

EFEITO DO PEPTÍDEO P34 SOBRE A PRODUÇÃO DO VÍRUS DA ARTERITE EQUINA *IN VITRO*

**FERNANDES, M. H. V.¹; SCOPEL, D.¹; CASTRO, C. C.¹; ALMEIDA, R. C.¹;
MOTTA, A. S.²; HÜBNER, S. O.¹**

¹Centro de Pesquisa em Imunologia e Virologia Animal, Faculdade de Veterinária, UFPel, Pelotas/RS, Brasil; ² ICBS/Departamento de Microbiologia, UFRGS, Porto Alegre/RS, Brasil.
maureenhvfernandes@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

A produção de peptídeos endógenos pelos seres vivos faz parte de uma série de mecanismos de defesa que interagem para formar uma resposta contra um agente agressor. A primeira resposta formada, chamada inata, ocorre logo que o microrganismo patogênico entra em contato com o hospedeiro, e nessa linha de defesa, os peptídeos desempenham um papel essencial, agindo como antimicrobianos e mediando algumas funções para combater o agente infeccioso (BALS, 2000). Esses peptídeos têm sido isolados de uma grande variedade de organismos, invertebrados e vertebrados, desde plantas, bactérias, até mamíferos, incluindo humanos, e são relativamente pequenos (<10 kDa), catiônicos e variam em comprimento, sequência e estrutura (JENSSEN, 2006; REDDY, 2004).

Em pesquisas realizadas na Bacia Amazônica, foram isoladas diversas bactérias produtoras de alguma atividade antimicrobiana e, dentre elas, foi encontrada no conteúdo intestinal do peixe Piau-com-pinta (*Leporinus sp.*) uma nova espécie de *Bacillus*, capaz de produzir um peptídeo que apresentou atividade inibitória contra diversos agentes patogênicos, inclusive *Listeria monocytogenes* (MOTTA et al., 2004). Esse peptídeo foi purificado e denominado P34, seu peso molecular foi determinado por eletroscopia de massas como 1456 Da e ele se apresentou relativamente estável ao calor e sensível às enzimas proteolíticas (MOTTA et al., 2007). Estudos recentes indicam a ação do peptídeo P34 como agente antiviral, agindo sobre o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), sendo detectada a diminuição do título viral (MEDEIROS et al., 2010), e também exibindo atividade virucida sobre o vírus da arterite equina (SCOPEL et al., 2011).

O vírus da arterite equina (EAV) é um vírus envelopado RNA da família *Arteriviridae*, gênero *Arterivirus*, ordem *Nidovirales* (SNIJDER et al., 1998). O EAV causa uma doença contagiosa nos equídeos, a arterite viral equina. Em geral, a infecção natural apresenta-se na forma subclínica, porém a infecção com manifestações clínicas caracteriza-se por abortos em éguas prenhes, infecção fulminante em neonatos quando associada à pneumonia intersticial ou enterite, doença sistêmica em cavalos adultos e infecção persistente em garanhões, o que contribui para a disseminação do vírus, que se encontra viável no sêmen dos animais (TIMONEY et al., 1993). Apesar de raramente ser fatal para equinos adultos, a arterite viral equina está na lista da OIE (Organização Mundial da Saúde Animal) por causar graves prejuízos econômicos, diretos e indiretos, para alguns setores da produção equina, como os de melhoramento genético e de performance (BELL et al., 2006; HOLYOAK et al., 2008).

O presente estudo teve como objetivo avaliar atividade antiviral do peptídeo antimicrobiano P34 frente ao EAV, buscando sua capacidade de inibir a produção de partículas virais.

2 METODOLOGIA

A avaliação do efeito antiviral do P34 foi avaliada pelo ensaio de inibição de produção de partículas virais. Para tal, células RK13 (Rabbit kidney) foram mantidas em E-MEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Gibco), enrofloxacin (10 mg.ml⁻¹) e anfotericina B (0,025 µg.ml⁻¹) a 37°C em uma incubadora contendo 5 % de CO₂. Células RK13 foram cultivadas em microplacas de 96 cavidades, e após confluência, foram infectadas com 100 TCID₅₀ (doses infectantes para cultivo celular) do EAV diluídos em 100 µl de E-MEM por 1 h a 37°C, após o inóculo ser retirado, as células foram lavadas com E-MEM. O cultivo celular infectado foi tratado ou não com o peptídeo P34 (1,15 µg.ml⁻¹) a 37°C durante 24 h e 48 h. As placas foram congeladas e, após descongelamento foram realizadas as titulações do EAV, conforme descrito por Behrends e Kärber (MAYR et al., 1982). A leitura do título viral foi realizada após 48 horas, em microscópio invertido. Os resultados foram expressos em TCID₅₀/100µl. Todos os testes foram realizados em triplicata. Foi realizada análise estatística pelo teste t de Student para avaliar a significância dos resultados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os peptídeos antimicrobianos são considerados a nova promessa terapêutica por possuírem atividade antimicrobiana contra um grande número de agentes, incluindo muitos já resistentes às drogas tradicionais, e também por exercerem, em sua maioria, uma ação rápida e potente. O ensaio de inibição da produção de partículas virais é considerado uma ótima técnica para avaliação da eficácia de componentes com potencial para agirem como antivirais, sendo considerado, em alguns casos, mais eficiente que o ensaio de redução de placa (PRICHARD et al., 1990). Nas células RK13 infectadas com EAV não tratadas, o título apresentado após 24 horas de incubação foi 10^{3,51} TCID₅₀/100µl, enquanto que nas células tratadas com 1,15µg ml⁻¹ do peptídeo P34 por 24h, houve uma diminuição do título viral para a média de 10^{1,86} TCID₅₀/100µl, conforme pode ser observado na Fig. 1.

No tratamento de 48 horas do peptídeo P34 sobre o cultivo celular infectado, também houve redução do título viral, sendo o título sem o peptídeo de 10^{5,85} TCID₅₀/100µl e na presença do P34 de 10^{2,63} TCID₅₀/100µl. Os resultados quando submetidos à análise pelo teste t de Student mostraram possuir diferença altamente significativa (P < 0.01).

Scopel et al. (2011), ao analisarem o efeito da incubação do peptídeo P34 com o EAV, antes da infecção celular, detectaram efeito virucida, o qual foi dependente do tempo de incubação, sendo que a presença do P34 sob o EAV a 37°C durante 12 horas resultou em uma completa inativação viral. Os resultados encontrados no presente estudo demonstram que o peptídeo antimicrobiano P34 apresenta, além da atividade virucida, uma capacidade de inibir a produção de partículas virais, dependente do tempo de tratamento, tendo maior efeito inibidor quando o EAV é submetido a um período maior de tratamento.

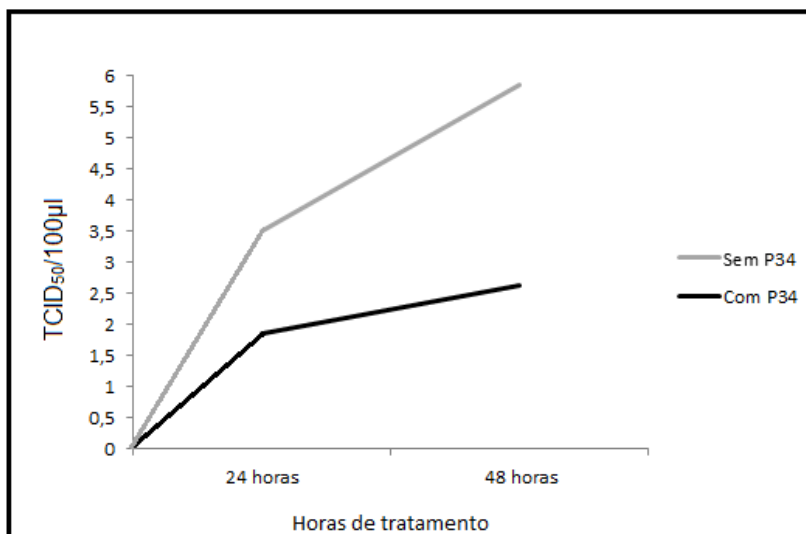


Figura 1 – Titulação do vírus da arterite equina (EAV) submetido ou não ao tratamento com o peptídeo antimicrobiano P34 em células RK13 representada em TCID₅₀/100µl.

4 CONCLUSÃO

Neste estudo, o peptídeo antimicrobiano P34 demonstrou capacidade de inibir a produção de partículas do vírus da arterite equina quando inoculado em células RK13. Para posterior desenvolvimento do peptídeo P34 como possível agente terapêutico antiviral, novos estudos se fazem necessários para a compreensão do mecanismo de ação do peptídeo P34 sobre o EAV e outros vírus que sejam suscetíveis.

5 REFERÊNCIAS

- BALS, R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. **Respiratory Research**, Munich, v.1, n. 3, p. 141–50, 2000.
- BELL, S.A., BALASURIYA, U.B.R., MACLACHLAN, N.J. Equine Viral Arteritis. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 5, p. 233-238, 2006.
- HOLYOAK, G.R.; BALASURIYA, U.B.; BROADDUS, C.C.; TIMONEY, P.J. Equine viral arteritis: current status and prevention. **Theriogenology**, v. 70, p. 403-14, 2008.
- JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 491-511, 2006.
- MAYR, A.; BACHMANN, P. A.; BIBRACK, B. M.; WITHMANN, G. Virologische Arbeitsmethoden - Band IV - Sicherheit bei virologischen arbeiten: Biometrische Methoden. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1982.
- MEDEIROS, D. M. ; SANT ANNA, V. ; BRANDELLI, A. ; MOTTA, A.S ; FINGER, P.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 / V**

ENCONTRO DE VIROLOGIA DO MERCOSUL, 2010, Gramado-RS. XXI Encontro Nacional de Virologia / V Encontro de Virologia do Mercosul, 2010.

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

MOTTA, A.S.; LORENZINI, D.; BRANDELLI, A. Purification and partial characterization of an antibacterial peptide produced by a novel *Bacillus* sp. strain isolated from Amazon basin. **Current Microbiology**, v. 54, p. 282-286, 2007.

PRICHARD M. N.; TURK S. R.; COLEMAN L. A.; ENGELHARDT S. L.; SHIPMAN C. JR.; DRACH J. C. A microtiter virus yield reduction assay for the evaluation of antiviral compounds against human cytomegalovirus and herpes simplex virus type 1. **J. Virol. Methods** v. 28, p. 101–106, 1990.

REDDY, K.V.R.; YEDERY, R.D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, n. 6, p. 536–547, 2004.

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: **XIII ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO UFPEL**, 2011, Pelotas. Anais, Pelotas, 2011.

SNIJDER, E.J.; MEULENBERG J.J. The molecular biology of arteriviruses. **J Gen Virol**, v.79, p. 961-979, 1998.

TIMONEY, P.J.; MCCOLLUM, W.H. Equine viral arteritis. **Vet Clin North Am (Equine Pract)** v. 9, p. 295-309, 1993.