

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Curso de Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso



**Caracterização de lectinas vegetais e avaliação de suas atividades antivirais
frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e herpesvírus bovino tipo 1
(BoHV-1)**

Laura Junqueira de Camargo

Pelotas, 2017

Laura Junqueira de Camargo

Caracterização de lectinas vegetais e avaliação de suas atividades antivirais frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1)

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

Orientador: Prof.Dr.Luciano da Silva Pinto

Orientador de Estágio: Dr.Tony Picoli

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C172 Camargo, Laura Junqueira de

Caracterização de lectinas vegetais e avaliação de suas atividades antivirais frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e herpesvírus bovino tipo 1 (BOHV-1) / Laura Junqueira de Camargo ; Luciano da Silva Pinto, orientadora. — Pelotas, 2017.

79 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Nbanlec. 2. Ael. 3. Virucida. 4. Bohv-1. 5. Bvdv. I. Pinto, Luciano da Silva, orient. II. Título.

CDD : 620.8

Laura Junqueira de Camargo

Caracterização de lectinas vegetais e avaliação de suas atividades antivirais frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 05 de dezembro de 2017

Banca Examinadora:

Prof.Dr.Luciano da Silva Pinto (orientador)
Universidade Federal de Pelotas

Prof.Dr.Geferson Fischer
Universidade Federal de Pelotas

Dra.Caroline Rizzi
Universidade Federal de Pelotas

Dr.Amilton Clair Pinto Seixas Neto
Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a toda minha família, principalmente meus pais Beatriz e Fausto por todo apoio e amor incondicional em todas as etapas de minha vida.

Minhas amigas e amigos de São Paulo e Pelotas que sempre me apoiaram e se fizeram presentes.

A todos amigos que fiz nesses 4 anos de faculdade, em especial a Violetta, Aishe e Yasmine, por todo apoio, amizade e muitas risadas durante todo o curso. Agradeço também a Analu, por todo incentivo e apoio nessa etapa decisiva de minha vida.

Ao meu orientador e professor Luciano, agradeço ao conhecimento que me foi repassado sempre com muita paciência e carinho. Esses anos de convívio foram cruciais para minha formação profissional e pessoal. Agradeço a todos do laboratório de Proteômica e Bioinformática, e a todos que passaram por ele, por toda amizade e companheirismo, em especial a Mara, Rafa, Frederico, Rafael, Amanda, Christian e Amilton.

Ao meu orientador de estágio Tony, por todo conhecimento a mim passado, paciência e disponibilidade, e a todos do laboratório LabVir. Obrigada pelo acolhimento nesses meses de trabalho.

Sem vocês nada disso seria possível, obrigada.

Resumo

CAMARGO, Laura Junqueira. **Caracterização de lectinas vegetais e avaliação de suas atividades antivirais frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1)**. 2017. 77f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

As lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos reversivelmente e essas proteínas são encontradas na natureza em diversos organismos, participando de diversos processos biológicos. Dois vírus de grande importância veterinária são, o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), responsáveis por grandes perdas econômicas a pecuária. Com isso, o objetivo do trabalho foi a caracterização da lectina de quiabo (AEL), lectina de banana nativa (nBanLec) e uma nova versão da lectina de banana recombinante (rBanLec-like), bem como testar a atividade antiviral e virucida das mesmas. As lectinas foram caracterizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e pela técnica de *Western Blot*. As concentrações das lectinas utilizadas nos ensaios antivirais foram baseados nos ensaios de citotoxicidade, através da redução do MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2yl) -2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo). Os ensaios de atividade antiviral foram realizados através da exposição das células às lectinas antes e depois da infecção viral, e avaliadas por redução do MTT e pelo título viral. Já no ensaio virucida, as lectinas foram mantidas incubadas com apenas o vírus por diferentes intervalos de tempo, a 22°C, esta atividade foi avaliada pelo título viral. A nBanLec apresentou potencial antiviral, principalmente quando testada sobre células já infectadas. A concentração de 25 µg/ml de nBanLec permitiu alta viabilidade celular e alto percentual de inibição viral para os dois vírus BVDV e BoHV-1, com um percentual de inibição de 99,98% e 99,68% respectivamente, mostrando um grande potencial antiviral. A lectina do quiabo mostrou ter potencial antiviral, com resultados promissores para os dois vírus, apesar de certa toxicidade observada. Já a lectina rBanlec-like, não teve atividade antiviral esperada, notou-se através do teste de dicroísmo circular e hemaglutinação, que a proteína teve sua conformação alterada, afetando assim sua atividade. Novos métodos são necessários para estudar melhor o mecanismo de ação das lectinas frente aos vírus (principalmente depois da infecção viral), bem como novas expressões precisam ser realizadas a fim de resolver o problema de atividade da rBanLec-like.

Palavras chaves: nBanLec, AEL, virucida, BoHV-1, BVDV.

Abstract

CAMARGO, Laura Junqueira. **Characterization of plant lectins and evaluation of their antiviral activities against bovine viral diarrhea virus (BVDV) and bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1)**. 2017.77f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Lectins are reversible carbohydrate-ligand proteins and they are found in many organisms in nature, participating in a large number of biological processes. Two major's viruses of veterinary importance are, Bovine viral diarrhea virus (BVDV) and Bovine herpes virus-1 (BoHV-1), which are responsible for big livestock economic losses. With all that said, the aim of this work was the characterization of okra lectin (AEL), native banana lectin (nBanLec) and a new version of recombinant banana lectin (rBanLec-like), as well to test the antiviral and virucidal activity of each protein. Lectins were characterized by polyacrylamide gel electrophoresis, and Western Blot technique. Lectins concentrations used on the antiviral tests were based on cytotoxicity test, due to MTT assay (MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Antiviral activity test was performed by exposure of cells to lectins before and after the viral infection, and evaluated by MTT reduction and viral title. Virucidal test were performed through the virus and lectin incubation, at 22°C, this activity was evaluated by viral title. NBanLec lectin showed antiviral potential, especially when tested on infected cells. The 25µg/ml nBanLec concentration allowed a high cell viability and high viral inhibition percentage for both virus, BVDV and BoHV-1, with 99,98% and 99,68% of viral inhibition percentage respectively, showing a great antiviral potential. The okra lectin showed antiviral potential, with promising results, beside some toxicity observed. On the other hand, rBanLec-like lectin didn't show antiviral expected activity, by the circular dichroism and hemagglutination assay, it was possible to notice the protein conformation change, affecting your activity. New methods are required to better study the mechanism of action of lectins against viruses (especially after viral infection), as well as new expressions are needed to solve the rBanLec-like activity problem.

Keywords: nBanLec, AEL, virucidal, BoHV-1, BVDV.

Lista de Figuras

Figura 1A: Processo de expressão e teste de solubilidade da rBanLec-like.....	43
Figura 1B: Processo de purificação da rBanLec-like.....	43
Figura 2A: Processo de purificação das lectinas rBanLec-like, nBanLec e lectina do quiabo.....	45
Figura 2B: Western blotting utilizando como anticorpo primário o anti-rBanLec-like (1:3000) e como secundário anti-IgG de rato conjugado com peroxidase (1:6000)	45
Figura 3A: Dicroísmo circular com as lectinas rBanLec-like e nBanLec, quando solubilizadas em água.....	46
Figura 3B: Dicroísmo circular com as lectinas rBanLec-like e nBanLec quando solubilizadas em tampão.....	46
Figura 4: Teste de hemaglutinação das lectinas vegetais, rBanLec-like, nBanLec e a lectina do quiabo, em eritrócitos de rato (<i>Rattus norvegicus</i>).....	47
Figura 5A: Citotoxicidade da lectina rBanLec-like com diferentes concentrações, em células MDBK.....	48
Figura 5B: Citotoxicidade da lectina nBanLec com diferentes concentrações, em células MDBK.....	48
Figura 5C: Citotoxicidade da lectina do quiabo com diferentes concentrações, em células MDBK.....	49
Figura 6A: Ensaio de atividade antiviral da proteína rBanLec-like frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV) antes da infecção viral.....	50
Figura 6B: Ensaio de atividade antiviral da proteína nBanLec frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV) antes da infecção viral.....	50
Figura 6C: Ensaio de atividade antiviral da lectina do quiabo frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV) antes da infecção viral.....	51
Figura 7A: Ensaio de atividade antiviral da proteína rBanLec-like frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV) depois da infecção viral.....	52
Figura 7B: Ensaio de atividade antiviral da proteína nBanLec frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV) depois da infecção viral.....	52
Figura 7C: Ensaio de atividade antiviral da lectina do quiabo frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV) depois da infecção viral.....	53

Figura 8A: Ensaio de atividade antiviral da proteína rBanLec-like frente ao herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) antes da infecção.....	54
Figura 8B: Ensaio de atividade antiviral da proteína nBanLec frente ao herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) antes da infecção.....	55
Figura 8C: Ensaio de atividade antiviral da lectina do quiabo frente ao herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) antes da infecção.....	55
Figura 9A: Ensaio de atividade antiviral da proteína rBanLec-like frente ao herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) depois da infecção viral.....	56
Figura 9B: Ensaio de atividade antiviral da proteína nBanLec frente ao herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) depois da infecção viral.....	57
Figura 9C: Ensaio de atividade antiviral da lectina do quiabo frente ao herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) depois da infecção viral.....	57
Figura 10A: Atividade virucida da lectina rBanLec-like frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1).....	59
Figura 10B: Atividade virucida da lectina nBanLec frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1).....	60
Figura 10C: Atividade virucida da lectina do quiabo frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1).....	60

Lista de Tabelas

Tabela 1: Percentual de inibição do Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) após atuação da rBanLec-like sobre as células antes e depois da infecção, após 72h.....	58
Tabela 2: Percentual de inibição do Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) após atuação da nBanLec sobre as células antes e depois da infecção, após 72h.....	58
Tabela 3: Percentual de inibição do Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) após atuação da lectina do quiabo sobre as células antes e depois da infecção, após 72h.....	58
Tabela 4: Percentual de inibição do Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em diferentes tempos a 22°C pela rBanLec-like.....	59
Tabela 5: Percentual de inibição do Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em diferentes tempos a 22°C pela nBanLec.....	60
Tabela 6: Percentual de inibição do Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em diferentes tempos a 22°C pela lectina do quiabo.....	61

Lista de Abreviaturas e Siglas

- AEL- Lectina *Abelmochus esculentus*
- ANOVA- Análise de variância
- BoHV-1- Herpesvírus bovino tipo 1
- BVDV- Vírus da diarreia viral bovina
- CD4+- Linfócito T auxiliar
- CD8+- Linfócito T citotóxico
- CO₂- Dióxido de carbono
- CP- Citopatogênica
- CRA- homólogos de quitinases classe V
- DAT- Distúrbio da articulação temporomandibular
- DC- Dicroísmo Circular
- DM- Doença das mucosas
- DNA- Ácido Desoxirribonucleico
- E-MEM- Meio essencial mínimo com sais de Eagle
- EUL- Família da aglutinina de *Galanthus nivalis*
- FITC- Isotiocianato de fluoresceína
- GNA- Família da lectina de *Euonymus europaeus*
- HIV- Vírus da imunodeficiência humana
- HVC- Vírus da hepatite C
- IA- Inseminação artificial
- IBR- Rinotraqueíte infecciosa bovina
- IgG4- Imunoglobulina IgG4
- IL-1 β - Interleucina 1 β
- IL-12- Interleucina 12
- IL-4- Interleucina 4
- IPTG- Isopropil- β -tiogalactosídeo
- LB- Luria Bertani
- LRJ- Lectinas relacionadas à jacalina
- LSD- Diferença mínima significativa
- MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- MCF7- Linhagem celular de câncer de mama humano

MDBK- Linhagem celular de rim de bovino
MOI- Multiplicidade de infecção
MPO- Mieloperoxidase
MR-macrófagos residentes
MTG- macrófagos inflamatórios
MTT- 3-(4,5 dimetiltiazol-2yl) -2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo
NCP- Não citopatogênica
NO- Óxido nítrico
PBS- Tampão fosfato-salino
PCR- Reação em cadeia da polimerase
PI- Percentual de inibição
RNA- Ácido ribonucleico
SDS-PAGE- Eletroforese em gel de poliacrilamida – dodecil sulfato de sódio
TGF- β - Interferon beta
TMV- Vírus do mosaico do tabaco
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
WB- *Western blot*

Sumário

1. Introdução	15
2. Revisão Bibliográfica	17
2.1 Lectinas	17
2.2 Lectina BanLec	19
2.2.1 Atividades biológicas	21
2.3 Lectina do quiabo	25
2.3.1 Atividades biológicas	25
2.4 Vírus	27
2.4.1 Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1)	27
2.4.2 Vírus da diarreia viral bovina (BVDV)	30
3. Objetivos	33
3.2 Objetivos específicos	33
4. Metodologia	34
4.1 Construção <i>in silico</i> da sequência codificadora da lectina rBanLec-like	34
4.2 Clonagem <i>in vitro</i> de rBanLec-like	34
4.3 Expressão e purificação da lectina recombinante	35
4.4 Extração e purificação da BanLec nativa	36
4.5 Obtenção da lectina de quiabo	37
4.6 Caracterização das lectinas por SDS-PAGE e Western blot	37
4.7 Dicroísmo circular	38
4.8 Teste de Hemaglutinação	38
4.9 Meios de cultivo, Lectinas, células e vírus	38
4.9.1 Ensaio de citotoxicidade	39
4.9.2 Titulações Virais	40
4.9.3 Ensaio de atividade antiviral	41
4.9.4 Atividade virucida	42
5. Resultados	43
5.5 Clonagem, expressão e purificação da rBanLec-like	43
5.6 Extração e purificação da nBanLec	43
5.7 Caracterização das lectinas por Western blotting	44
5.8 Dicroísmo circular	45
5.9 Teste de hemaglutinação	46
5.10 Ensaio de citotoxicidade	47
5.11 Ensaio da atividade antiviral frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV)	49
5.11.1 Antes da infecção viral	49

5.11.2 Depois da infecção viral	51
5.12 Ensaio da atividade antiviral frente ao Herpesvírus Bovino (BoHV-1)	53
5.12.1 Antes da infecção viral	53
5.12.2 Depois da infecção viral	56
5.13 Atividade virucida	58
6. Discussão	62
7. Conclusão	66
8. Referências	67
Anexo A	72

1. Introdução

Lectinas são proteínas bioativas que se ligam reversivelmente a carboidratos. Essas proteínas são encontradas na natureza em organismos de diferentes níveis de complexidade, e funcionam no reconhecimento de moléculas em vários processos biológicos. São classificadas em famílias baseado no dobramento de polipeptídios. Uma dessas famílias é conhecida na literatura por lectinas relacionada a Jacalina (LRJs), em que uma de suas representantes é a lectina da *Musa acuminata*, popularmente conhecida como banana. Essa lectina possui afinidade principalmente a manose, tendo seu tamanho com aproximadamente 15 kDa, seu monómero com 30kDa e sua estrutura tetramérica recentemente descoberta com 60kDa, o que também foi comprovado testes prévios do grupo de pesquisa BioPro.

A lectina de banana já demonstrou atividade imunomoduladora, atividade antiproliferativa e atividade antiviral, com ação comprovada sobre o vírus da imunodeficiência humana (HIV), o vírus do mosaico do tabaco (TMV), vírus da Hepatite C (HCV) e vírus da influenza. A sua atividade antiviral foi explorada neste trabalho utilizando uma variante da lectina da banana desenvolvida após análises de sequências de LRJs, obtendo assim a lectina rBanLec-like.

Uma outra lectina com uma ampla e promissora atividade biológica, porém pouco estudada, é a lectina da leguminosa *Abelmoschus esculentus*, popularmente chamada de quiabo. Essa proteína que pertence à família das Malvaceae, de aproximadamente 10,29 kDa e seu dímero com 28,58 kDa, possui atividade antiproliferativa, anti-inflamatória, antifúngica e imunomoduladora, porém não há até então, na literatura estudos que comprovem uma atividade antiviral desta lectina.

O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) pertence à família Herpesviridae, possui como material genético DNA de fita dupla linear, e é capaz de entrar em latência, principalmente nos gânglios trigêmeo e sacral, voltando a se manifestar com situações de estresse. A principal manifestação clínica associada a este vírus é a rinotraqueíte infecciosa bovina, relacionada à sintomatologia respiratória, porém são os sintomas reprodutivos (abortos e infertilidade) que mais geram prejuízos econômicos à pecuária, assim como o vírus da diarreia

viral bovina (BVDV), um pestivírus da família Flaviviridae, que tem seu genoma constituído por uma fita simples de RNA. Este vírus está associado à formação de animais persistentemente infectados que não apresentam sinais clínicos nem anticorpos contra o vírus, dificultando o diagnóstico e disseminando o vírus pelo rebanho. Sendo assim, torna-se importante a busca e pesquisa para obtenção de novas drogas/compostos antivirais. Objetivou-se, assim, avaliar a atividade antiviral das lectinas nBanlec, rBanlec-like e Quiabo contra os vírus BoHV-1 e BVDV.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Lectinas

A palavra “Lectina” vem do latim “legere”, que significa “selecionar”(BOYD; SHAPLEIGH, 1954). Lectinas possuem habilidade de se ligar a carboidratos. Hoje em dia, proteínas que podem aglutinar hemácias, com um açúcar específico conhecido, são chamadas de “lectinas”. O nome “hemaglutininas” é usado quando o açúcar específico é desconhecido. As lectinas e hemaglutininas são proteínas/glicoproteínas, que possuem pelo menos um domínio não catalítico que exibe um ligamento reversível e específico a monossacarídeos ou oligossacarídeos. Elas podem se ligar a determinadas porções de carboidratos na superfície de eritrócitos e aglutina-los sem alterar as propriedades dos mesmos (LAM; NG, 2011).

Essas definições só foram possíveis tempos depois da descoberta, ao acaso, dessas proteínas, em 1888, o cientista alemão Peter Hermann Stillmark que estudava a toxicidade das sementes de mamona (*Ricinus communis*), ao misturar sangue de animais com extrato aquoso dessa planta, observou que as hemácias aglutinavam (FREED, 1985; RÜDIGER; GABIUS, 2001). Esse foi o primeiro relato descrito em literatura das hemaglutininas ou fitoaglutininas, como eram chamadas inicialmente as lectinas (SANSONE et al., 2016).

Lectinas estão presentes em diversos organismos, sendo assim encontradas em animais, plantas e microrganismos (BERG et al., 2002). Nas plantas a interação proteína-carboidrato está envolvida em importantes processos, como em resistência a doenças, simbiose e auto-incompatibilidade. Geralmente se sugere que a maioria das lectinas fazem parte diretamente do reconhecimento ou do processo relacionado a defesa de patógenos externos, como vírus, bactérias, fungos, animais herbívoros e insetos (VANDENBORRE; SMAGGHE; VAN DAMME, 2011; YAMAJI et al., 2012).

De acordo com o domínio de reconhecimento do carboidrato conservado, as lectinas encontradas em plantas podem ser divididas em 12 diferentes subfamílias: A família da aglutinina *Agaricus bisporus*; a família amarantinas; os homólogos de quitinases de classe V (CRA); a família das cianovirina; a família da lectina de *Euonymus europaeus* (EUL); a família da

aglutinina de *Galanthus nivalis* (GNA); a família da Heveína; a família das lectinas relacionadas a jacalina (JRL); a família das lectinas de legumes; domínioLysM, as lectinas com domínios LysM podem ser identificadas como receptores de superfície que medeiam a interação entre bactérias e leguminosas; a família da aglutinina Nictaba de *Nicotiana tabacum* e a família da lectina ricina B (VAN DAMME; LANNOO; PEUMANS, 2008).

A maioria das lectinas necessitam de íons para sua atividade, como Mn^{2+} e Ca^{2+} , sendo essenciais às lectinas de leguminosas, por exemplo (SHARON; LIS, 1990). Além disso, o fator pH pode ser de grande importância para a atividade das lectinas, onde variações no pH podem alterar a capacidade de aglutinar hemácias (SHARON, 2007).

O conhecimento detalhado da estrutura da proteína e da interação estabelecida com os carboidratos é um pré-requisito para a melhor compreensão dos produtos biológicos e físicos de reconhecimento e para o desenvolvimento de processos biotecnológicos e aplicações terapêuticas (ARNAUD; AUDFRAY; IMBERTY, 2013). Baseada na arquitetura global das lectinas de plantas, quatro grupos principais podem ser distinguidos: merolectinas, com apenas um domínio de ligação a carboidrato; hololectinas, com dois ou mais domínios de ligação idênticos; superlectinas, com no mínimo dois domínios de ligação a carboidratos diferentes; e as quimerolectinas, que possuem um ou mais domínios de ligação a carboidratos, sendo que um domínio que exerce atividade biológica independente do domínio de ligação a carboidratos (VANDENBORRE; SMAGGHE; VAN DAMME, 2011). Muitas lectinas isoladas pertencem ao grupo das hololectinas e todos esses grupos possuem a capacidade de aglutinar células exceto as merolectinas que possuem apenas um domínio de ligação a carboidrato (DAMME et al., 1998).

Considerando a diversidade de doenças e agentes infecciosos e suas consequências, o campo biotecnológico vem buscando moléculas “bioreconhecedoras” de fontes naturais ou recombinantes com potencial terapêutico e também, com potencial para diagnóstico, e a chave para uma eficiente detecção, tratamento e cura de condições patológicas é o bioreconhecimento (COELHO et al., 2017). As lectinas, em particular,

interagem com mono ou oligossacarídeos por ligações covalentes, envolvendo pontes de hidrogênio, van der Waals e interações hidrofóbicas, com reversibilidade e alta especificidade, sem atividade catalítica ou imune (SHARON, 2007; AMBROSI; CAMERON; DAVIS, 2005). Assim, essas proteínas reconhecem carboidratos e glicoconjugados em células, tecidos e fluidos biológicos, sendo uma valiosa ferramenta para a biotecnologia (SILVA et al., 2014).

2.2 Lectina BanLec

A descoberta de uma lectina presente no extrato gerado pela poupa do fruto da Bananeira, a banana da espécie *Musa paradisiaca* foi feita por Kosthe e colegas em (1990) na Holanda. Através de um estudo realizado para investigar a resposta de anticorpos humanos a vários tipos de alimentos, foi observado a ligação de IgG4 ao extrato da poupa da banana. Devido à natureza mucilaginosa/viscosa do extrato da banana, foi considerada a possibilidade de uma ligação ao IgG4 não específica e decidiram purificar o princípio ativo presente na poupa da fruta. Assim foi feita uma purificação por gel filtração em uma coluna Sephadex G-75, utilizando como eluente o açúcar manose. Conseguiram então constatar a clara presença de uma lectina, que chamaram de BanLec-I, com tamanho aproximado de 27 kDa e ponto isoelétrico de 7,3, que tinha capacidade de aglutinar fortemente hemácias de coelho, mas não de humanos e de ovelha, sendo essa atividade inibida na presença de alfa-metil manosídeo, manose e glicose (KOSHTÉ et al., 1990).

Os estudos existentes sobre as lectinas de banana mostram algumas diferenças de acordo com a espécie estudada. Como já foi citado, a BanLec extraída de *Musa paradisiaca*, por Koshte e colegas (1990), apresentou um tamanho de 27 kDa com aproximadamente uma subunidade de 13 kDa. Porém a BanLec de *Musa acuminata* apresentou um tamanho de 30 kDa, com subunidade de 15 kDa (PEUMANS et al., 2000). A lectina de banana do cultivar 'Emperor' de *Musa basjoo*, assim como a lectina de *Musa acuminata*, é uma proteína com duas subunidades de 15 kDa e ligação específica a manose e glicose (WONG; NG, 2006).

A lectina BanLec está presente na polpa e raízes do fruto maduro, mas aparentemente não é presente na casca, folha nem nos cormos da planta. Entretanto já foi possível induzir a produção de BanLec nas folhas da bananeira após tratamento com metil-jasmonato, hormônio que está normalmente relacionando com mecanismos de defesa da planta, sugerindo que a proteína está sendo expressão em resposta a fatores de estresse a abióticos e bióticos (PEUMANS et al., 2000).

Baseado na sua sequência e predições da estrutura secundária, a lectina BanLec foi classificada como membro da família das lectinas relacionadas a jacalina (JRLs) (PEUMANS et al., 2000). Essa descoberta permitiu afirmar que as JRLs também estão presentes em espécies de plantas monocotiledôneas, o que sugere que as lectinas estão mais dispersas entre as plantas altas do que se acreditava anteriormente (PEUMANS et al., 2000). As lectinas da família relacionadas a jacalina, possuem semelhanças na sua conformação de peptídeos, desses, a conformação folha-beta I foi caracterizada através do estudo da Jacalina, lectina presente na semente da *Artocarpus integrifolia*, conhecida como Jaqueira, e seu fruto, Jaca (SANKARANARAYANAN et al., 1996). Por não pertencer as famílias de lectinas de plantas já existentes, a jacalina representava uma nova família de proteínas ligantes a carboidratos com afinidade especificamente a manose (VAN DAMME; LANNON; PEUMANS, 2008). A proteína BanLec é considerada estável, resiste a altas temperaturas (mais de 70°C), pHs extremos (2.5-12) e sua atividade aglutinante não foi reduzida depois do tratamento com tripsina e proteinase K, é desnaturada apenas com altas concentrações de agentes caotrópicos (PEUMANS et al., 2000). Sua estabilidade deve-se as fortes ligações de hidrogênios presente em sua conformação (GUPTA; SINHA; SUROLIA, 2008; CHEUNG; WONG; NG, 2009). Também possuiu como característica a presença de dois sítios de ligação por subunidade (SINGH et al., 2005).

Diferentemente dos estudos feitos anteriormente, sobre a estrutura dimérica da proteína BanLec (MEAGHER et al., 2005; SHARMA; VIJAYAN, 2011; SINGH et al., 2005; SWANSON et al., 2015), um estudo recente demonstrou que a lectina BanLec (*Musa acuminata*) é uma proteína tetramérica com massa molecular de 60 kDa, similar a arquitetura de outras lectinas que

fazem parte da LJR, como a artocarpina e a própria jacalina (HOPPER et al., 2017).

2.2.1 Atividades biológicas

A lectina da banana, BanLec, possui uma série de atividades biológicas já comprovadas, como atividade imunomoduladora, antiproliferativa e viral (SINGH; DEVI; NG, 2014). O efeito da BanLec como um agente imunomodulador foi primeiramente reportado por Kosthe e colegas (1990) por estimular células T e induzir a produção de IgG4 em sangue periférico humano.

Em um estudo *in vitro* realizado por Gavrovic-Jankulovic e colaboradores (2008), mostrou a capacidade da lectina recombinante e nativa da banana de induzir fortemente a proliferação de populações de células T, CD3+, CD4+ e CD8+ em PBMCs (célula mononuclear do sangue periférico), onde a proteína recombinante mostrou uma maior capacidade nesta proliferação quando comparada com a nativa. Os pesquisadores do estudo sugerem que essa diferença na atividade das lectinas pode ser devido a micro heterogenicidade da preparação da nBanLec, fato que já tinha sido observado em outro estudo anos atrás (KOSHTE et al., 1990). Outra explicação pode ser devido à perda de uma fração importante da proteína nativa durante o processo de purificação.

Em estudo *in vivo* realizado com a lectina nBanLec da *Musa acuminata*, em camundongos, foi possível avaliar os efeitos causados pela administração oral da proteína nativa, onde se observou o aumento de células T CD4+ no timo, e o aumento da produção de TNF- α no sangue periférico dos animais, demonstrando assim que a proteína nativa tem a capacidade de modular a resposta imune dos camundongos, esta informação pode ser relevante para não apenas considerar os benefícios do consumo da fruta banana, mas também em termos do prospectivo uso da nBanLec como um ingrediente de alimento funcional de produtos feitos com a fruta (SANSONE et al., 2016). O aumento da produção de TNF- α também foi um efeito imunoestimulador observado depois de administração oral da nBanlec com uma cultura de esplenócitos de murinos (CHEUNG; WONG; NG, 2009).

A lectina BanLec encontrada no cultivar Emperor da Musa basjoo também demonstrou ser imunomoduladora ao mostrar atividade miogênica quando testada em esplenócitos de camundongo, em concentrações a baixo de 10ug/ml (WONG; NG, 2006). Nesse mesmo estudo foi demonstrado pela primeira vez que uma lectina de planta com afinidade a manose, estimulou a expressão de óxido nítrico (NO) e induziu a produção de NO em macrófagos peritoneais de camundongos (WONG; NG, 2006). Essas mesmas atividades foram observadas mais detalhadamente em um estudo recente, onde a rBanLec em concentrações de 1 – 10µg/ml, induziu a proliferação de macrófagos residentes (MR) e macrófagos inflamatórios (MTG) de camundongos BALB/c, sendo a proliferação dos inflamatórios dose-dependente (MARINKOVIC et al., 2017). Também obtiveram como resultado a alteração na atividade da mieloperoxidase (MPO) e na intensidade da produção de ânion superóxido em MR e MTG, bem como o aumento na produção de citocinas como IL-12, IL-4, TGF- β e TNF- α pela proteína em questão, outro dado importante foi a confirmação que a lectina se liga aos oligossacarídeos das estruturas TLR2 e CD14 e essa ligação está envolvida na produção de citocinas e NO em macrófagos (MARINKOVIC et al., 2017).

A BanLec também possui atividade antiproliferativa, já tendo sido testada com sucesso em células da linhagem L1210 de leucemia pelo cultivar Emperor, com IC50 de 0,25 mg, onde ocorreu uma incubação com a lectina por 48 horas e posteriormente a inibição da proliferação celular foi avaliada (WONG; NG, 2006). Outra característica da lectina BanLec muito explorada é a atividade antiviral, que foi primeiramente observada por WONG; NG, 2006, onde a proteína inibiu a atividade da transcriptase reversa do HIV (Vírus da imunodeficiência humana). É possível que este efeito inibitório seja resultado da interação proteína-proteína, com este resultado foi possível dar uma nova direção para o estudo da relação entre o HIV e as lectinas com afinidades a manose. Em segundo estudo foi avaliado a capacidade de inibição do HIV pela BanLec, e obtiveram resultados promissores testando concentrações em escala nanomolar da proteína em diferentes isolados do vírus com diferentes tropismos, onde houve uma inibição dose-dependente da infecção viral

independentemente do tropismo viral e das células que foram usadas para a reprodução do vírus (SWANSON et al., 2010).

Neste mesmo estudo foi possível concluir também que a lectina inibiu a infecção de HIV-1 em macrófagos por um período de 15 dias, além da lectina não teve efeito na viabilidade celular, afirmando assim que o resultado do teste não foi pela citotoxicidade, além disso foi confirmado o mecanismo de ação da proteína, que impede a entrada do vírus na célula, ligando-se a estruturas ricas em manose do envelope viral (SWANSON et al., 2010). O próximo estudo relatado sobre a atividade antiviral da lectina BanLec da *Musa paradisíaca*, foi contra o vírus do mosaico do tabaco (TMV), em que se comprovou a prevenção da infecção viral *in vitro*, através da indução da expressão da proteína em plantas transgênicas do tabaco. Como o esperado a expressão da lectina aliviou a síndrome causada pela infecção do vírus nas folhas das plantas, a taxa da doença nas plantas transgênicas que expressavam a BanLec foi menor do que nas plantas selvagens. Também foi relatado que o mecanismo de ação da proteína foi, assim como reportado em outros estudos, através da ligação ao capsídeo viral, através da ligação proteína-proteína (LIU; LI; ZHANG, 2014).

Em 2015, Swanson e colegas realizaram um estudo com uma nova lectina de banana, nomeada H84T BanLec, obtida através de uma modificação no sítio de ligação a carboidrato, da proteína nativa da *Musa acuminata*, em que ao contrário da nBanLec, não possui atividade mitogênica (evitando assim possíveis complicações em testes clínicos), porém continua com sua atividade antiviral, demonstrando que as lectinas podem ser ainda mais seletivas através da engenharia molecular. Ainda nesse estudo testado o potencial antiviral da proteína modificada e da nBanLec, frente ao vírus da Hepatite C (HCV), vírus da influenza humana A (H1N1) e HIV. (SWANSON et al., 2015).

Em relação ao vírus da HIV, a H84T BanLec, assim como a nativa, teve atividade antiviral comprovada em escala nanomolar das proteínas, e foi eficaz contra vários isolados do vírus *in vitro* e, *in vivo*, a proteína teve sua atividade antiviral comprovada ao ser testada quanto a sua possível prevenção da transmissão do vírus na mucosa, onde camundongos humanizados fêmeas tiveram seu órgão genital tratado com a proteína, observaram assim que

nenhum camundongo tratado topicamente com a H84T mostrou níveis detectáveis de RNA viral no plasma durante o experimento (SWANSON et al., 2015). Em relação ao vírus da HCV, a H84T também teve sua atividade antiviral comprovada, para diferentes genótipos do vírus, e sua ação foi devido a inibição da replicação, impedindo a entrada do vírus nas células (SWANSON et al., 2015), como visto anteriormente no estudo com a nBanLec frente ao vírus da HIV (SWANSON et al., 2010). O mesmo potencial antiviral da H84T BanLec e nBanLec foi observado frente ao vírus da influenza humana A, *in vitro* e *in vivo*, sendo no ensaio *in vivo* capaz de bloquear a infecção em camundongos, sendo administrada intranasal 4 horas depois do desafio viral feito pela mesma via (SWANSON et al., 2015).

Através de um estudo deste ano, foi possível esclarecer algumas dúvidas relacionada a forte ligação entre a lectina BanLec (em concentrações nanomolares) e o vírus HIV que em estudos anteriores não foram esclarecidas. Assim, foi possível afirmar que a proteína em solução é um tetrâmero, e não um dímero, por isso os sítios de ligação a glicanos está presente nos quatros cantos do tetrâmero permitindo que a lectina se ligue a glicanos do envelope viral, sendo um ligante tetravalente ao vírus do HIV (HOPPER et al., 2017). Desta forma cada sítio de ligação facilita a forte interação bidentada com apenas um glicano rico em manose. Além disso, neste mesmo estudo foi descoberto que os dois sítios de ligação a glicanos/carboidratos em cada monômero da lectina são igualmente essenciais para o reconhecimento de cada glicano, e a grande separação entre os sítios de ligação permite o reconhecimento de grupos de glicanos rico em manose, gp120, aumentando a possibilidade que a lectina forme pontes entre as espículas do vírus, promovendo interações entre proteínas do envelope viral, o que poderia obstruir o reconhecimento inicial do receptor ou arranjos conformacionais necessários para fusão do vírus com a membrana de seu hospedeiro (HOPPER et al., 2017).

2.3 Lectina do quiabo

Abelmoschus esculentus, conhecido como quiabo, é uma planta de origem africana, planta que pertence à família Malvaceae e possui uma proteína monomérica chamada de lectina *A. esculentus* (AEL) que está presente em diferentes tecidos da planta, como nas folhas e sementes da planta, faz parte da família das lectinas de legumes, com tamanho molecular de aproximadamente 10,29 kDa, e seu dímero de 20,58 kDa (SOARES et al., 2012). Esta proteína é capaz de hemaglutinar eritrócitos de coelho e eritrócitos humanos tipo O e B sem precisar de cátions divalentes, e esta hemaglutinação foi inibida por lactose, frutose e manose. Poucos estudos são encontrados na literatura sobre a lectina de quiabo, porém essa proteína já demonstrou diferentes atividades biológicas com resultados promissores (SOARES et al., 2012; KLAFKE et al., 2013; MONTE et al., 2014; FREITAS et al., 2016; RIBEIRO et al., 2016)

2.3.1 Atividades biológicas

A lectina do quiabo possui atividade anti-inflamatória dose-dependente que foi comprovada por Soares e colegas (2012) em um modelo experimental de inflamação aguda, em que a lectina extraída da semente e administrada via intravenosa, teve efeito inibitório contra edemas causados por carrageenan nas patas de rato (via subcutânea), quando administrada 30 min antes da indução do edema, nas concentrações de 0,01, 0,1 e 1 mg/kg. Este estudo sugere que os efeitos anti-inflamatórios da lectina, só ocorrem quando o edema envolve infiltração de células, resultado presente em outros estudos com lectinas da família das leguminosas, além disso, também foi comprovada a atividade antinociceptiva da AEL (administrada via intravenosa), onde a proteína, nas concentrações de 0,1, 1 e 10 mg/Kg, reduziu o número de contrações abdominais, causadas por ácido acético em camundongos (via intraperitoneal) (SOARES et al., 2012).

A atividade anti inflamatória e antinociceptiva da AEL, também foi observada por outro estudo, em ratos com a injeção de zymosan 30 min antes

da injeção com a lectina, causando um distúrbio da articulação temporomandibular (DAT), pela via intra-articular, e sugerem fortemente que a eficácia da proteína depende parcialmente da integridade da heme oxigenase-1 (presente no processo desencadeado pela DAT) e envolve a inibição de TNF- α e IL-1 β , neste estudo a inflamação causada foi parcialmente revertida pelo tratamento com a lectina (FREITAS et al., 2016). A atividade antifúngica da lectina AEL também já foi comprovada contra leveduras de importância médica, neste estudo a lectina foi extraída das folhas da planta, e testado em oito espécies de leveduras: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus neoformans*, *Malassezia pachydermatis*, *Rhodotorula* sp. e *Trichosporon* sp, e de todas essas, o melhor resultado foi obtido contra a *Candida parapsilosis* através da ligação a glicanos presentes na parede celular do fungo (KLAFFKE et al., 2013).

A lectina do quiabo mostrou ser eficaz contra células de câncer de mama, em até 72 horas de incubação com a linha celular MCF7, sem ser tóxica para as células normais, sendo o melhor resultado com a concentração de 0,1mg/ml da lectina por 72 horas com taxa de 63% de inibição da proliferação celular, assim o estudo sugere que a atividade antiproliferativa se deve a interação da lectina com as células pelos sítios de ligação a carboidratos presentes na superfície das células tumorais, e também os resultados indicam que a apoptose induzida pela lectina foi mediada através da alta expressão de caspases (MONTE et al., 2014).

Este trabalho ressalta que a lectina AEL, pode ser aplicada como um marcador da malignidade do câncer de mama e progressão para diagnóstico e prognóstico aliado com métodos tradicionais (MONTE et al., 2014). Em um estudo com sêmen ovino, foi possível verificar a forte ligação da lectina marcada com FITC (isotiocianato de fluoresceína) pelas glicoproteínas da peça intermediária (onde estão localizadas as mitocôndrias, que fornecem energia para movimentação do flagelo) da célula espermática, sem causar danos a mesma (em concentrações de até 5 μ g), permitindo a sua utilização como futuro marcador ou aditivo de diluente para proteção desta estrutura celular, tornando possível a identificação de espermatozoides ideais para reprodução (SILVA, 2016).

Estudo recente demonstrou o efeito gastro protetor em uma gastropatia induzida por etanol, em camundongos, que receberam previamente a lectina do quiabo via intravenosa, nas concentrações 0,01, 0,1, 1, 10 ou 50 mg/ml. Após 30 min os animais foram eutanasiados para verificar os danos causados no estomago, a concentração de 1 mg/Kg foi capaz de proteger a mucosa contra os danos do etanol, mostrando envolvimento da ativação de receptores de opioides e receptores α -2- adrenérgico no efeito gastro protetor dessa lectina. Por fim, a AEL mostrou ter efeito antioxidante que provavelmente implicou no seu mecanismo de defesa (RIBEIRO et al., 2016). Até então, não há trabalhos na literatura avaliando a atividade antiviral da lectina do quiabo.

2.4 Vírus

2.4.1 Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1)

As infecções causadas por herpesvírus bovino tipo 1 são responsáveis por gerar significativas perdas econômicas em rebanhos leiteiros e de corte em todo o mundo, com exceção de alguns países europeus que são livres do BoHV-1. Os prejuízos são causados principalmente pela queda na produtividade e pelos danos reprodutivos como retornos ao cio, abortos e nascimentos de bezerros fracos. (NANDI et al., 2011; FINO, et al., 2013; RAVISHANKAR, et al., 2013). Um dos quadros clínicos da infecção por esse vírus, a rinotraqueíte infecciosa bovina, foi descrita pela primeira vez na Alemanha, durante o século XIX (GRAHAM, 2013).

O BoHV-1 pertence à família Herpesviridae, subfamília Alphaherpesvirinae, gênero *Varicellovirus*, e seu genoma viral é constituído por uma molécula de DNA fita dupla linear circundado por nucleocapsídeo icosaédrico. Recobrando o capsídeo, há uma camada proteica amorfa denominada tegumento, e a camada mais externa é o envelope lipoproteico, que contém em sua superfície espículas de glicoproteínas com grande potencial imunogênico, responsáveis pela indução de anticorpo no hospedeiro (ROIZMANN et al., 1992; METTENLEITER, 2004).

Uma característica importante do vírus, e que contribui para sua virulência, é a capacidade de induzir um estado de latência em gânglios

nervosos, principalmente o trigêmio e sacral. Durante a latência, o genoma viral se mantém na forma circular episomal e a expressão gênica ocorre de forma limitada ou mesmo ausente. O genoma viral encontra-se associado a histonas, e assim permanece em estado latente em neurônios infectados. Quando os animais são expostos a fatores estressantes que desencadeiam imunossupressão, cria-se condições ideais para a reativação viral, que cursa com síntese e excreção de progênie infecciosa e nova viremia, desencadeando aparecimento de sinais clínicos e excreção viral (JONES, 2003).

O vírus possui vários subtipos que diferem pelo seu próprio genoma, além de diferenças na apresentação clínica/sintomas causados pela infecção viral (FINO, et al. 2012). O ciclo viral replicativo ou lítico ocorre em células permissivas na mucosa do trato respiratório ou mucosa genital, variando de acordo com a via de infecção, o vírus penetra nas terminações nervosas periféricas e migra, via axônio, para os neurônios dos gânglios trigêmeo ou sacral, onde estabelece infecções latentes (ROIZMAN et al., 1995). Dependendo da via de infecção, as enfermidades podem cursar com sinais respiratórios, caracterizando a rinotraqueíte infecciosa bovina – IBR ou com sinais genitais (vulvovaginite pustular infecciosa, balanopostite pustular infecciosa) além de infertilidade e abortos (NANDI et al., 2009).

Os bovinos são os principais reservatórios de BoHV-1, porém algumas espécies de ruminantes silvestres já foram infectadas experimentalmente (MOLLEMA et al., 2005; SIX et al., 2001). A transmissão viral ocorre por contato direto entre secreções nasais, oculares e genitais, sêmen e anexos fetais de animais infectados ou pela inalação de aerossóis contaminados, sendo o contato direto o mais relevante para epidemiologia da doença, principalmente em rebanhos que são criados de modo intensivo ou semi-intensivo. Também há a preocupante transmissão transplacentária, que foi relatada previamente que está condicionada ao estado imunológico da fêmea no momento da infecção (RADOSTITS; DONE, 2007). A infecção genital pode ocorrer pela monta natural e/ou por inseminação artificial (IA). As centrais de inseminação artificial podem ser propagadoras do patógeno, por causa da alta viabilidade do BoHV-1 em amostras principalmente de sêmen criopreservadas, que chegam a durarem até um ano (ROCHA; GOUVEIA; LEITE, 1999).

Apesar da importância das infecções por BoHV-1 e da necessidade de touros doadores de sêmen serem livres da infecção, a legislação nacional ainda carece de requisitos a respeito. A Instrução Normativa N°48 de 17 de julho de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) não estabelece a ausência de BoHV como requisito sanitário para a comercialização de sêmen bovino no Brasil. Já a Instrução Normativa N°8 de 10 de março de 2006 estabelece que os animais residentes em Centrais e cujo o sêmen seja destinado à exportação, devem ser submetidos as provas diagnosticas e apresentar resultado negativo ao patógeno (COSTA et al., 2017).

Existem vacinas disponíveis contra o BoHV-1, e há várias empresas que comercializam as vacinas, normalmente são formuladas em associação com outros antígenos virais e/ou bacterianos. Em grande maioria, as vacinas são comercializadas na forma inativa, e recentemente as vacinas nas formas atenuadas termossensíveis também têm sido comercializadas no Brasil (COSTA et al., 2017). Existem também vacinas geneticamente marcadas que oferecem a possibilidade de diferenciação sorológicas de animais vacinados e naturalmente infectados, porém este tipo de vacina não é disponível no Brasil (MUYLKENS et al., 2007). No Brasil, a adesão à profilaxia por vacinação é voluntária e o produtor rural pode decidir por vacinar ou não de acordo com a necessidade, possibilidade e orientação veterinária.

As manifestações clínicas da infecção pelo BoHV-1 podem ser controladas e prevenidas por meio de procedimentos adequados de manejo, além dos programas de vacinação, como manejo nutricional e sanitário adequados, com desinfecção periódica das instalações (RADOSTITS; DONE, 2007). O BoHV-1 é rapidamente inativado utilizando desinfetantes que possuem derivados fenólicos 1%, hipoclorito de sódio 2%, hidróxido de sódio 0,5%, entre outros. O BoHV-1 é instável no meio ambiente, inativados em até 10 dias a 37°C, instável em pH ácido e estáveis a 4°C por meses. Devem ser adotadas medidas de mitigação de risco, tais como, isolamento dos animais de duas a três semanas antes de introduzi-los no rebanho e isolamento de bovinos doentes para evitar o contágio (PITUCO, 2009).

Essas vacinas mencionadas são capazes de prevenir o desenvolvimento de sinais clínicos e reduzem a excreção viral devido a resposta imune primária, porém não previnem a infecção a campo, ou seja, embora as vacinas nos últimos anos têm evoluído quanto sua eficácia, a vacinação ainda não impede a circulação do BoHV-1 entre os rebanhos vacinados e o desenvolvimento da infecção latente, por tanto novos estudos ainda devem continuar no aprimoramento dos métodos vacinais, e outros meios de prevenção (COSTA et al., 2017).

2.4.2 Vírus da diarreia viral bovina (BVDV)

O vírus da Diarreia Viral Bovina, assim como o BoHV-1, é um dos principais patógenos de bovinos e causa perdas econômicas significativas para a pecuária bovina em todo o mundo (BAKER, 1995). Este vírus pertence à família Flaviviridae, gênero *Pestivirus*, são vírus pequenos, envelopados e contêm uma molécula de RNA linear, fita simples e polaridade positiva (COLLETT; MOENNIG; HORZINEK, 1989). O mais conhecido dos *Pestivirus* é o vírus da Hepatite C (HCV), que infecta milhões de humanos em todo o mundo, levando a cirrose no fígado e ao carcinoma hepatocelular (SHEPARD; FINELLI; ALTER, 2005). De acordo com a capacidade de produzir efeito citopático em cultivo celular, os isolados de BVDV são classificados em biotipos citopatogênico (CP) e não-citopatogênico (NCP). A grande maioria dos vírus de campo são NCP e as amostras CP são isoladas quase que exclusivamente de animais acometidos da Doença das Mucosas, uma forma clínica severa da infecção (BROWNLIE, 1990; BAKER, 1995).

Assim como outros vírus que possuem como material genético o RNA, o BVDV possui a capacidade de alterar o material genético, e adquirir genes dos seus hospedeiros (STRAUSS, 1996). Portanto possuem mecanismos que permite a criação de combinações benéficas de mutações de modo eficiente (WOROBAY; HOLMES, 1999).

Pestivirus infectam vários animais, assim, seus hospedeiros são diversificados, como, bovinos, ovelhas, animais da família camelidae como os camelos e alpacas, veados e antílope (grupo de mamíferos bóvidos)

(PETERHANS; SCHWEIZER, 2010). No Brasil, há relatos clínicos e sorológicos desde o final dos anos 60, o primeiro foi uma descrição de doença gastroentérica, com aspectos clínicos e patológicos compatíveis com a forma clássica de infecção, já mencionada anteriormente, a Doença das Mucosas (CORRÊA, 1968). A Doença das Mucosas é uma condição fatal, caracterizada por severas lesões erosivas na mucosa intestinal, mais especificamente na região da Placa de Peyer (onde estão presentes os nódulos linfáticos) em que na grande maioria das vezes acomete bovinos que não correspondem corretamente ao vírus ou aos animais PI, que são imunitolerante ao vírus NCP, porém foram posteriormente infectados com a cepa CP, e assim acometidos pela Doença das Mucosas (BROWNLIE, 1990;PETERHANS; SCHWEIZER, 2010).

A infecção do BVDV tem sido associada a uma ampla variedade de manifestações clínicas desde infecções inaparentes ou com sinais leves até doença aguda fatal, no entanto a maioria das infecções em animais imunocompetentes parece cursar de forma subclínica. Enfermidade gastroentérica aguda ou crônica, doença respiratória em bezerros, síndrome hemorrágica com trombocitopenia, patologias cutâneas e imunossupressão estão entre as consequências mais frequentes da infecção pelo patógeno (BROWNLIE, 1990;BAKER, 1995). Entretanto, o vírus BVDV é frequentemente associado com fenômenos reprodutivos (BAKER, 1995) . Em muitos rebanhos onde a infecção é endêmica, falhas reprodutivas representam os sinais mais evidentes, as vezes os únicos, da presença da infecção, assim como no caso do BoHV-1, a infecção antes ou após a cobertura ou IA pode resultar em perdas reprodutivas (BROWNLIE, 1990; BAKER, 1995).

A infecção fetal entre os dias 40 e 120 de gestação com cepa NCP do BVDV frequentemente resulta na produção de bezerros imunitolerantes, persistentemente infectados (PI) com o vírus. Esses bezerros PI, normalmente de crescimento mais lento, porém imperceptível aos olhos da maioria dos produtores rurais, não respondem imunologicamente ao vírus, podem ser clinicamente normais, porém excretam o vírus continuamente em grandes quantidades (BROWNLIE, 1990; BAKER,1995) São considerados assim ponto-chave na epidemiologia da infecção e o principal entrave no controle da

enfermidade já que em testes tradicionais apresentam-se soronegativos. A identificação desses animais e seu descarte constituem em etapas essenciais para o controle/erradicação do BVDV dos rebanhos (DUBOVI, 1992).

Existem diversas vacinas para a prevenção da infecção pelo BVDV, e sua utilização tem sido utilizada com relativo sucesso para proteger animais da enfermidade clínica, reduzir a circulação de vírus e para tentar impedir a infecção fetal e a consequente produção de bezerros PI (DUBOVI, 1992). Mais de 150 vacinas, contendo o BVDV atenuado ou inativado já foram licenciadas nos Estados Unidos, o uso de vacinas contra o BVDV no Brasil ainda é incipiente e realizado de forma irregular, e a legislação brasileira não permite o uso de vacinas vivas modificadas contra o BVDV. A vacinação tem sido realizada com certa frequência em rebanhos leiteiros e em criações intensivas ou semi-intensivas de corte nas regiões sudeste e sul do Brasil (FLORES et al., 2005). A grande variabilidade antigênica entre os isolados do vírus representa um obstáculo para a obtenção de proteção cruzada contra o amplo espectro antigênico dos isolados, o que reacendeu a discussão sobre a eficácia das vacinas comerciais disponíveis (FULTON; BURGE, 2000).

3. Objetivos

3.1 Objetivos gerais

Caracterizar as lectina nativa de quiabo, lectina nativa da banana e sua nova versão recombinante, e avaliar sua atividade antiviral sob os vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1).

3.2 Objetivos específicos

1. Expressar a nova lectina recombinante rBanLec-like.
2. Extração da lectina nativa BanLec.
3. Caracterização das três lectinas vegetais (nBanLec, rBanLec-like e quiabo) por SDS-PAGE e *Western blot*.
4. Determinar concentrações tóxicas para células Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK)
5. Determinar concentrações das lectinas com atividade antiviral e virucida sobre o BVDV e BoHV-1

4. Metodologia

4.1 Construção *in silico* da sequência codificadora da lectina rBanLec-like

A sequência da BanLec-like foi desenhada com base na sequência da lectina nativa de banana BanLec, esta sequência foi alinhada com as sequências de outras 9 lectinas pertencentes ao grupo das JRL: Heltuba, de *Helianthus tuberosus*, Artocarpin e KM+ de *Artocarpus integer*; a aglutinina de *Calystegia sepium*; Ipomoelin, de *Ipomoea batatas*; JRL-like, de *Triticum aestivum*; a lectina JRG1 e *Jasmonate-induced* de *Hordeum vulgare*; e GOS9 de *Oryza sativa*.

Baseado no alinhamento múltiplo, foram modificados 11 aminoácidos da sequência de nBanLec com possível interferência no sítio de ligação a carboidrato, baseado nas variações encontradas nas diferentes JRLs. A troca de aminoácidos foi realizada visando à criação de uma sequência contendo os aminoácidos consenso entre as diferentes lectinas. A sequência de DNA codificante final, correspondente a proteína BanLec-like foi inserida *in silico* no vetor pUC de clonagem em *E. coli*, fusionando à mesma uma calda de seis histidinas.

4.2 Clonagem *in vitro* de rBanLec-like

A sequência codificadora de rBanLec-like foi sintetizada em vetor Puc18. A sequência sintética foi amplificada por PCR. Cada par de primer continha um sítio para enzima de restrição. Após amplificação, o produto de PCR foi purificado utilizando kit comercial e digerido com as enzimas de restrição *BamHI* e *HindIII* (New England Biolabs). Em seguida, o produto da digestão foi purificado e ligado utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) ao vetor pAE (previamente digerido com as mesmas enzimas). O produto da ligação foi transformado por eletroporação em células *E. coli* TOP10 eletrocompetentes, as quais foram posteriormente inoculadas em meio Luria-Bertani (LB) sólido contendo ampicilina (100 µg/mL) como marcador seletivo. A triagem dos plasmídeos recombinantes presentes nas células transformadas foi realizada

pela técnica de extração rápida de DNA empregando fenol-clorofórmio e observação em gel de agarose 1%. As colônias contendo os possíveis plasmídeos recombinantes foram propagadas e o DNA plasmideal extraído empregando o kit comercial *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE). A confirmação da clonagem dos possíveis plasmídeos recombinantes foi realizada pela técnica de PCR e digestão. A construção foi analisada por sequenciamento de DNA utilizando o método automatizado de Sanger.

4.3 Expressão e purificação da lectina recombinante

Os plasmídeos recombinantes foram inseridos em *E. coli* BL21 Star (DE3) pela técnica de choque-térmico e cultivados em LB sólido com 100 µg/mL de ampicilina a 37 °C. Uma colônia foi selecionada e cultivada em 25 mL de LB líquido com 100µl/ml de ampicilina *overnight*, 37 °C sob agitação de 180 rpm. Este cultivo foi utilizado para inocular 500 mL do mesmo meio, mantido nas mesmas condições. Quando a cultura atingiu fase exponencial do crescimento da bactéria ($OD_{600} = 0,6-0,8$), a expressão foi induzida pela adição de 500µl de isopropil βD-tiogalactosídeo (IPTG) a 1 mM, mantendo a cultura nas mesmas condições para expressão da proteína por 3h.

Após indução, uma alíquota de células foi coletada para análise em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), visando a confirmação da expressão da lectina recombinante. As células em cultivo foram coletadas por centrifugação (8000 x g, 15 min, 4 °C), o *pellet* foi lavado com tampão salina-fosfato (PBS) e congelado a -20 °C. As células foram solubilizadas em solução tampão de lise celular (NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 200 mM, Imidazol 20 mM e 1 mM debetamercapto pH 7,4), e rompidas por sonicação (6 ciclos de 30 seg, com 10 seg de intervalo). Em seguida, as amostras foram centrifugadas 12000 x g por 40 min a 4 °C. O sobrenadante contendo a fração de proteínas solúveis foi armazenado a 4 °C e o *pellet* solubilizado novamente, desta vez no mesmo tampão, acrescido de 6 M de ureia. Após nova centrifugação nas mesmas condições, o sobrenadante contendo a fracção solúvel da proteína foi separado e armazenado a 4 °C. Ambas fracções, hidrofílicas e hidrofóbicas foram investigadas por SDS-PAGE, visando identificar a solubilidade da proteína recombinante expressa.

A proteína recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade a íons metais (IMAC)/níquel, utilizando coluna His-Trap FF (GE). Durante a purificação foi realizado um processo de redobramento da proteína imobilizada na coluna, onde a uréia é removida lentamente a partir da geração de um gradiente linear. A faixa de gradiente empregado foi 6 M – 20 mM de uréia. Após remoção da proteína da coluna por eluição com gradiente de imidazol 20 mM – 500 mM, as alíquotas contendo proteína purificada foram combinadas e dialisadas contra PBS e água. A amostra final contendo rBanLec-like purificada foi liofilizada pelo equipamento Micro Modulyo Freeze Dryer® (Edwards) para armazenamento e concentração. A concentração final da proteína foi determinada por teste colorimétrico comercial BCA (Pierce/Thermo Fisher).

Após a quantificação analisou-se a proteína recombinante por SDS-PAGE e pela técnica de *Western Blot*, juntamente com uma alíquota purificada da proteína nativa para comparação. Para revelação do *Western Blot* se utilizou o anticorpo de rato anti rBanlec-like produzido previamente pelo grupo de pesquisa do laboratório BioPro.

4.4 Extração e purificação da BanLec nativa

Duzentos gramas de poupa de banana madura cultivar 'prata' (2-3 frutos) foram trituradas manualmente com auxílio de um bastão de vidro estéril e homogeneizada em 400 mL de tampão PBS contendo 2% de polivinilpirrolidona (PVP). Posteriormente foi deixada *overnight* sob agitação a 4 °C. Em seguida, o material foi centrifugado 10000 × g por 30min a 4 °C, o *pellet* obtido foi descartado, e as proteínas presentes no sobrenadante foram fracionadas por precipitação com sulfato de amônio ($[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$), em saturação 0-60% (m/v) durante 1 h a 4 °C. Após centrifugação (10000 × g, 30 min), o precipitado foi solubilizado no mesmo tampão de extração, e dialisado contra água destilada completando 6 trocas (com intervalo de 1h a cada troca), seguido de nova centrifugação para retirada de impurezas. As frações proteicas dialisadas foram submetidas a cromatografias de afinidade à glicose em matriz DEAE-Sephadex® A-75 (G&E), composta de agarose-lactose. Para a purificação, a coluna foi equilibrada com 10 volumes de PBS 2% PVP (polivinilpirrolidona), seguida da passagem do extrato proteico (1 mL/min). As proteínas que não se

ligaram a matriz foram removidas por lavagem com 5 volumes de PBS e por fim, nBanLec foi eluída da coluna pela passagem de 25 mL de tampão glicina 2,5 M. Cada alíquota de 1,5 mL da eluição foi checada por espectrofotometria de luz UV no comprimento de onda de 280 nm. As alíquotas selecionadas foram submetidas a uma nova diálise para retirar o excesso de glicina na amostra. Após a dialise, a proteína foi liofilizada.

4.5 Obtenção da lectina de quiabo

A lectina de quiabo utilizada neste trabalho foi gentilmente cedida pelo Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba.

4.6 Caracterização das lectinas por SDS-PAGE e *Western blot*

As lectinas já liofilizadas rBanLec-like, nBanLec e a de quiabo, foram separadas em gel de 15% de poliacrilamida durante SDS-PAGE para analisar o processo de purificação, liofilização e seus tamanhos moleculares. Se pesou 0,5 mg da rBanLec-like e nBanLec e 2 mg da lectina do quiabo e, em seguida, foram resuspendidas em 1ml de água destilada. As amostras de cada lectina foram preparadas em condições desnaturantes, com presença de β -mercaptoetanol e fervidas por 10 min a 100 °C. Após SDS-PAGE, as amostras foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose. Esta membrana foi bloqueada com leite em pó 5% por 1h em temperatura de 28 °C, e foi incubada por mais 1h utilizando como anticorpo primário o anti-rBanLec-like policlonal de rato (1:3000). Após a membrana foi lavada 3 vezes com PBS-T (1L de PBS com 500 μ l de TWEEN 20%) e 1 vez com água destilada, preparando a membrana para uma nova incubação de 1h com o anticorpo secundário anti-rato (1:6000). Posteriormente foi feita uma nova lavagem na membrana e a revelação foi feita pelo método colorimétrico, pela incubação da membrana com um substrato (3,3' Diaminobenzidina tetrahidrocloro) que reage com a enzima reveladora peroxidase que é ligada ao anticorpo secundário. Um segundo SDS-PAGE foi realizado para visualização das amostras coradas por azul de Coomassie.

4.7 Dicroísmo circular

Para verificar se a estrutura da proteína rBanLec-Like estava semelhante a da nativa foi realizado ensaio de Dicroísmo Circular. O método foi realizado em parceria com o Prof. Dr. Claus Tröger Pich da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O experimento foi feito no equipamento espectropolarímetro JASCO J-815 (JASCO Coporation, Japan), equipado com unidade de controle de temperatura Peltier. Todo instrumento, incluindo câmera de amostra, foram constantemente injetados com nitrogênio (N₂) durante a operação. As amostras foram diluídas em água ultrapura ou em tampão tris-HCl, 50 mM com NaCl 15 mM pH 7,6 e as leituras das proteína nativa e recombinante foi obtido por 30 aquisições de sinal da mesma amostra com varredura de 200 a 280 nm e velocidade de varredura de 50 nm por minuto. Os resultados são apresentados a médias dos três experimentos. de cada proteína em cada situação.

4.8 Teste de Hemaglutinação

Sangue heparinizado de ratos (*Rattus norvegicus*) foi obtido, e os eritrócitos foram coletados por centrifugação a 3500 ×g por 5 min, a 4 °C. Após 5 lavagens com tampão fosfato-salina (PBS), os eritrócitos foram diluídos a 2% em PBS. O teste de hemaglutinação foi realizado utilizando 50 µl das lectinas rBanLec-like e nBanLec na concentração de 65µg, diluídas em série, até 15 nanogramas de proteína, seguido de adição de 50 µL de eritrócitos de rato a 2%. Como controle foi utilizado apenas PBS. A reação foi incubada a 37°C por 40 minutos.

4.9 Meios de cultivo, Lectinas, células e vírus

Meio Essencial Mínimo com sais de Eagle (E-MEM, Sigma-Aldrich®, USA) suplementado com antibióticos penicilina (Sigma-Aldrich®, USA), estreptomicina (Vetec®, Brasil), enrofloxacina (Bayer®, Brasil) e anfotericina B (Cristália®, Brasil), foi utilizado em todas as etapas que envolveram utilização de células. As etapas que necessitaram de crescimento celular, E-MEM foi

ainda suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco, Grand Island, NY)

Para a utilização das lectinas, essas foram diluídas em E-MEM e estocadas a -20 °C na concentração 1 mg/ml até momento do uso. Para as demais diluições, foi utilizado E-MEM.

Células da linhagem MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*) foram selecionadas por ser permissíveis aos vírus estudados. As células foram provenientes do banco de células do Laboratório de Virologia e Imunologia da Faculdade de Veterinária, UFPel (LabVir). As células, estocadas em botijões com nitrogênio líquido em criotubos com 10% de dimetilsulfóxido, foram descongeladas e cultivadas em E-MEM suplementado com 10% de SFB em garrafas de cultivo celular em estufa com temperatura 37 °C. Para os ensaios de citotoxicidade, ensaios antivirais e titulações virais, as células foram removidas da garrafa pelo processo de tripsinização (descolamento e individualização das células por processo enzimático pela tripsina) e cultivadas em placas de 96 cavidades (KASVI®, Brasil) em estufa úmida a 37 °C com 5% de CO₂, até estabelecimento de monocamada celular (aproximadamente 1 x 10⁷ células / ml) por poço.

Os vírus utilizados foram herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) cepa Los Angeles e o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) cepa citopatogênica NADL., pertencentes ao banco de vírus do LabVir UFPel. Os vírus, estocados em criotubos em botijões com nitrogênio líquido, tinham títulos conhecidos (informação necessária para diluições virais em ensaios futuros). Quando da necessidade de conhecer o título viral após ensaios antivirais e/ou virucidas, as titulações foram realizadas segundo o método previamente estabelecido (REED; MUENCH, 1938).

4.9.1 Ensaios de citotoxicidade

Para os ensaios de citotoxicidade, células Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK), previamente cultivadas em placas de 96 cavidades por 24 horas em estufa úmida a 37 °C com 5% DE CO₂, foram expostas à diferentes concentrações das lectinas (100 µl por poço) que variaram de 1 mg/ml até 3,9 µg/ml para rBanLec-like e de 500 µg/ml até 1,9 µg/ml para nBanLece quiabo.

Os testes foram realizados em duplicata e incubados por 24 horas sob as mesmas condições até o momento da leitura. Como controles foram utilizadas células mantidas em E-MEM, sem nenhum tipo de exposição às proteínas. Após essas etapas, as placas foram submetidas ao ensaio de redução do MTT (3-(4,5 dimetiliazol-2yl) -2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo) segundo MOSMANN, (1983), técnica baseada na redução, por mitocôndrias ativas nas células, dos sais de tetrazólio, transformando-se de um composto de coloração amarela em um composto de coloração azul escuro/roxo escuro, chamado de formazan (cristais insolúveis em soluções aquosas).

Sendo assim, o meio foi aspirado e 50 µl de MTT foi colocado em cada poço da placa posteriormente foi incubada de 3-4h em condições ideais de CO₂ e temperatura. Em seguida se retirou o excesso de MTT, delicadamente para não retirar os cristais no fundo do poço, e foi adicionado 100 µl DMSO para dissolver os cristais. Após alguns minutos em temperatura ambiente, para se ter certeza que todos os cristais foram dissolvidos, a placa foi lida usando leitor de Elisa Microplate reader MR-96 (Mindray)[®], sob comprimento de onda de 545 nm.

Os percentuais de viabilidade celular (VC) foram calculados segundo a fórmula: $VC = AT/AC \times 100$, onde AT e AC significam a absorbância das células tratadas e do controle de células, respectivamente e, dessa forma foram obtidas a concentração inibitória para 50% do cultivo celular (CI50%).

4.9.2 Titulações Virais

Em todos os casos onde houve a necessidade de se conhecer o título viral, foi utilizado o método de Reed & Muench (1938). Resumidamente, os vírus são submetidos às diluições seriadas na base 10 e, 25 µl de cada diluição é transferida para poços de placas de 96 cavidades, em quadruplicata. Após suspensão celular em E-MEM acrescida de 10% de SFB é colocado juntamente com os vírus. Após 72 horas de incubação nas mesmas condições já mencionadas, a leitura é realizada por microscopia óptica. Todos os poços são avaliados e, tapetes celulares que apresentem lesões e tapetes íntegros são contabilizados e, através da fórmula de REED; MUENCH, (1938) o título viral foi conhecido.

Os títulos são expressos como doses infectantes para 50% de cultivos celulares (DICC50/25 µl). Para obtenção dos percentuais de inibição viral (PI) foi aplicada a fórmula:

$$\left[1 - \left(\frac{\text{antilogtratamento}}{\text{antilogcontrole}}\right)\right] \times 100$$

4.9.3 Ensaios de atividade antiviral

Células MDBK foram previamente cultivadas em placas de 96 cavidades em temperatura de 37°C em ambiente com 5% de CO₂, por 24 horas. No momento da infecção das células com BoHV-1 e BVDV, foi utilizado concentração viral de 0,1 MOI (*multiplicity of infection*).

As concentrações das proteínas foram baseadas no ensaio de citotoxicidade, realizado em etapa prévia. Concentrações não tóxicas para as células foram utilizadas (12,5 µg/ml até 200 µg/ml). A atividade antiviral foi avaliada através de dois métodos distintos: através da viabilidade celular e do título viral, após: 1) tratamento das células com as proteínas rBanLec, nBanlec e Quiabo antes da infecção e 2) tratamento das células após a infecção. Todas as análises foram realizadas em quadruplicata.

No tratamento antes da infecção as células MDBK foram expostas com 100 µl de cada um dos tratamentos, e após 2 horas, o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e os vírus adicionados (100 µl/ poço, 0,1 MOI). Após 72 horas de incubação deu-se as leituras (Redução do MTT e titulação viral) As placas destinadas à realização da titulação viral foram congeladas e descongeladas para rompimento celular.

Já no tratamento após infecção, as células previamente cultivadas foram submetidas à infecção viral (100 µl/poço, 0,1 MOI) e após 2 horas, o sobrenadante foi aspirado e os tratamentos foram aplicados sobre as células (100 µl/ poço). Após 72 horas foi realizada a leitura da mesma maneira descrita, pelo título viral e MTT.

4.9.4 Atividade virucida

O ensaio da atividade virucida, para verificar se as lectinas utilizadas são potenciais agentes desinfectantes, foi realizado pela incubação dos vírus com as lectinas rBanLec-like (500 µg/ml), nBanLec (500 µg/ml) e o quiabo (500 µ/ml) por até 24 horas na temperatura de 22°C. Durante a incubação, em seis momentos (zero, uma, duas, quatro, oito e vinte e quatro horas), foram coletadas alíquotas (100 µl) das suspensões víricas expostas às proteínas para realização das titulações virais.

4.9.5 Estatística

Para estatísticas do trabalho, foi feito o teste de variância ANOVA, seguido do teste de *Least Significant Difference* (LSD) para comparação das médias, em que foi adotado 95% de significância.

5. Resultados

5.5 Clonagem, expressão e purificação da rBanLec-like

A clonagem da proteína rBanLec foi realizada com sucesso. Logo depois a indução, solubilização em tampões e sequências de centrifugações, foi realizada uma eletroforese em gel de poliácridamida para visualizar e confirmar a presença da proteína. Verificou-se que a proteína foi eficientemente expressa, e está presente na fração insolúvel, com a massa molecular esperada de aproximadamente 15 kDa (Figura 1A). Assim que foi possível confirmar a presença da proteína na fração insolúvel em uréia, foi realizada a purificação da proteína. Na purificação utilizou-se o recurso de *refolding* na coluna para a obtenção da proteína com seu dobramento correto, na ausência de agente desnaturante. As alíquotas resultantes de tal procedimento foram submetidas a uma eletroforese em gel de policrilamida 15%, em que podemos observar a presença em diversas diluições (Figura 1B).

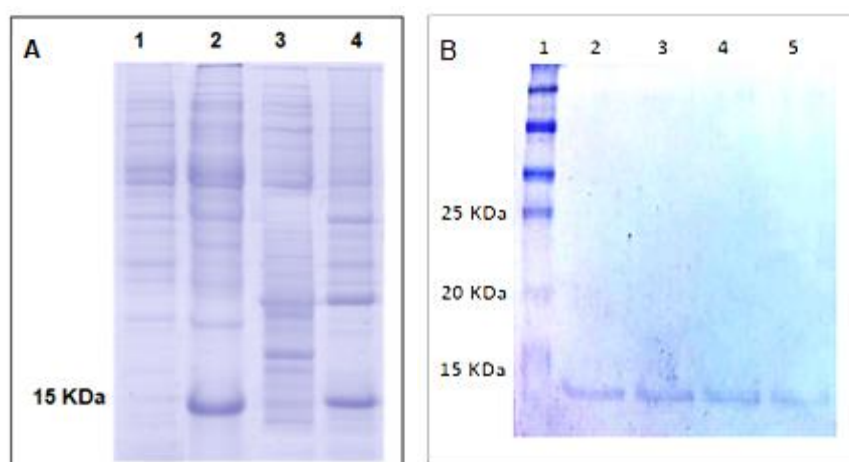


Figura 1A: Processo de expressão e teste de solubilidade da rBanLec-like: 1- E.coli Star BL21 (DE3) contendo o plasmídeo pAE/rBanLec-like não induzida; 2- E.coli Star BL21 (DE3) contendo o plasmídeo pAE/rBanLec-like com a expressão da proteína induzida por IPTG; 3- Sobrenadante após lise celular com tampão sem desnaturante; 4- Sobrenadante em tampão com desnaturante contendo proteínas solúveis em uréia. Figura 1B: Processo de purificação da rBanLec-like: 1- Marcador Unstained Protein Ladder, Broad Range (10-250 kDa) BioLabs®; 2 a 5- Alíquotas da purificação rBanLec-like por cromatografia de afinidade ao níquel.

5.6 Extração e purificação da nBanLec

O procedimento de extração e purificação da BanLec proveniente do fruto maduro é desafiador, por causa da grande quantidade de amido presente

no fruto (MO et al., 2001). Tendo em vista esta dificuldade, vários protocolos de extração foram desenvolvidos, mas normalmente a quantidade de proteína obtida é pequena, em torno de 3,8mg/100g - 10mg/200g de banana (KOSHTE, et al., 1990; PEUMANS, et al., 2000). Por esse motivo utilizamos bananas muito maduras onde a maior parte do amido já foi degradado em açúcar solúveis (PEUMANS et al., 1990; PEUMANS et al., 2000). A proteína nativa foi obtida e purificada por cromatografia de afinidade em matriz DEAE-Sephadex® A-75 (G&E), com rendimento de aproximadamente 16mg/200g de banana, revelando ao fim do procedimento metodológico, uma proteína com massa molecular aparente de 12 kDa (Figura 2A).

5.7 Caracterização das lectinas por *Western blotting*

Após a realização do SDS-PAGE com dois géis iguais com as três lectinas, um deles foi corado com Azul de coomassie (Figura 2A), e o outro foi transferido para uma membrada de nitrocelulose, e assim realizado o *Western Blot* (WB). Os anticorpos policlonais obtidos contra rBanLec-like foram sensíveis para reconhecer a proteína recombinante, bem como reconhece a proteína nativa BanLec (Figura 2B). Desta forma, o WB indica que a rBanLec-like de fato manteve ao menos porções semelhantes antigenicamente a nBanLec.

Como esperado, no WB não apareceu nenhuma banda com aproximadamente 10,28 kDa referente a proteína do quiabo, mostrando a especificidade do anticorpo anti rBanlec-like.

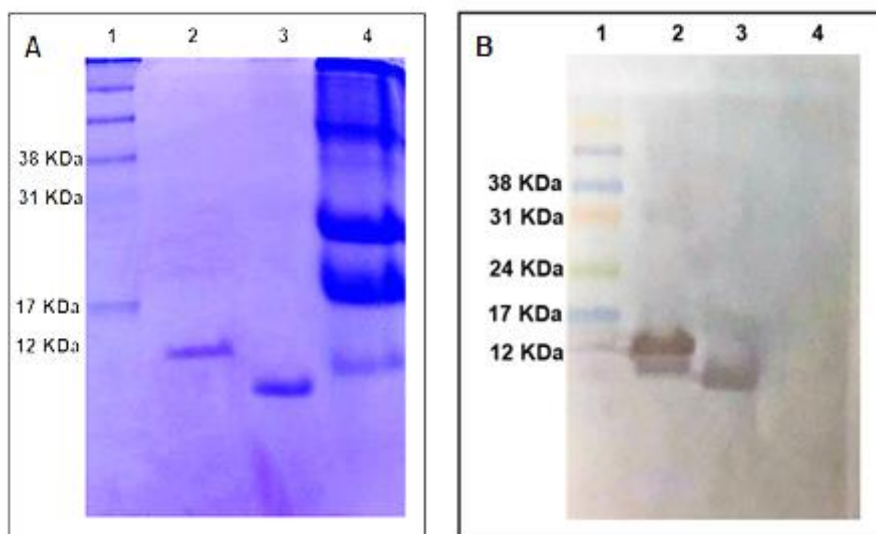


Figura 2A: SDS-PAGE da purificação das lectinas rBanLec-like, nBanLec e a lectina de quiabo: 1- Marcador de peso molecular de proteínas (Rainbow protein marker full range – BioRad®); 2- Alíquota da purificação da lectina rBanLec-like; 3- Alíquota da purificação da lectina nBanLec; 4- Alíquota da purificação da lectina do quiabo. Figura 2B: *Western Blotting* utilizando como anticorpo primário o anti- rBanLec-like (1:3000), e como secundário anti- igG de rato conjugado com peroxidase (1:6000). 1- Marcador de peso molecular de proteínas (Rainbow protein marker full range – BioRad®); 2- rBanLec-like; 3- nBanLec; 4- Lectina do quiabo.

5.8 Dicroísmo circular

Na Figura 3A e 3B é possível ver os espectros de DC das lectinas BanLec e rBanLec-like solubilizadas tanto em água quanto em tampão. O DC das lectina mostra um grande pico negativo em 220 nm, que é característico de proteínas com predominância de estrutura de folhas Beta. O conteúdo da estrutura secundária foi estimado usando o programa SELCON 2, e os resultados indicam que a estrutura folha Beta está presente em aproximadamente 55% da estrutura da proteína. Pode-se concluir também que não há diferença quando as lectinas foram solubilizadas com água ou tampão.

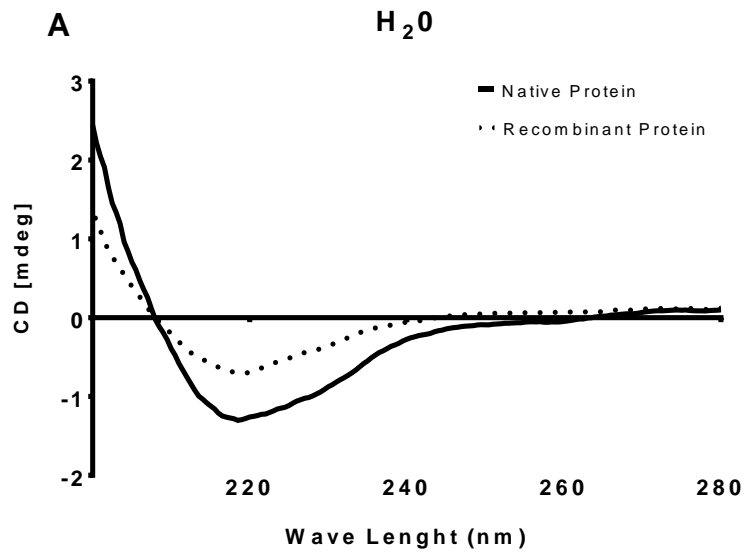


Figura 3A: Dicroísmo circular com as lectinas rBanLec-like e nBanLec, quando solubilizadas em água.

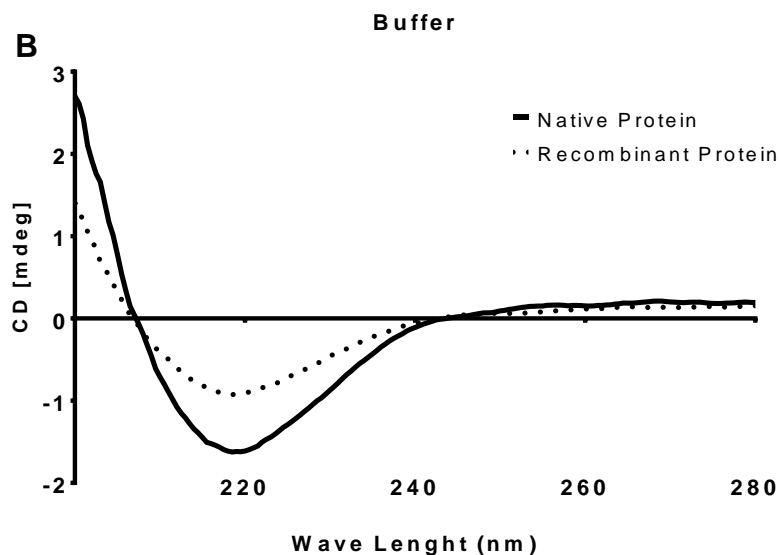


Figura 3B: Dicroísmo circular com as lectinas rBanLec-like e nBanLec, quando solubilizadas em tampão Tris-HCL.

5.9 Teste de hemaglutinação

No teste de hemaglutinação com as três lectinas, a menor concentração (em $\mu\text{g/ml}$) de proteína testada que ainda aglutinou eritrócitos foi considerada como 1 unidade hemaglutinante (UHA). A lectina nBanlec mostrou aglutinar os eritrócitos de rato com UHA de $2,031\mu\text{g/ml}$. Já a rBanLec-like não mostrou aglutinar os eritrócitos de rato, sugerindo que há algum problema em sua

atividade. A lectina de quiabo, como esperado através da literatura, não hemaglutinou os eritrócitos (Figura 4).

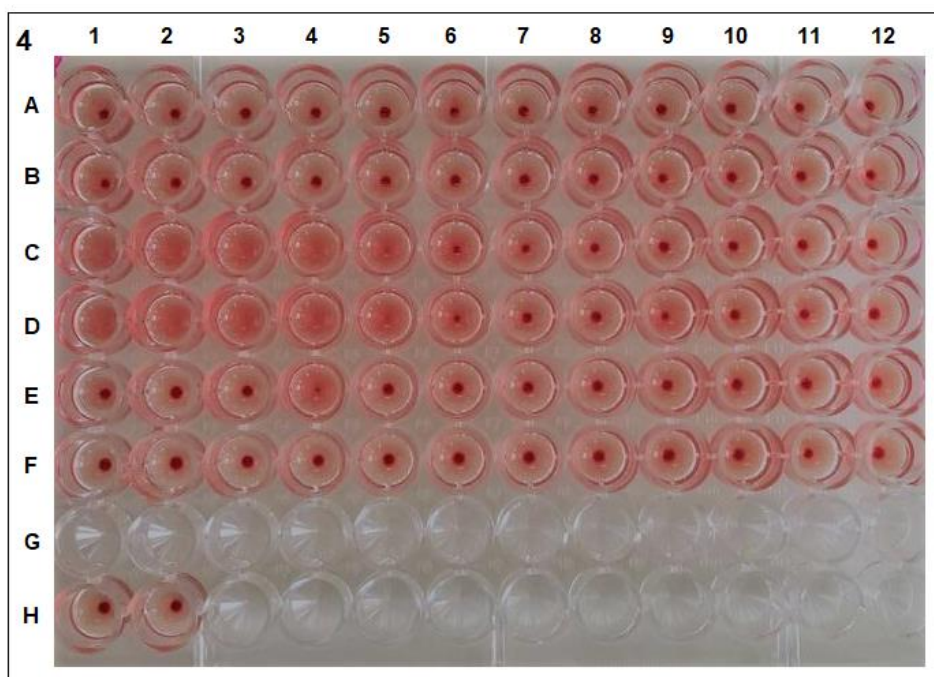


Figura 4: Teste de hemaglutinação das lectinas vegetais, rBanLec-like, nBanLec e a lectina de quiabo, em eritrócitos de rato (*Rattus norvegicus*). A1-A12 e B1-B12 rBanLec-like (65 ug/ml – 15 ng/ml); C1-C12 e D1-D12 nBanLec (65 ug/ml – 15 ng/ml); E1-E12 e F1-F12 lectina do quiabo (65 ug/ml – 15 ng/ml) e H1, H2 controle com PBS.

5.10 Ensaio de citotoxicidade

No ensaio de citotoxicidade da lectina rBanLec-like foi utilizado diferentes concentrações da proteína, de 1 mg/ml a 3,9 µg/ml, e mesmo assim não foi possível encontrar uma dose tóxica para as células. Em todas as concentrações a viabilidade celular se manteve acima de 80%. Apenas as concentrações de 1 mg/ml e 500 µg/ml foram diferentes do controle de células ($p < 0,05$) (Figura 5A). Como controle adotou-se apenas o cultivo das células em meio E-MEM.

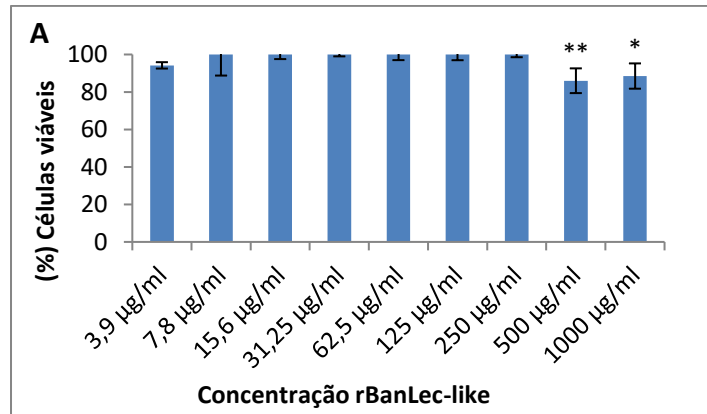


Figura 5A: Citotoxicidade da lectina rBanLec-like com diferentes concentrações em células MDBK, por 24h. Foi adotado: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Já no ensaio de citotoxicidade da BanLec nativa, foi utilizado diferentes concentrações da proteína, de 500µg/ml a 1,95µg/ml e foi possível observar concentrações acima de 62,5µg/ml apresentaram menor viabilidade celular quando comparadas ao controle ($p < 0,05$). (Figura 5B).

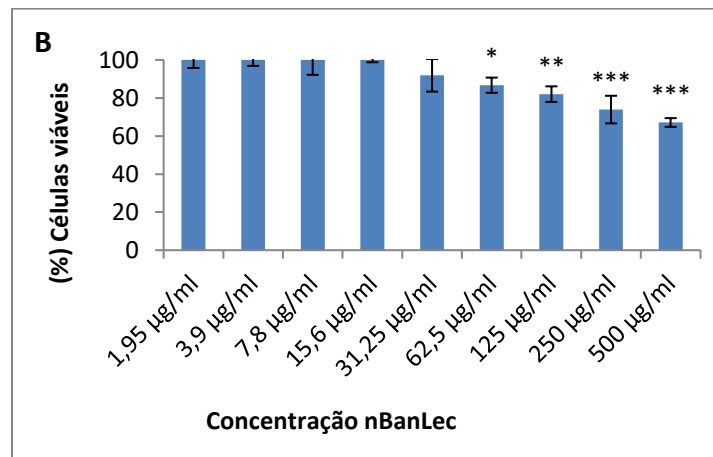


Figura 5B: Citotoxicidade da lectina nBanLec com diferentes concentrações em células MDBK, por 24h. Foi adotado: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Para o ensaio de citotoxicidade da lectina do quiabo, foi utilizado diferentes concentrações da proteína, de 500µg/ml a 3,9µg/ml. Apenas a menor concentração testada se igualou ao controle de células no que diz respeito à viabilidade celular ($p > 0,05$). Todas as demais diferiram ($p < 0,05$). (Figura 5C).

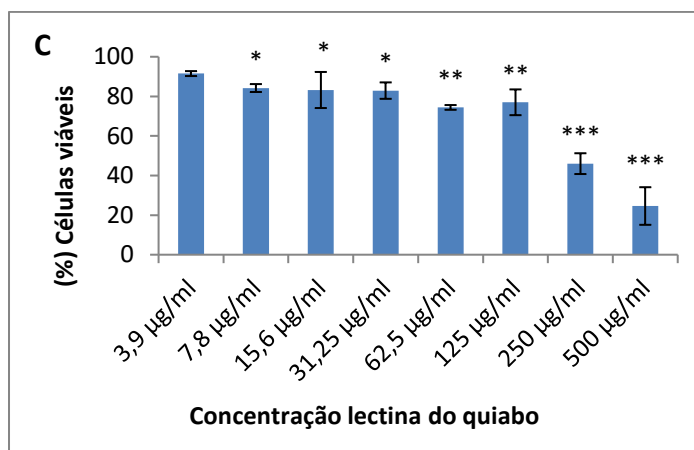


Figura 5C: Citotoxicidade da lectina do quiabo com diferentes concentrações em células MDBK, por 24h. Foi adotado: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.11 Ensaio da atividade antiviral frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV)

5.11.1 Antes da infecção viral

Os resultados do ensaio realizados com a lectina rBanLec-like antes da infecção viral, frente ao vírus BVDV estão representados da Figura 6A. No que diz respeito à viabilidade celular após o experimento, observa-se que apenas o tratamento utilizando 12,5 µg/ml de rBanLec-like, apresentou maior viabilidade que o controle de células infectadas e não tratadas ($p < 0,05$), porém com apenas 70% de viabilidade quando comparada ao controle de células não tratadas e não infectadas. Os títulos virais permaneceram com poucas alterações em todos os tratamentos, demonstrando ausência de atividade antiviral contra BVDV. Os percentuais de inibição estão alocados na Tabela 1.

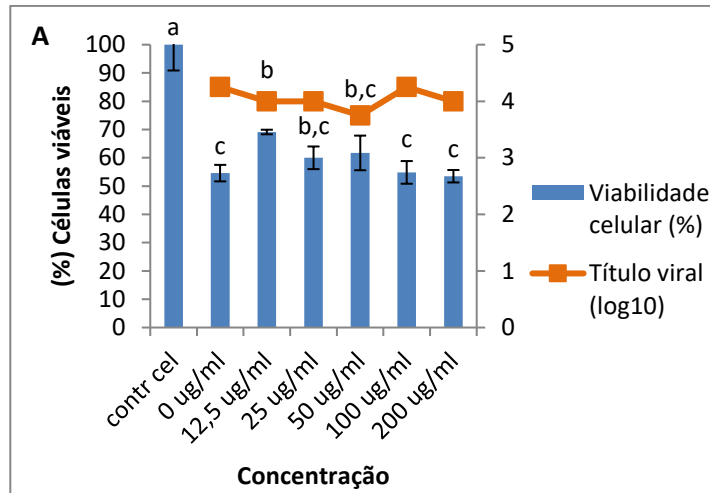


Figura 6A: Ensaio de atividade antiviral da proteína rBanlec-like frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV) antes da infecção viral, após 72h. Letras diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística pelo teste LSD ($p < 0,05$).

Quanto aos resultados da nBanLec representados na Figura 6B, observa-se queda do título viral conforme há o aumento da concentração da proteína como tratamento. Na maior concentração testada (200 µg/ml) o percentual de inibição viral (Tabela 2) chega a 99,98%, porém a viabilidade celular se iguala ao controle de células apenas infectadas. Isso pode ser explicado pela toxicidade apresentada pela proteína (Figura 6B), que diminuindo o número de células aptas à replicação viral, menores títulos virais seriam encontrados. As concentrações imediatamente anteriores (50 e 100 µg/ml) permitiram viabilidades celulares iguais ao controle de células ($p > 0,05$) e quedas nos títulos virais: PI: 98,22% e 98,82%, respectivamente.

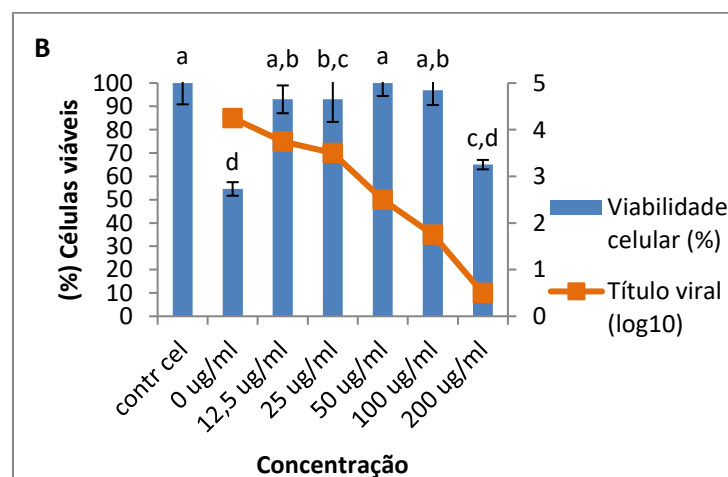


Figura 6B: Ensaio de atividade antiviral da proteína nBanLec frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV) antes da infecção viral, após 72h. *Letras diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística pelo teste LSD ($p < 0,05$).*

Nos resultados da atividade antiviral da lectina de quiabo contra o BVDV antes da infecção viral (Figura 6C), foi possível observar alta toxicidade da proteína em relação a concentração de 200 $\mu\text{g/ml}$ (resultados que corroboram com os testes de citotoxicidade). No entanto, as células que se apresentam como viáveis à sua exposição à lectina podem estar em processo de agressão por outros mecanismos que ainda não levaram à morte e, aliado à infecção viral, a viabilidade foi menor que das células que apenas foram infectadas ($p < 0,05$). Os percentuais de inibição estão alocados na Tabela 3.

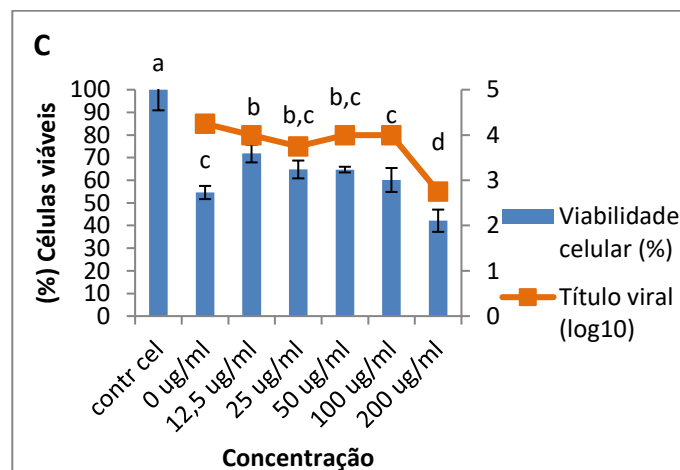


Figura 6C: Ensaio de atividade antiviral da lectina do quiabo frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV) antes da infecção viral, após 72h. *Letras diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística pelo teste LSD ($p < 0,05$).*

5.11.2 Depois da infecção viral

No resultado da atividade antiviral da lectina rBanLec-like depois da infecção viral do BVDV (Figura 7A) Os resultados demonstram inibição viral de mais de 90% (Tabela 1), no entanto, não houve, em nenhuma das concentrações, diferença de viabilidade celular quando comparado ao controle

de células apenas infectadas ($p>0,05$). Dessa forma, não houve atividade antiviral.

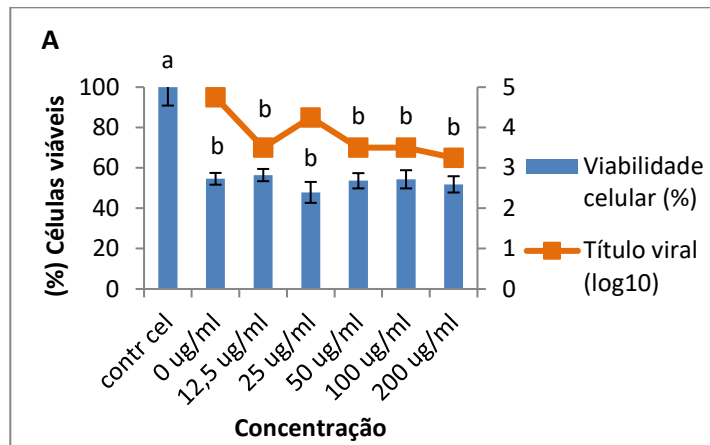


Figura 7A: Ensaio de atividade antiviral da proteína rBanlec-like frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV) depois da infecção viral, após 72h. Letras diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística pelo teste LSD ($p<0,05$).

Já nos resultados obtidos com a lectina nBanLec, contra o vírus BVDV depois da infecção viral (Figura 7B), observa-se significativa queda no título viral. A concentração 25 $\mu\text{g/ml}$ de nBanLec merece destaque por ser a menor concentração que apresentou viabilidade celular igual ao controle de células ($p>0,05$) e percentual de inibição de inibição viral de 99,96% (Tabela 2). As concentrações superiores apresentaram queda na viabilidade celular, provavelmente devido à citotoxicidade da nBanLec, porém isso somado ao efeito viral diminuiu drasticamente as viabilidades e, por não haver células em abundância para replicação viral, o título viral permaneceu baixo.

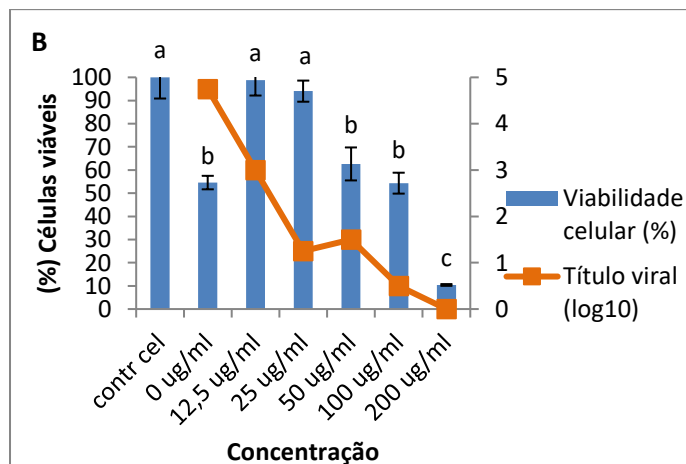


Figura 7B: Ensaio de atividade antiviral da proteína nBanLec frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV) depois da infecção viral, após 72h. *Letras diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística pelo teste LSD ($p < 0,05$).*

Nos resultados da atividade antiviral da lectina do quiabo frente ao vírus BVDV depois da infecção viral (Figura 7C), observa-se que todas as concentrações testadas apresentaram viabilidade celular igual ou inferior ao controle de células infectadas, o que se explica pela toxicidade do próprio produto na concentração mais elevada (200 $\mu\text{g/ml}$) e assim, cursando com poucas células disponíveis para replicação vírica e dessa forma acarretando um baixo título viral. Nas concentrações menores (com ausência de citotoxicidade segundo a redução do MTT), não houve atividade antiviral, já que as viabilidades celulares não diferem do controle de vírus ($p > 0,05$) e o título viral é pouco modificado. Os percentuais de inibição viral estão alocados na Tabela 3.

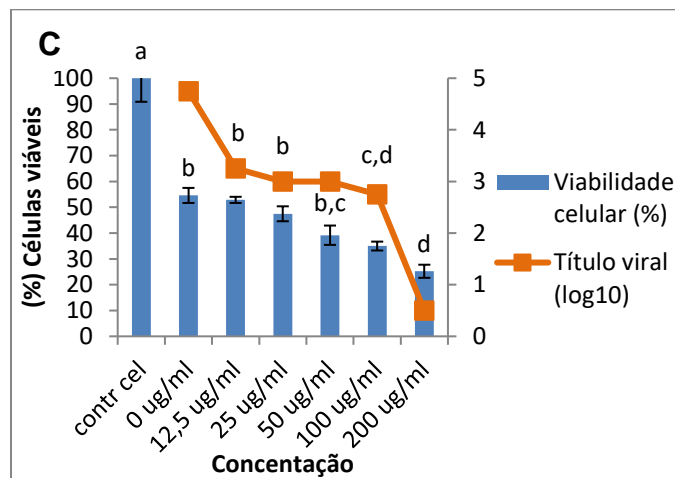


Figura 7C: Ensaio de atividade antiviral da lectina do quiabo frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV) depois da infecção viral, após 72h. *Letras diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística pelo teste LSD ($p < 0,05$).*

5.12 Ensaios da atividade antiviral frente ao Herpesvírus Bovino (BoHV-1)

5.12.1 Antes da infecção viral

Nos resultados da atividade antiviral da rBanLec-like frente ao vírus BoHV-1 antes da infecção viral (Figura 8A), podemos observar que a apenas a concentração de 200µg/ml não teve diferença significativa quando comparado ao controle de células infectadas. Podemos afirmar que a lectina rBanLec-like não teve atividade antiviral frente ao BoHV-1 antes da infecção viral, e a viabilidade celular se manteve a baixo de 73%. Os percentuais de inibição viral estão alocados na tabela 1.

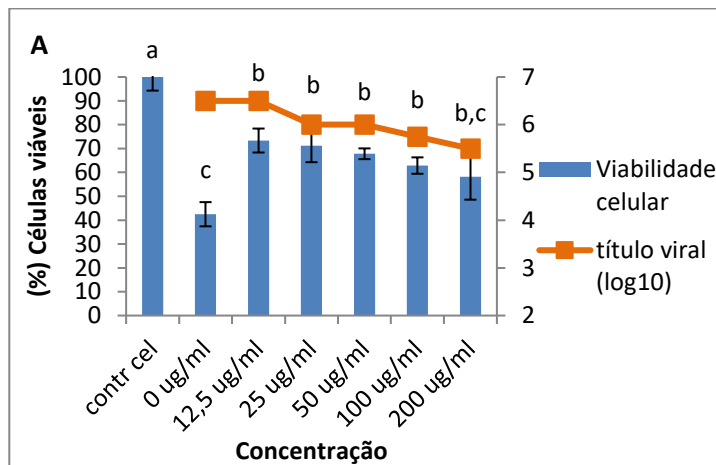


Figura 8A: Ensaio de atividade antiviral da proteína rBanLec-like frente ao Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) antes da infecção viral, após 72h. Letras diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística pelo teste LSD ($p < 0,05$).

Já no resultado da atividade antiviral da nBanLec frente ao vírus BoHV-1 antes da infecção (Figura 8B), nota-se queda do título viral inversamente proporcional à concentração da proteína. As viabilidades celulares se mantiveram elevadas (acima dos 90%) em todas as concentrações avaliadas e, na maior concentração (200 µg/ml) houve PI de 99,98%. A concentração de 100 µg/ml foi a mais alta que apresentou viabilidade celular igual ao controle ($p > 0,05$) e um PI: 96,83% (Tabela 2).

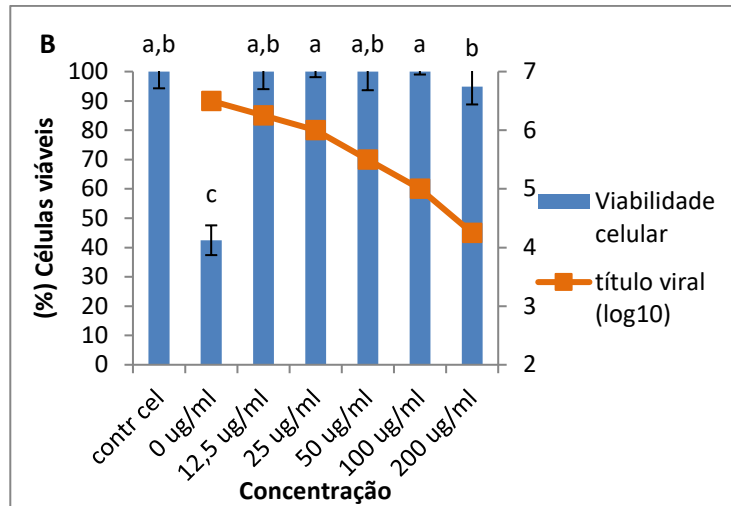


Figura 8B: Ensaio de atividade antiviral da proteína nBanLec frente ao Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) antes da infecção viral, após 72h. Letras diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística pelo teste LSD ($p < 0,05$).

O resultado da atividade antiviral da lectina do quiabo frente ao vírus BoHV-1 antes da infecção viral (Figura 8C), demonstra queda do título viral logo na menor concentração utilizada, porém nenhuma das concentrações apresentou viabilidade celular comparada ao controle celular. Além disso, o título viral não foi alterado com a elevação da dose da proteína, indicando que, o tratamento de células antes da infecção com BoHV-1 com até 200 µg/ml de lectina de quiabo, não apresenta atividade antiviral. Os percentuais de inibição estão alocados na Tabela 3.

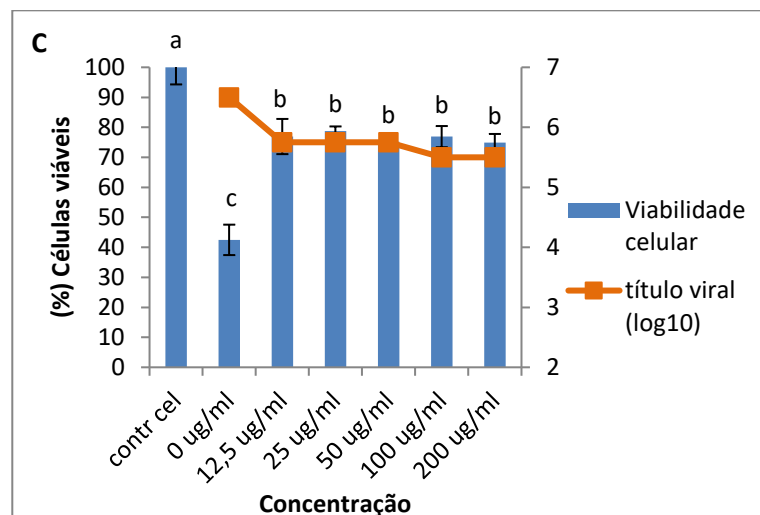


Figura 8C: Ensaio de atividade antiviral da lectina do quiabo frente ao Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) antes da infecção viral, após 72h. *Letras diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística pelo teste LSD ($p < 0,05$).*

5.12.2 Depois da infecção viral

Nos resultados da atividade antiviral da lectina rBanLec-like frente ao vírus BoHV-1 depois da infecção viral (Figura 9A), não houve nenhuma concentração com diferença significativa estatisticamente quando comparadas ao controle de vírus, não tendo assim atividade antiviral. Os valores do percentual de inibição estão presentes na Tabela 1.

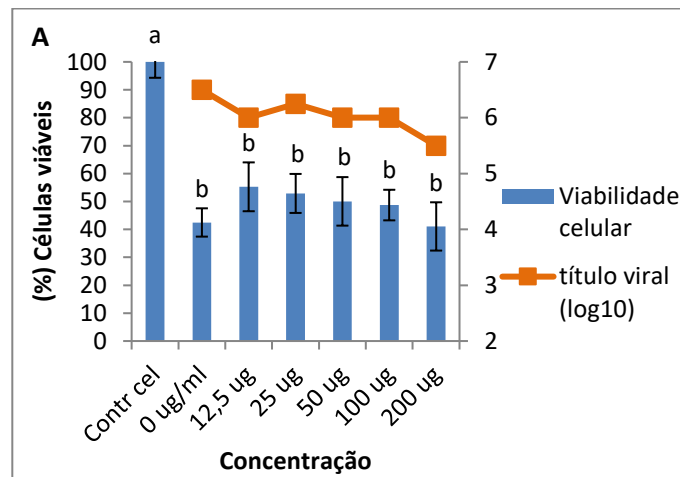


Figura 9A: Ensaio de atividade antiviral da proteína rBanlec-like frente ao Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) depois da infecção viral, após 72h. *Letras diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística pelo teste LSD ($p < 0,05$).*

Nos resultados da atividade antiviral da lectina nBanLec frente ao vírus BoHV-1 depois da infecção (Figura 9B), é possível observar uma grande queda no título viral, com destaque para concentração de 25 $\mu\text{g/ml}$, onde teve uma alta viabilidade celular sendo igual estatisticamente ao controle de células, e com percentual de inibição (Tabela 2) de 99,68%. É possível também observar uma certa toxicidade da proteína na concentração de 100-200 $\mu\text{g/ml}$, tendo a viabilidade celular menor que no controle de vírus.

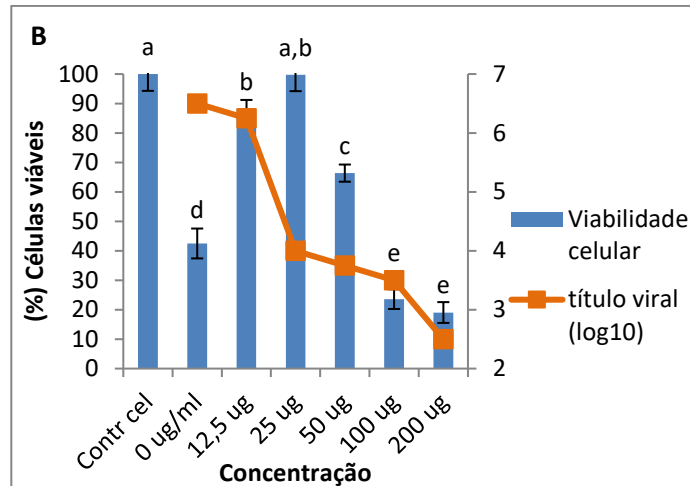


Figura 9B: Ensaio de atividade antiviral da proteína nBanLec frente ao Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) depois da infecção viral, após 72h. Letras diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística pelo teste LSD ($p < 0,05$)

Já no resultado da atividade antiviral da lectina do quiabo frente ao vírus BoHV-1 depois da infecção viral (Figura 9C), podemos dar destaque a concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$, que manteve uma viabilidade celular consideravelmente alta, com um percentual de inibição (Tabela 3) de 96,83%. Observamos também que as concentrações entre 100-200 $\mu\text{g/ml}$ não tiveram diferença significativa quando comparadas ao controle de vírus.

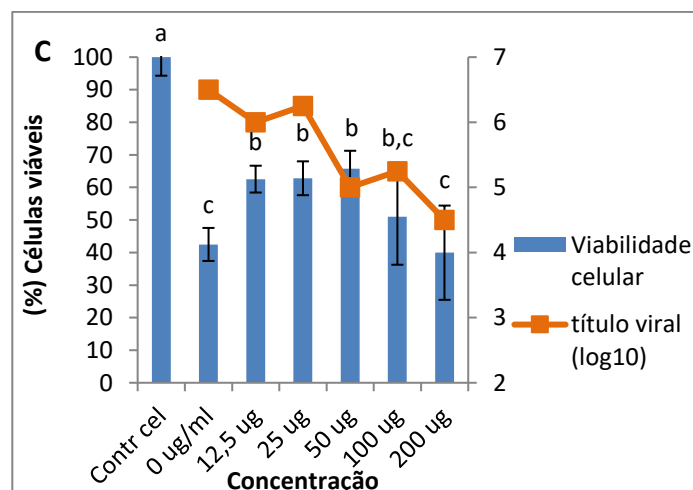


Figura 9C: Ensaio de atividade antiviral da lectina do quiabo frente ao Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) depois da infecção viral, após 72h. Letras diferentes sobre as colunas indicam diferença estatística pelo teste LSD ($p < 0,05$).

Tabela 1: Percentual de inibição do Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) após atuação da rBanLec-like sobre as células antes e depois da infecção, após 72h.

Concentração rBanLec-like	BVDV		BoHV-1	
	Antes	Depois	Antes	Depois
0 ug	0	0	0	0
12,5 ug	43,76	94,37	0	68,37
25 ug	43,76	68,37	68,37	43,76
50 ug	68,37	94,37	68,37	68,37
100 ug	0	94,37	82,21	68,37
200 ug	43,76	96,83	90	90

Tabela 2: Percentual de inibição do Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) após atuação da nBanLec sobre as células antes e depois da infecção, após 72h.

Concentração nBanLec	BVDV		BoHV-1	
	Antes	Depois	Antes	Depois
0 ug	0	0	0	0
12,5 ug	68,37	98,22	43,76	43,76
25 ug	82,21	99,96	68,37	99,68
50 ug	98,22	99,94	90	99,82
100 ug	99,82	99,99	96,83	99,9
200 ug	99,98	100	99,43	0

Tabela 3: Percentual de inibição do Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) após atuação da lectina do quiabo sobre as células antes e depois da infecção, após 72h.

Concentração Quiabo	BVDV		BoHV-1	
	Antes	Depois	Antes	Depois
0 ug	0	0	0	0
12,5 ug	43,76	96,83	82,21	68,37
25 ug	68,37	98,22	82,21	43,76
50 ug	43,76	98,22	82,21	96,83
100 ug	43,76	99	90	94,37
200 ug	96,83	99,99	90	99

5.13 Atividade virucida

Os resultados da atividade virucida da lectina rBanLec-like, frente aos vírus BVDV e BoHV-1 (Figura 10A), demonstram queda considerável no título

viral dos dois vírus, mostrando um percentual de inibição diretamente proporcional ao tempo de incubação do vírus com a proteína, dando destaque a incubação com o vírus BVDV como mostra a Tabela 4.

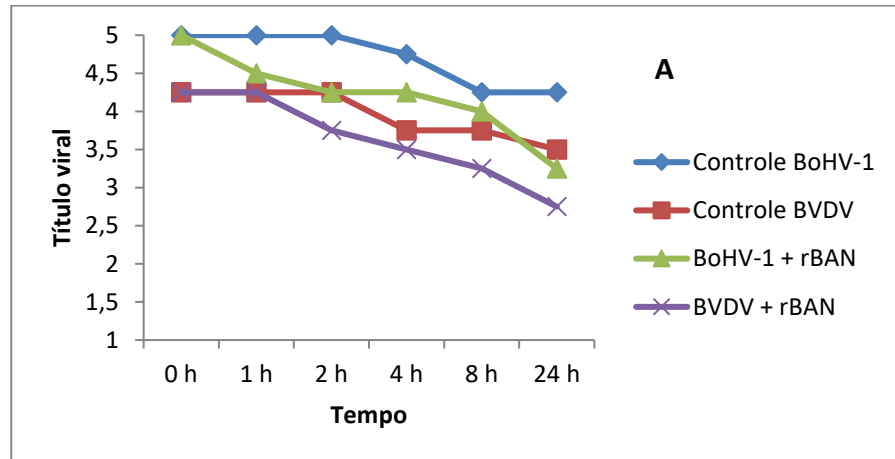


Figura 10A: Atividade virucida da lectina rBanLec-like frente ao vírus da Diarreia viral bovina (BVDV) e Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1), em diferentes tempos a 22° C.

Tabela 4: Percentual de inibição do Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em diferentes tempos a 22°C pela rBanLec-like.

	0 h	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h
Controle BoHV-1	0	0	0	43,76	82,21	82,21
Controle BVDV	0	0	0	68,37	68,37	82,21
BoHV-1 + rBAN	0	68,37	82,21	82,21	90	98,22
BVDV + rBAN	0	0	68,37	82,21	90	96,83

Nos resultados da atividade virucida da lectina nBanLec frente aos dois vírus BVDV e BoHV-1 (Figura 10B), é possível visualizar uma queda no título viral tanto contra o BVDV quanto para o BoHV-1, onde o percentual de inibição foi aumentando ao passar do tempo, com destaque para o BVDV que o percentual em 24h chegou a 99,68% (Tabela 5).

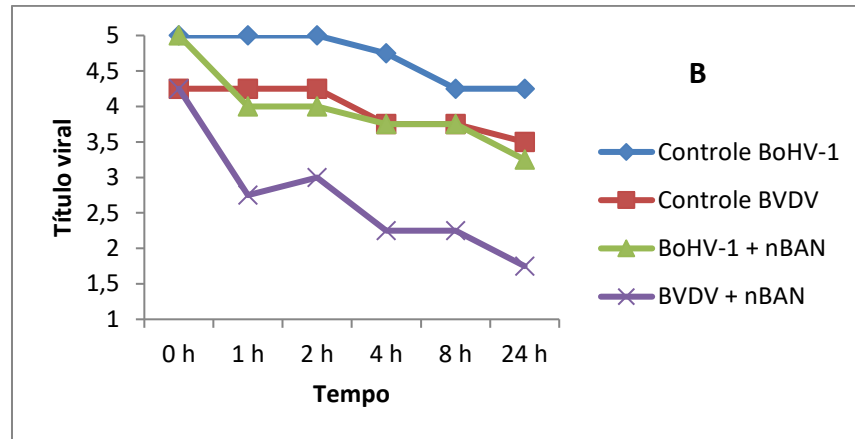


Figura 10B: Atividade virucida da lectina nBanLec frente ao vírus da Diarreia viral bovina (BVDV) e Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1), em diferentes tempos a 22 °C.

Tabela 5: Percentual de inibição do Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em diferentes tempos a 22°C pela nBanLec.

	0 h	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h
Controle BoHV-1	0	0	0	43,76	82,21	82,21
Controle BVDV	0	0	0	68,37	68,37	82,21
BoHV-1 + nBAN	0	90	90	94,37	94,37	98,22
BVDV + nBAN	0	96,83	94,37	99	99	99,68

Nos resultados da atividade virucida da lectina do quiabo frente aos vírus BVDV e BoHV-1 (Figura 10C), também foi possível observar uma queda no título viral dos dois vírus, e o percentual de inibição aumentou conforme o tempo, com destaque ao vírus BoHV-1, em que o percentual chegou a 96,83% em 24h (Tabela 6).

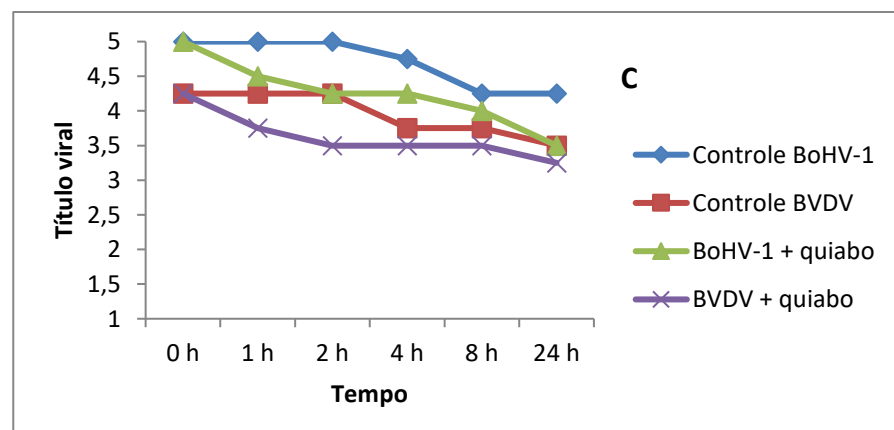


Figura 10C: Atividade virucida da lectina do quiabo frente ao vírus da Diarreia viral bovina (BVDV) e Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1), em diferentes tempos, a 22 °C.

Tabela 6: Percentual de inibição do Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em diferentes tempos a 22°C pela lectina do quiabo.

	0 h	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h
Controle BoHV-1	0	0	0	43,76	82,21	82,21
Controle BVDV	0	0	0	68,37	68,37	82,21
BoHV-1 + quiabo	0	68,37	82,21	82,21	90	96,83
BVDV + quiabo	0	68,37	82,21	82,21	82,21	90

6. Discussão

O presente trabalho foi realizado com três lectinas de origem vegetal, a lectina do quiabo, lectina BanLec nativa e nova lectina recombinante rBanLec-like, essas proteínas foram testadas para verificação da atividade antiviral das mesmas, frente a dois vírus de grande importância veterinária, vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1).

A expressão de lectinas em bactéria geralmente forma corpúsculos de inclusão, que consistem de proteínas recombinantes desnaturadas agregadas por pontes dissulfeto intra e intermoleculares incorretas. É imprescindível a utilização de métodos durante a purificação que promovam a formação de pontes dissulfeto para a recuperação de uma lectina com dobramento (*fold*ing) correto e biologicamente ativa (VOHRA et al., 2007). Outro aspecto relevante é a dificuldade de renovar a proteína após a purificação em condições desnaturantes. Para obtenção da lectina recombinante de banana rBanLec-like de forma solúvel, foi realizado o *refolding* na coluna de níquel, forma que possibilitou a sua utilização nos demais ensaios em condições não desnaturantes.

Em ensaios prévios com a lectina rBanLec-like pelo nosso grupo de pesquisa, dados ainda não publicados (Anexo A), foi observado assim como no presente estudo, que a sua citotoxicidade não foi encontrada com a concentração de até 1mg/ml, e mostrou possuir atividade antiviral, com um grande potencial, frente aos dois vírus (BVDV e BoHV-1), nas concentrações de 25, 50 e 100µg/ml, onde o tratamento de células com a proteína recombinante depois da infecção viral apresentou maior inibição viral do que antes da infecção viral (Anexo A). Além disso nota-se melhor efeito da lectina recombinante frente ao BoHV-1 quando comparado ao seu efeito sobre o BVDV, principalmente quando o tratamento das células se deu após a infecção, em que todas as concentrações da proteína tiveram um percentual de inibição de 100% para o vírus BoHV-1(Anexo A).

Os resultados da atividade antiviral não foram os mesmos quando repetidos neste estudo, em que a proteína rBanLec-like não mostrou resultados promissores contra os dois vírus tratados. Esta diferença pode ser explicada pelo fato de que nos ensaios prévios as células MDBK utilizadas para

replicação viral estavam contaminadas com um biótipo do vírus BVDV não-citopatogênico, o que não causa lesões celulares visíveis à microscopia, porém pode comprometer receptores celulares responsáveis pela penetração viral. Além disso a lectina recombinante não aglutinou eritrócitos de rato (diferentemente da nBanLec), mostrando-se assim sem sua atividade biológica característica (Figura 4). Os resultados do dicroísmo circular mostram que a proteína rBanLec-like teve sua estrutura alterada, quando comparada com a proteína nativa (Figura 3A e 3B).

A perda da atividade da proteína pode ter sido assim, devido a alguma mudança em sua estrutura tridimensional, essa mudança pode ter ocorrido durante o processo de expressão da proteína, devido a formação de corpos de inclusão (antes mencionado). Algum problema no processo de purificação da lectina também pode levar a uma conformação errada, principalmente na etapa de *refolding*.

Assim, a proteína rBanLec-like neste estudo não apresentou atividade antiviral satisfatória, quando comparada com a proteína nBanLec. A estrutura da proteína está diretamente envolvida com a sua atividade, em estudos recentes com a proteína rBanLec frente ao vírus do HIV, foi possível afirmar que a lectina que é um tetrâmero, possui sítios de ligação a glicanos nos quatro cantos da estrutura, permitindo que a lectina se ligue a glicanos do envelope viral, cada sítio de ligação facilita a forte interação bidentada com apenas um glicano rico em manose, e cada sítio de ligação em cada monômero são igualmente essenciais para o reconhecimento de cada glicano (HOPPER et al., 2017). Portanto qualquer mudança conformacional que acabe afetando os seus sítios de ligação a carboidratos, conseqüentemente pode afetar sua atividade. Desta forma, como visto na figura 3A e 3B, é possível que a estrutura da rBanLec-like tenha sofrido alteração e como resultado houve uma diminuição ou total extinção de ligação aos receptores nos vírus testados. É sabido que a glicoproteína gp120 é o alvo preferencial das JCL que possivelmente liga a porção glicídica desta proteína.

Na Figura 2A e 2B podemos ver que a banda da rBanLec-like com aproximadamente 15 kDa está um pouco mais a baixo da banda da nBanLec com 12 kDa, isto pode ser explicado pelo fato da lectina recombinante ter a calda de histidina em sua sequência. A lectina do quiabo com uma banda de

aproximadamente 10 kDa também foi observada, assim como em outros estudos encontrados na literatura (SOARES et al., 2012; KLAFKE et al., 2013; MONTE et al., 2014; FREITAS et al., 2016; RIBEIRO et al., 2016).

Na técnica de WB realizada com o anticorpo anti-rBanLec-like, onde a banda da proteína da banana recombinante e a proteína nativa apareceram na membrana de nitrocelulose, indicando que a rBanLec-like de fato manteve ao menos porções semelhantes antigenicamente à nBanLec.

A proteína nativa BanLec apresentou atividade antiviral contra os dois vírus trabalhados neste estudo, com uma grande queda no título viral, ambos, antes e depois da infecção. No ensaio antiviral feito com os dois vírus antes da infecção os melhores resultados foram com concentrações maiores da proteína, para o BVDV, a concentração de 50 µg/ml teve destaque com o PI de 98,22% e viabilidade igual estatisticamente ao controle de célula. Já para o BoHV-1 a concentração de 100 µg/ml teve destaque, com PI de 99,68% e alta viabilidade celular, se igualando também ao controle de células, assim como com o BVDV. No ensaio antiviral depois da infecção as concentrações que tiveram destaque, para ambos os vírus foi de 25 µg/ml, que teve como PI 99,98% e 99,68%, para o BVDV e BoHV-1, respectivamente.

Os ensaios realizados depois da infecção com a nBanLec tiveram uma maior toxicidade em relação aos realizados antes da infecção, sendo tóxica na concentração de 50-200 µg/ml para o BVDV e, 100-200 µg/ml para o BoHV-1.

No teste de citotoxicidade realizado com a lectina do quiabo, foi possível observar que nas concentrações de 250-500 µg/ml a proteína foi tóxica para as células, porém nos ensaios antivirais a lectina apresentou ser tóxica em menores concentrações, principalmente depois da infecção viral, assim como a nBanLec, em que esta diferença de toxicidade pode ser devido ao maior tempo de incubação das células com estas lectinas. A lectina do quiabo teve um percentual de inibição viral de quase 100% na sua maior concentração (200 µg/ml), porém apresentou toxicidade, diminuindo drasticamente a viabilidade celular. Na literatura não há estudos que avaliaram a atividade antiviral desta lectina até a presente data.

O mecanismo de ação antiviral das lectinas, em testes realizados antes da infecção viral, que indicam uma possível prevenção viral pelas lectinas, é bem elucidado na literatura, onde a lectina se liga ao capsídeo viral, impedindo

a entrada do vírus nas células, consequentemente impedindo a infecção viral (SWANSON et al., 2010; SWANSON et al., 2015; HOPPER et al., 2017). Porém o mecanismo de ação antiviral das lectinas, em testes realizados depois da infecção viral, que indicam um possível tratamento com a lectina, não é elucidado pela literatura, principalmente pelo interesse dos autores em achar uma prevenção para a infecção viral, em sua maioria, para vírus de grande importância humana como o HIV, e não seu tratamento. Por este motivo, novos testes com outros métodos mais específicos precisam ser realizados para elucidar e estudar melhor o mecanismo de ação das lectinas, bem como saber em que parte da replicação viral elas estão atuando, quando tratadas depois da infecção viral nas células.

O teste de atividade virucida da lectina rBanLec-like mostrou uma diminuição do título viral, com destaque ao BVDV que teve 82,21% em 2h de incubação, isto mostra que a proteína pode não ter perdido sua total atividade, sua conformação alterada pode enfraquecer ligações, gerando uma baixa atividade, ou até que haja proteínas funcionais e outras não, na mesma amostra utilizada, até mesmo por serem de diferentes expressões e purificações.

Já no teste de atividade virucida da lectina nBanLec, diferente da recombinante, teve uma grande queda do título viral quando incubada com os dois vírus, onde em 1h se teve um PI de 90% e 96,83 para o BoHV-1 e BVDV, respectivamente. Os resultados que tiveram maior PI foram relacionados ao vírus BVDV, tanto para nativa, quanto para recombinante.

No teste virucida com a lectina de quiabo podemos observar uma queda considerável do título viral, com destaque ao BoHV-1, que em 24h o PI chegou a 96,83%. Todas as lectinas utilizadas neste trabalho apresentou ser um bom agente desinfetante.

7. Conclusão

A lectina nBanLec foi capaz de inibir os vírus testados mesmo em baixas concentrações, porém a lectina rBanLec-like parece ter perdido sua conformação correta durante as etapas de purificação, o que resultou em uma atividade diferente da nativa. Já a lectina do quiabo parece ter uma atividade reduzida, diferente da nBanLec, o que pode ser resultado do tipo de sítio de ligação a carboidrato desta lectina. Portanto novos ensaios são necessários para resolver o problema da baixa atividade da proteína recombinante, assim como novos métodos, como a citometria de fluxo, para compreender o mecanismo de ação da atividade antiviral das lectinas, principalmente depois da infecção viral.

8. Referências

- A. RIBEIRO, Kátia et al. Alpha-2 Adrenergic and Opioids Receptors Participation in Mice Gastroprotection of *Abelmoschus esculentus* Lectin. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 22, n. 30, p. 4736–4742, 2016.
- AMBROSI, Moira; CAMERON, Neil R.; DAVIS, Benjamin G. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. **Organic & Biomolecular Chemistry**, [s. l.], v. 3, n. 9, p. 1593, 2005.
- ARNAUD, Julie; AUDFRAY, Aymeric; IMBERTY, Anne. Binding sugars: from natural lectins to synthetic receptors and engineered neolectins. **Chemical Society Reviews**, [s. l.], v. 42, n. 11, p. 4798, 2013.
- BERG, Jeremy M.(Jeremy Mark) et al. **Biochemistry**. [s.l.] : W.H. Freeman, 2002.
- BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 119, n. 3091, p. 419, 1954.
- BROWNLIE, J. The pathogenesis of bovine virus diarrhoea virus infections. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 43–59, 1990.
- CHEUNG, Allen H. K.; WONG, Jack H.; NG, T. B. *Musa acuminata* (Del Monte banana) lectin is a fructose-binding lectin with cytokine-inducing activity. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 16, n. 6–7, p. 594–600, 2009.
- CHINTU RAVISHANKAR, SUKDEB NANDI, Vishal Chander & Tapas Kumar Mohapatra. Concurrent testing of breeding bulls for bovine herpesvirus 1 infection (BHV-1) in India. **Veterinaria Italiana**, [s. l.], v. 49492145, n. 2, 2013.
- COELHO, Luana Cassandra Breitenbach Barroso et al. Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, [s. l.], v. 2017, p. 1594074, 2017.
- COLLETT, M. S.; MOENNIG, V.; HORZINEK, M. C. Recent Advances in Pestivirus Research. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 70, n. 2, p. 253–266, 1989.
- DAMME, Els J. M. Van et al. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 575–692, 1998.
- DUBOVI, E. J. Genetic diversity and BVD virus. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 155–62, 1992.
- FINO, T.C.M.; MELO, C.B.; RAMOS A.F.; LEITE, R. C. **Infecções por herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e suas implicações.pdf**. [s.d.].
- FLORES, Eduardo F. et al. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no

Brasil: histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 125–134, 2005.

FREED, D. L. Lectins. **British medical journal (Clinical research ed.)**, [s. l.], v. 290, n. 6468, p. 584–6, 1985.

FREITAS, Raul Sousa et al. Lectin from *Abelmoschus esculentus* reduces zymosan-induced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats via heme oxygenase-1 pathway integrity and $\text{tnf-}\alpha$ and $\text{il-1}\beta$ suppression. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 38, p. 313–323, 2016.

FULTON, R. W.; BURGE, L. J. Bovine viral diarrhea virus types 1 and 2 antibody response in calves receiving modified live virus or inactivated vaccines. **Vaccine**, [s. l.], v. 19, n. 2–3, p. 264–74, 2000.

GAVROVIC-JANKULOVIC, Marija et al. A novel recombinantly produced banana lectin isoform is a valuable tool for glycoproteomics and a potent modulator of the proliferation response in CD3+, CD4+, and CD8+ populations of human PBMCs. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [s. l.], v. 40, n. 5, p. 929–941, 2008.

GRAHAM, David A. Bovine herpes virus-1 (BoHV-1) in cattle—a review with emphasis on reproductive impacts and the emergence of infection in Ireland and the United Kingdom. **Irish veterinary journal**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 15, 2013.

GUPTA, Garima; SINHA, Sharmistha; SUROLIA, Avadhesha. Unfolding energetics and stability of banana lectin. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [s. l.], v. 72, n. 2, p. 754–760, 2008.

HOPPER, Jonathan T. S. et al. The Tetrameric Plant Lectin BanLec Neutralizes HIV through Bidentate Binding to Specific Viral Glycans. **Structure (London, England : 1993)**, [s. l.], v. 25, n. 5, p. 773–782.e5, 2017.

JONES, Clinton. Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. **Clinical microbiology reviews**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 79–95, 2003.

KLAFKE, Gabriel Baracy et al. Assessment of Plant Lectin Antifungal Potential Against Yeasts of Major Importance in Medical Mycology. **Mycopathologia**, [s. l.], v. 175, n. 1–2, p. 147–151, 2013.

KOSHTE, V. L. et al. Isolation and characterization of BanLec-I, a mannoside-binding lectin from *Musa paradisiaca* (banana). **The Biochemical journal**, [s. l.], v. 272, n. 3, p. 721–6, 1990.

LAM, Sze Kwan; NG, Tzi Bun. Lectins: production and practical applications. **Applied microbiology and biotechnology**, [s. l.], v. 89, n. 1, p. 45–55, 2011.

LIU, Xiao-Yu; LI, Huan; ZHANG, Wei. The lectin from *Musa paradisiaca* binds with the capsid protein of tobacco mosaic virus and prevents viral infection. **Biotechnology, biotechnological equipment**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 408–416, 2014.

MARINKOVIC, Emilija et al. Modulation of functional characteristics of resident and thioglycollate-elicited peritoneal murine macrophages by a recombinant banana lectin. **PloS one**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. e0172469, 2017.

MEAGHER, Jennifer L. et al. Crystal structure of banana lectin reveals a novel second sugar binding site. **Glycobiology**, [s. l.], v. 15, n. 10, p. 1033–1042, 2005.

METTENLEITER, Thomas C. Budding events in herpesvirus morphogenesis. **Virus Research**, [s. l.], v. 106, n. 2, p. 167–180, 2004.

MOLLEMA, L. et al. Quantification of the transmission of bovine herpesvirus 1 among red deer (*Cervus elaphus*) under experimental conditions. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 111, n. 1–2, p. 25–34, 2005

MONTE, Leonardo G. et al. Lectin of *Abelmoschus esculentus* (okra) promotes selective antitumor effects in human breast cancer cells. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 461–469, 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, [s. l.], v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MUYLKENS, Benoît et al. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Research**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 181–209, 2007.

NANDI, S. et al. Bovine herpes virus infections in cattle. **Animal Health Research Reviews**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 85–98, 2009.

NANDI, S. et al. Serological Evidences of Bovine Herpesvirus-1 Infection in Bovines of Organized Farms in India. **Transboundary and Emerging Diseases**, [s. l.], v. 58, n. 2, p. 105–109, 2011.

SILVA, Luis Claudio et al. Cratylia mollis Lectin: A Versatile Tool for Biomedical Studies. **Current Bioactive Compounds**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 44–54, 2014.

COSTA, Eduardo et al. BoHV-1 (o vírus da IBR) e sua relação com estruturas e órgãos genitais da fêmea bovina. [s. l.], v. 41, n. 1, p. 254–263, 2017.

PETERHANS, Ernst; SCHWEIZER, Matthias. Pestiviruses: How to outmaneuver your hosts. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 142, n. 1–2, p. 18–25, 2010.

PEUMANS, Willy J. et al. Fruit-specific lectins from banana and plantain. **Planta**, [s. l.], v. 211, n. 4, p. 546–554, 2000. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s004250000307>>. Acesso em: 22 out. 2017.
PITUCO, EDVIGES M. **Aspectos clínicos, prevenção e controle da IBR**. [s.d.].

RADOSTITS, O. M.; DONE, Stanley H. **Veterinary medicine : a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats, and horses**. [s.l.] : Saunders Elsevier, 2007.

REED, L. J.; MUENCH, H. A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS¹². **American Journal of Epidemiology**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 493–497, 1938.

ROCHA, Maurilio Andrade; GOUVEIA, Aurora Maria Guimarães; LEITE, Rômulo Cerqueira. Herpesvírus bovino tipo 1 no sêmen. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 373–380, 1999.

ROIZMANN, B. et al. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of virology**, [s. l.], v. 123, n. 3–4, p. 425–49, 1992.

RÜDIGER, H.; GABIUS, H. J. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate journal**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 589–613, 2001.

SANKARANARAYANAN, Rajan et al. A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plant lectin with a β -prism fold. **Nature Structural Biology**, [s. l.], v. 3, n. 7, p. 596–603, 1996.

SANSONE, Ana Claudia Miranda Brito et al. Oral administration of banana lectin modulates cytokine profile and abundance of T-cell populations in mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 89, p. 19–24, 2016.

SHARMA, Alok; VIJAYAN, Mamannamana. Quaternary association in beta-prism I2 fold plant lectins: insights from X-ray crystallography, modelling and molecular dynamics. **Journal of biosciences**, [s. l.], v. 36, n. 5, p. 793–808, 2011.

SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins--a large family of homologous proteins. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, [s. l.], v. 4, n. 14, p. 3198–208, 1990.

SHARON, Nathan. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 282, n. 5, p. 2753–64, 2007.

SHEPARD, Colin W.; FINELLI, Lyn; ALTER, Miriam J. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 5, n. 9, p. 558–567, 2005.

SINGH, D. D. et al. Unusual sugar specificity of banana lectin from *Musa paradisiaca* and its probable evolutionary origin. Crystallographic and modelling studies. **Glycobiology**, [s. l.], v. 15, n. 10, p. 1025–1032, 2005.

SINGH, Senjam; DEVI, Sanjenbam; NG, Tzi. Banana Lectin: A Brief Review. **Molecules**, [s. l.], v. 19, n. 11, p. 18817–18827, 2014. Disponível em:

<<http://www.mdpi.com/1420-3049/19/11/18817/>>. Acesso em: 2 out. 2017.

SIX, A. et al. Latency and reactivation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) in goats and of caprine herpesvirus 1 (CapHV-1) in calves. **Archives of virology**, [s. l.], v. 146, n. 7, p. 1325–35, 2001.

SOARES, Geórgia et al. Purification and Biological Activities of *Abelmoschus esculentus* Seed Lectin. **The Protein Journal**, [s. l.], v. 31, n. 8, p. 674–680, 2012.

STRAUSS, E. J. A virus joins the movement. Intracellular pathogens. **Current biology : CB**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 504–7, 1996.

SWANSON, Michael D. et al. A lectin isolated from bananas is a potent inhibitor of HIV replication. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 285, n. 12, p. 8646–55, 2010.

SWANSON, Michael D. et al. Engineering a therapeutic lectin by uncoupling mitogenicity from antiviral activity. **Cell**, [s. l.], v. 163, n. 3, p. 746–58, 2015.

BAKER. J.C. The Clinical Manifestations of Bovine Viral Diarrhea Infection. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 425–445, 1995.

SILVA, Alessandra Cardoso. **Uso da lectina do Quiabo (*Abelmoschus esculentus*) como marcador da célula espermática ovina**. 2016. 28f. Dissertação (Mestrado em Ciências - área de concentração: Sanidade Animal) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

VAN DAMME, Els J. M.; LANNOO, Nausicaa; PEUMANS, Willy J. Plant Lectins. In: [s.l: s.n.]. p. 107–209.

VANDENBORRE, Gianni; SMAGGHE, Guy; VAN DAMME, Els J. M. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 13, p. 1538–1550, 2011. D

VOHRA, Ravinder S. et al. Functional refolding of a recombinant C-type lectin-like domain containing intramolecular disulfide bonds. **Protein expression and purification**, [s. l.], v. 52, n. 2, p. 415–21, 2007.

WONG, J.; NG, T. Isolation and characterization of a glucose/mannose-specific lectin with stimulatory effect on nitric oxide production by macrophages from the emperor banana. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 234–243, 2006.

WOROBAY, Michael; HOLMES, Edward C. Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 80, n. 10, p. 2535–2543, 1999.

YAMAJI, Yasuyuki et al. Lectin-mediated resistance impairs plant virus infection at the cellular level. **The Plant cell**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 778–93, 2012.

Anexo A

ATIVIDADE ANTIVIRAL DA LECTINA rBANLEC-LIKE CONTRA O VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA E HERPESVÍRUS BOVINO TIPO- 1

LAURA JUNQUEIRA DE CAMARGO¹; RAFAEL CAGLIARI²; AMILTON CLAIR PINTO SEIXAS NETO³; TONY PICOLI³; GEFERSON FISCHER³; LUCIANO DA SILVA PINTO³

¹Laboratório de Bioinformática e Proteômica, Biotecnologia, CDTec, UFPel - laurajcamargo@gmail.com

²Laboratório de Bioinformática e Proteômica, Biotecnologia, CDTec, UFPel - rafael.cagliari22@gmail.com

³Laboratório de Bioinformática e Proteômica, Biotecnologia, CDTec, UFPel - amilton.seixas@gmail.com

³Laboratório de Virologia e Imunologia, Faculdade de Veterinária, UFPel- picolivet@gmail.com

³Laboratório de Virologia e Imunologia, Faculdade de Veterinária, UFPel - geferson.fischer@gmail.com

³Laboratório de Bioinformática e Proteômica, Biotecnologia, CDTec, UFPel – ls_pinto@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Lectinas são proteínas bioativas que se ligam reversivelmente a carboidratos. Essas proteínas são encontradas natureza em organismos de diferentes níveis de complexidade, e funcionam no reconhecimento de moléculas em vários processos biológicos (MU *et al.*, 2017). São classificadas em 5 famílias estruturais, baseado no dobramento de polipeptídios (SINGH, D. D. *et al.*, 2004). Uma dessas famílias é conhecida na literatura por lectinas relacionada a Jacalina (LRJs), em que uma de suas representantes é a lectina da Musa acuminata, popularmente conhecida como banana. Essa lectina possui afinidade a manose e glicose, tendo seu tamanho com aproximadamente 15 KDa, seu monômero com 30KDa e sua estrutura tetramérica recentemente descoberta com 60KDa (HOPPER *et al.*, 2017).

A lectina de banana já demonstrou atividade imunomoduladora, atividade antifúngica, atividade antiproliferativa (SINGH, S.; DEVI; NG, 2014) e atividade antiviral, com ação comprovado sobre o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (SWANSON *et al.*, 2010; HOPPER *et al.*, 2017). Essa última atividade foi explorada neste trabalho utilizando uma variante da lectina da banana desenvolvida após análises de sequências de LRJs, obtendo assim a lectina rBanlec-like (REIS *et al.*, 2014).

O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) pertence à família *Herpesviridae* e possui como material genético DNA de fita dupla linear, e é capaz de entrar em latência, principalmente nos gânglios trigêmeo e sacral, voltando a se manifestar com situações de estresse. A principal manifestação clínica associada a este vírus é a rinotraqueíte infecciosa bovina, relacionada à sintomatologia respiratória, porém são os sintomas reprodutivos que mais geram prejuízos econômicos à pecuária, assim como o vírus da diarreia viral bovina (BVDV), um pestivírus da família *Flaviviridae*, que tem seu genoma constituído por uma fita simples de RNA. Este vírus está associado à formação de animais persistentemente infectados que não apresentam sinais clínicos nem anticorpos contra o vírus, dificultando o diagnóstico e disseminando o vírus pelo rebanho (WEISS *et al.*, 2016).

Sendo assim, torna-se importante a busca e pesquisa para obtenção de novas drogas/compostos antivirais. Objetivou-se, assim, avaliar a atividade antiviral da rBanlec-like contra o BoHV-1 e BVDV.

2. METODOLOGIA

A proteína recombinante foi produzida conforme descrito previamente por Reis (2014). A Lectina foi purificada por cromatografia de afinidade ao níquel e depois foi dialisada contra água destilada. Posteriormente a proteína foi liofilizada, e quantificada pelo método de BCA comercial (Pierce/Thermo Sci.). Após a quantificação se analisou a proteína recombinante por SDS-PAGE e pela técnica de Western Blot, juntamente com uma alíquota purificada da proteína nativa para comparação. Para revelação do Western Blot se utilizou o anticorpo anti rBanlec-like produzido previamente (CAMARGO *et al.*, 2016).

Para avaliação da atividade antiviral da rBanlec-like, foi utilizada linhagem celular MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) por ser permissíveis aos vírus estudados (BoHV-1 cepa Los Angeles e BVDV cepa NADL). Meio Essencial Mínimo com sais de Eagle (E-MEM) acrescido de antibióticos foi utilizado para diluição dos compostos e vírus e, para cultivo celular, E-MEM foi suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células MDBK foram cultivadas em placas de poliestireno de 96 cavidades (KASVI®, Brasil) em temperatura de 37°C em ambiente com 5% de CO₂, até o estabelecimento de monocamada.

O teste de citotoxicidade da proteína se deu através do ensaio de redução do MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo), segundo Mosmann (1983). A leitura se deu através de espectrofotometria sob comprimento de onda de 545 nm. Os testes foram realizados em triplicata e como controle foram utilizadas células com E-MEM, não expostas à proteína.

Três concentrações da proteína foram selecionadas para os ensaios antivirais (25, 50 e 100 µg/ml). Após cultivo de células MDBK em microplacas por 24 horas, as células foram submetidas ao tratamento com a lectina por 24 horas e após foram infectadas com 0,1 MOI (multiplicity of infection) de BoHV-1 e BVDV e, após 72 horas de incubação as placas foram congeladas. Células cultivadas em microplacas da mesma maneira foram previamente expostas a 0,1 MOI de BoHV-1 e BVDV por duas horas, permitindo a infecção viral e, após o meio foi aspirado e as células foram expostas aos tratamentos com a proteína por 72 horas, quando a placa foi congelada. O descongelamento permite o rompimento das células e liberação de todo conteúdo vírico intracelular. Após foi realizada a titulação viral através do método de Reed e Muench (1938). Foram calculados os percentuais de inibição (PI) virais através da fórmula: $[1 - (\text{antilog tratamento} / \text{antilog controle})] \times 100$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A rBanlec-like foi expressa com aproximadamente 16,5 KDa, seu tamanho molecular esperado, sendo próximo ao da proteína nativa. A proteína recombinante foi purificada e liofilizada com sucesso. Tanto a recombinante quanto a nativa reconheceram o anticorpo anti-rBanlec-like.

No teste de citotoxicidade, a maior concentração avaliada (1 mg/ml) determinou viabilidade celular de 88%, portanto não foi possível estabelecer uma concentração tóxica da proteína para células MDBK, portanto, as concentrações para o teste antiviral foram determinadas com base em resultados prévios obtidos pelo nosso grupo de pesquisa.

Em um estudo com a lectina banlec, frente ao HIV, constatou-se a atividade antiviral da proteína. Houve a inibição da entrada do vírus nas células através da ligação da lectina com as glicoproteínas presentes no envelope viral (SWANSON *et al.*, 2010; HOPPER *et al.*, 2017). Esses autores encontraram resultados satisfatórios inserindo a proteína nas células antes da infecção com os vírus. Ao contrário, os resultados do presente estudo demonstram maior eficiência antiviral da lectina quando adicionada após a infecção. A Figura 1 demonstra as atividades antivirais da rBanlec-like quando adicionada sobre às células antes e após a infecção com BoHV-1 e BVDV.

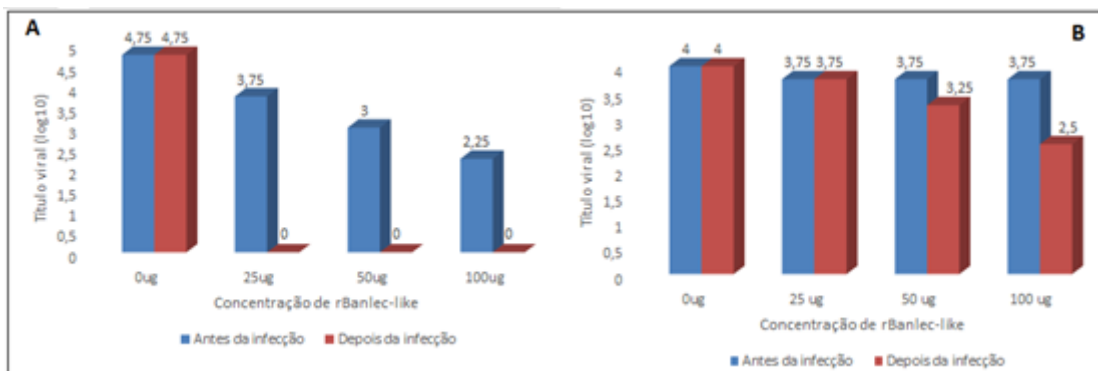


FIGURA 1: Ensaio antiviral com as diferentes concentrações de rBanlec-like, antes e depois da infecção viral com: A- BoHV-1 e B- BVDV.

Nota-se o melhor efeito da lectina frente ao BoHV-1 quando comparado ao efeito sobre o BVDV, principalmente quando a o tratamento das células se deu após a infecção. A Tabela 1 demonstra os percentuais de inibição dos vírus.

Tabela 1. Percentuais de inibição do Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) após atuação da rBanlec-like sobre as células antes e após a infecção

Concentrações rBanlec-like	BoHV-1		BVDV	
	antes infecção (%)	após infecção (%)	antes infecção (%)	após infecção (%)
25 µg/ml	90	100	43.77	43.77
50 µg/ml	98.22	100	43.77	82.22
100 µg/ml	99.68	100	43.77	96.84

4. CONCLUSÕES

A proteína rBanlec-like foi expressa e purificada com sucesso. O teste da atividade antiviral da rBanlec-like teve resultado promissor, porém necessita de novas repetições para comprovar os resultados obtidos, bem como testar a proteína nativa para comparação da atividade antiviral. Por fim deve-se buscar o mecanismo de ação da lectina sobre os vírus.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAMARGO, L. Expressão da Lectina rBanlec-like e Produção de anticorpo policlonal para Caracterização e Ensaios Futuros. In: XXV CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS. Pelotas, 2016. Biológicas, Pelotas: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, 2016.

HOPPER, J. T. S. *et al.* The Tetrameric Plant Lectin BanLec Neutralizes HIV through Bidentate Binding to Specific Viral Glycans. **Structure (London, England : 1993)**, 2 maio. 2017. v. 25, n. 5, p. 773–782.e5.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, 16 dez. 1983. v. 65, n. 1–2, p. 55–63.

MU, J. *et al.* A Novel High-Mannose Specific Lectin from the Green Alga *Halimeda renshii* Exhibits a Potent Anti-Influenza Virus Activity through High-Affinity Binding to the Viral Hemagglutinin. **Marine drugs**, 16 ago. 2017. v. 15, n. 8.

REED, L. J.; MUENCH, H. A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS¹². **American Journal of Epidemiology**, 1 maio. 1938. v. 27, n. 3, p. 493–497.

REIS, L.B. Expressão heteróloga de uma nova lectina sintética baseada na lectina Banlec de *Musa accuminata*. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, 23, Pelotas, 2014. Biológicas, Pelotas: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, 2014. p. 1-2.

SINGH, D. D. *et al.* Purification, crystallization and preliminary X-ray structure analysis of the banana lectin from *Musa paradisiaca*. **Acta Cryst**, 2004. v. 60, p. 2104–2106.

SINGH, S.; DEVI, S.; NG, T. Banana Lectin: A Brief Review. **Molecules**, 17 nov. 2014. v. 19, n. 11, p. 18817–18827.

SWANSON, M. D. *et al.* A Lectin Isolated from Bananas Is a Potent Inhibitor of HIV Replication. **Journal of Biological Chemistry**, 19 mar. 2010. v. 285, n. 12, p. 8646–8655.

WEISS, M. *et al.* Safety and immunogenicity of a glycoprotein E gene-deleted bovine herpesvirus 1 strain as a candidate vaccine strain. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, nov. 2016. v. 36, n. 11, p. 1067–1074.