Wie sind reihenversuche für biologische auswertungen am zweckmassigsten anzuvordnen. **Arch. Exp. Path. Pharmacol**, v. 177, p. 379-388, 1935.

COLE, A.; MHONG, T.; BOO, L.M.; NGUYEN, T.; ZHAO, C.; BRISTOL, G.; ZACK, J.A.; WARING, A.J.; YANG, O.O.; LEHRER, R.I. Retrocyclin: a primate peptide that protects from infection by T and M tropic strains of HIV-1. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v. 99, p. 1813-1818, 2002.

HÜBNER, S. O.; OLIVEIRA, A. P.; FRANCO, A. C.; ESTEVES, P.A.; SILVA, A.D.; SPILKI, F.R.; RIJSEWIJK, F.A.M.; ROEHE, P.M. Experimental infection of calves with a gl, gE, US9 negative bovine herpesvirus type 5. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 28, n. 3, p. 187-196, 2005.

HÜBNER, S. O.; WEIBLEN, R.; SILVA, A. M.; MORAES, M. P. Evolução da imunidade passiva contra o Herpesvírus Bovino Tipo 1. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 26, n. 3, p. 435-439, 1996.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R.E.W. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 19, n.3, p.491-511, 2006.

MEDEIROS, D.M; SANT'ANNA, V.; BRANDELLI, A.; MOTTA, A. S.; FINGER, O. F.; FISCHER, G.; VARGAS, G. D.; HÜBNER, S. O. Determination of suppressive activity of the antimicrobial peptide P34 isolated from a Bacillus strain of the aquatic Amazon region on Herpesvirus. In: **XXI Encontro Nacional de Virologia**, Gramado, 2010.

MOTTA, A.S.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the Amazon basin. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 307-310, 2004.

MOTTA, A. S.; LORENZINI, D. M.; BRANDELLI, A. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by a novel *Bacillus* sp. Isolated from the Amazon Basin. **Current Microbiology**, v. 54, p. 282-286, 2007.

SCOPEL, D.; CASTRO, C.C.; SILVA, F.S.; MEDEIROS, D.M.; MOTTA, A.S.; HÜBNER, S.O. Avaliação da atividade virucida de um peptídeo antimicrobiano (p34) produzido por uma linhagem de *bacillus* sp sobre o vírus da arterite equina. In: **XIV Encontro de Pós-Graduação UFPel**, Pelotas, 2011.

SHIEH, M.T.; WUDUNN, D.; MONTGOMERY, R.I.; ESKO, J.D.; SPEAR, P.G. Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparin sulfate proteoglycans. **Journal Cell Biology**, New York, v.116, p. 1273-1281, 1992.