

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE SUPRESSORA DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO P34 ISOLADO DE UMA LINHAGEM DE *BACILLUS* DO AMBIENTE AQUÁTICO DA REGIÃO AMAZÔNICA SOBRE HERPESVÍRUS

MEDEIROS, Daiana; CASTRO, Clarissa Caetano de; SCOPEL, Débora; MOTTA, Amanda de Souza; HÜBNER, Silvia de Oliveira

Centro de Pesquisa em Virologia e Imunologia Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – UFPel – CP 354 – 96010-900 – Pelotas – RS – Brasil.

1. INTRODUÇÃO

Em contraste com a vasta quantidade de medicamentos antibacterianos e antifúngicos encontrados, a utilização de fármacos antivirais é ainda limitada. Peptídeos antimicrobianos são substâncias protéicas isoladas de diversas espécies vivas, que apresentam amplo espectro de atividade contra bactérias, fungos e parasitas, e recentemente têm demonstrado potencial para tratamento antiviral. O peptídeo antimicrobiano P34, produzido por uma linhagem de *Bacillus* sp., isolada do conteúdo intestinal do peixe Piau-com-pinta (*Leporinus* sp.) proveniente da região Amazônica, vem sendo estudado quanto as suas propriedades antimicrobianas (MOTTA *et al.*, 2004). Representantes de todas as classes estruturais de peptídeos têm apresentado capacidade para inibir infecção viral (JENSSEN *et al.*, 2006). A habilidade para atuar contra infecções virais são direcionadas principalmente para vírus envelopados, independente de genoma DNA ou RNA, embora tenha sido detectada ação contra alguns vírus não envelopados, como adenovírus e calicivírus felino (JENSSEN *et al.*, 2006).

Alguns grupos de vírus possuem características biológicas específicas, alvos da atuação de antivirais, tais como os representantes da família *Herpesviridae*, que contém em sua estrutura as enzimas timidina quinase (TK) e a DNA polimerase, envolvidas na síntese dos ácidos nucleicos virais. Segundo COEN e RICHMAN (2007), dentre os fármacos que possuem ação inibitória sobre a replicação dos herpesvírus, os mais utilizados em medicina humana são os análogos de nucleosídeos, que atuam interferindo com a replicação do DNA ao impedir a incorporação dos novos nucleotídeos necessários para a síntese da cadeia de DNA viral. A ocorrência de alterações em nucleotídeos que conduzam a substituição de aminoácidos em uma proteína é capaz de conferir resistência às drogas, portanto a descoberta de novos inibidores antivirais que atuem por mecanismos distintos se torna necessária.

No presente estudo avaliou-se *in vitro* a toxicidade do peptídeo P34 em cultura de células renais de bovinos denominada *Madin Darby Bovine Kidney* (MDBK), e a capacidade supressora do peptídeo P34 frente ao herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), um importante agente causador de problemas respiratórios e reprodutivos em bovinos (HÜBNER, *et al.*, 1996; 2005).

2. METODOLOGIA

Para a determinação da citotoxicidade do peptídeo foram cultivadas monocamadas de células da linhagem MDBK em placas de poliestireno com 96 cavidades, contendo meio essencial mínimo com sais de Earle (MEM; Invitrogen) e 10 % de soro fetal bovino (Invitrogen). Após incubação das placas a 37°C com 5% de CO₂ durante 24 horas, foram adicionadas diluições de 1/80, 1/120, 1/160, 1/200, 1/220, 1/240, 1/260, 1/280 do peptídeo, que foram mantidas por 48 horas a 37°C com 5% de CO₂. Em seguida, as células foram analisadas pela observação microscópica para avaliação de alterações morfológicas e pelo ensaio com vermelho neutro. Para o ensaio, removeu-se o sobrenadante e adicionou-se uma solução de vermelho neutro, um corante capturado somente por células viáveis, a 0,033% por 2 horas a 37°C em ambiente com 5% de CO₂. Procedeu-se então a remoção do meio contendo o corante e, após lavagem das células com MEM, foram adicionados 100µl/cavidade de uma solução contendo 50% (v/v) de etanol e 1%(v/v) de ácido acético para solubilização. A placa foi devidamente agitada por 10 min, e a leitura das densidades ópticas foi medida num espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. Foi calculada a porcentagem de células viáveis mediante a fórmula $AT/AC \times 100$, sendo AT e AC a absorbância dos tratados e a absorbância dos controles, respectivamente.

Para a determinação da atividade supressora do peptídeo sobre o herpesvírus bovino, uma amostra do vírus BoHV-1/cepa LA foi titulada em MDBK para determinar a dose infectante em 50% de tecido celular (TCID₅₀) na presença ou ausência do peptídeo. Também foi analisada a ação virucida sobre o vírus, mediante avaliação após incubação do peptídeo P34 com o BoHV-1 a 4°C, 20°C e 37°C por 6 horas e a 37°C por 12 e 24 horas; e a reversibilidade do efeito antiviral foi avaliada por 24 e 48 horas nas células tratadas com a substância antimicrobiana.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adição do peptídeo P34 causou uma diminuição da viabilidade celular proporcional às concentrações testadas. No entanto, a diluição 1/280 do peptídeo em células MDBK não alterou a viabilidade celular quando visualizados por microscopia invertida. No ensaio com vermelho neutro, obteve-se 91% de viabilidade celular.

Na avaliação da ação supressora do peptídeo frente ao BoHV-1 foi observado que a adição da substância na concentração não citotóxica teve efeito durante a multiplicação do vírus, reduzindo o título de $10^{5,25}$ TCID₅₀/25 µl para 10^3 TCID₅₀/25 µl de BoHV-1. Esse resultado confirmou a ação antiviral do P34 sobre o BoHV-1, e os próximos estudos visarão determinar o mecanismo de ação do peptídeo sobre esse vírus.

Não foi observado ação virucida contra o BoHV-1 quando incubado nas condições de temperatura e tempo citados acima. No teste de reversibilidade do efeito antiviral após adição do peptídeo em células já infectadas, os resultados encontrados foram muito interessantes, pois foi detectada reversão do título viral. Sem a utilização do peptídeo o título do BoHV-1 foi de $10^{2,5}$ TCID₅₀/25 µl em 24 horas e 10^4 /TCID₅₀25 µl em 48 horas e na presença do peptídeo P34 não foi observado efeito do vírus sobre as células nas 24 e 48 horas. Mais testes serão realizados para aprofundar a atuação desta substância sobre o BoHV-1.

4. CONCLUSÃO

Os resultados preliminares indicam atividade antiviral do peptídeo P34 sobre o BoHV-1 justificando a continuação da realização de estudos complementares para maiores esclarecimentos sobre o mecanismo de ação desta substância em relação a este vírus. O potencial antiviral deste peptídeo poderá servir como modelo para avaliação de seu uso no tratamento de outras infecções virais, visando principalmente os herpesvírus.

5. REFERÊNCIAS

COEN, D. M.; RICHMAN, D. D. Antiviral Agents. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. Fields Virology, 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. Cap. 14, p. 447-479.

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

HÜBNER, S. O., OLIVEIRA, A. P., FRANCO, A. C. et al. Experimental infection of calves with a gI, gE, US9 negative bovine herpesvirus type 5. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, v. 28, n. 3, p. 187-196, 2005.

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

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