

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO P34 EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES

FERNANDES, Maureen Hoch Vieira¹; SCOPEL, Débora¹; CASTRO, Clarissa Caetano¹; MOTTA, Amanda de Souza²; HÜBNER, Silvia de Oliveira¹.

1 Laboratório de Virologia e Imunologia (Labvir) – Faculdade de Veterinária, UFPel, Pelotas/RS, Brasil

2 Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Faculdade de Veterinária, UFPel, Pelotas/RS, Brasil

maureenhvfernandes@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

Os microorganismos são capazes de produzir uma variedade extraordinária de sistemas de defesa (Riley e Wertz, 2002), dentre eles, os peptídeos microbianos aparecem como importantes componentes na imunidade inata de uma variedade de seres vivos (Hancock e Lehrer, 1998). A atividade microbiana dos peptídeos é deduzida através de testes *in vitro* analisando substâncias purificadas contra microorganismos, e foi descoberto que peptídeos microbianos têm um amplo espectro de ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, bem como contra fungos e vírus envelopados (Bals, 2000). Esses peptídeos são normalmente pequenos (< 10 kDa), e possuem comprimento, estrutura e seqüência variáveis (Reddy et al, 2004).

Recentemente na região da Bacia Amazônica, foi isolada no conteúdo intestinal do peixe Piau-com-pinta (*Liporinus* sp) uma nova espécie de *Bacillus* que apresentou um peptídeo com atividade antimicrobiana. Este peptídeo foi purificado e caracterizado, e identificado como P34. Sua atividade inibitória foi detectada contra bactérias Gram-positivas como a *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* (Motta et al, 2004). Estudos realizados recentemente evidenciaram um grande potencial do peptídeo P34 também sobre um herpesvírus, o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), *in vitro* (Medeiros et al, 2010).

O estudo da biologia desses peptídeos pode permitir o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas contra agentes infecciosos, tendo potencial para superar a resistência que muitos microorganismos já adquiriram contra os medicamentos (Bals, 2000), sendo assim de muita importância a sua pesquisa. Pesquisas para o desenvolvimento de novas drogas antivirais sempre necessitam avaliação da toxicidade em células do hospedeiro.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade do peptídeo antimicrobiano P34 em linhagens celulares CRFK (Crandell Rees feline kidney), RK13 (Rabbit kidney), VERO (African green monkey kidney) e MDBK (Madin-Darby bovine kidney).

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Células CRFK (Crandell Rees feline kidney), RK13 (Rabbit Kidney), VERO (African green monkey kidney) e MDBK (Madin-Darby bovine kidney) foram mantidas em E-MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), enrofloxacina (10mg ml⁻¹) e anfotericina B (0,025 µg ml⁻¹) a 37° C em uma incubadora contendo 5% de CO₂.

Células CRFK, RK13, VERO e MDBK foram preparadas em microplacas de 96 poços e após confluência, 100 µl de diluições seriadas (0,02 - 5µg ml⁻¹) do peptídeo P34 foram adicionadas. Placas foram incubadas com o P34 por 48-72 horas a 37° C em ambiente com 5% de CO₂. A avaliação da citotoxicidade foi avaliada pela análise morfológica, em microscópio invertido, e por ensaio com vermelho neutro, que determina a viabilidade celular.

Inicialmente a citotoxicidade foi avaliada pela observação microscópica de alterações caracterizadas pela desorganização do tapete celular, bem como pelo aspecto granuloso e arredondado das células, e conseqüente aparecimento de alterações morfológicas. As alterações morfológicas foram acompanhadas diariamente.

Vermelho neutro é um corante capturado somente por células viáveis (Borenfreund e Puerner, 1984). Após tratamento com P34 durante 48 horas foi retirado o E-MEM sobrenadante dos poços e adicionado meio contendo 3.3 mg l⁻¹ de vermelho neutro. Após 2 horas a 37° C/5% de CO₂, o meio foi removido e as células lavadas com E-MEM. O corante incorporado foi solubilizado pela adição de 100 µL de uma solução contendo etanol 50%, ácido acético 1% e água destilada q.s.p. A placa foi agitada por 10 minutos, e foi realizada a leitura das densidades ópticas em um espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. A percentagem de viabilidade foi calculada mediante a fórmula $AT/AC \times 100$, sendo AT e AC a absorbância dos tratados e a absorbância dos controles, respectivamente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração não tóxica do peptídeo foi variável nos diferentes tipos celulares. As linhagens celulares que permitiram uma concentração mais elevada do peptídeo P34 foram a RK13 e a MDBK que suportaram diluições 1:260/1:280. Essas concentrações não apresentaram alteração nas células quando visualizadas em microscopia. As linhagens VERO e necessitaram de uma menor concentração do peptídeo para não apresentarem toxicidade, com ausência de alterações celulares nas diluições 1:400 e 1:500, respectivamente.

No ensaio de vermelho neutro, obteve-se 87% de células viáveis na cultura de CRFK, 92% na cultura de MDBK, 99,6% na cultura de RK13 e 100% de células viáveis na cultura de VERO, nas concentrações acima descritas.

4 CONCLUSÃO

A determinação da citotoxicidade exercida por peptídeos antimicrobianos é uma fase essencial e de extrema importância para garantir o uso seguro, e para posteriores estudos da atividade do P34 como terapêutica antiviral.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALS, R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. **Respiratory Research**, v.1, p. 141–50, 2000.

BORENFREUND, E., PUERNER, J.A. A simple quantitative procedure using monolayer culture for toxicity assays. **Journal of Tissue Culture Methods**, v. 9, n.1, p.7-9, 1984.

HANCOCK, R. E.; LEHRER, R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. **Trends in Biotechnology**, v.16, n.2, p. 82–88, 1998.

MEDEIROS, D. M. ; SANT ANNA, V. ; BRANDELLI, A. ; MOTTA, A.S ; FINGER, P.F ; FISCHER, G ; VARGAS, G.D ; HÜBNER, S. O. Determination of suppressive activity of the antimicrobial peptide p34 isolated from a bacillus strain of the aquatic amazon region on herpesvirus. In: **XXI ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA E V ENCONTRO DE VIROLOGIA DO MERCOSUL**, 2010, Gramado. Anais Virus Reviews & Researchs. Gramado : Gramdno, 2010. v. 15. p. 22-22.

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

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

RILEY, M.A.; WERTZ, J.E. Bacteriocins: evolution, ecology & application. **Annual Review of Microbiology**, v.56, p. 117–137, 2002.