

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, CD Tec, UFPel -
laurajcamargo@gmail.com

²Laboratório de Bioinformática e Proteômica, Biotecnologia, CD Tec, UFPel –
rafael.cagliari22@gmail.com

³Laboratório de Bioinformática e Proteômica, Biotecnologia, CD Tec, 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, CD Tec, UFPel –
ls_pinto@hotmail.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 trigêmio e sacral, voltando a se manifestar com situações de estresse. A principal manifestação clínica associada a este vírus é a rinotraqueite infecciosa bovina, relacionada à sintomatologia respiratória, porém são os sintomas reprodutivos que mais geram prejuízos econômicos à pecuária, assim como o vírus da diarréia 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 Müenich (1938). Foram calculados os percentuais de inibição (PI) virais através da fórmula: [1-(antilog tratamento/antilog controle)] x 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 eficácia 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.

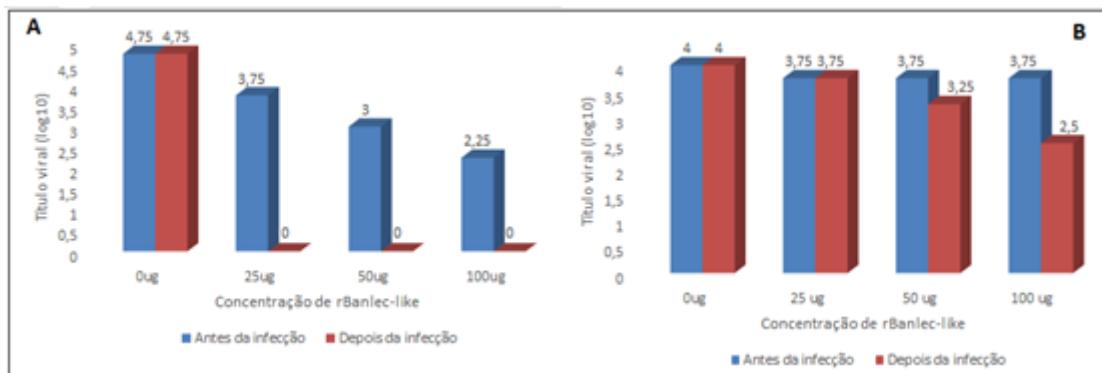


FIGURA 1: Ensaio antiviral com as diferentes concentrações de rBanlec-like, antes e depois da infecção viral com: A- BoHV-1 e B- BVDV.

Nota-se o melhor efeito da lectina frente ao BoHV-1 quando comparado ao efeito sobre o BVDV, principalmente quando a 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 diarréia 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 anticorpopoliclonal paraCaracterização e EnsaiosFuturos. In: XXV Congresso de iniciação científica, da Universidade Federal de Pelotas. Anais..., 2016.

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

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

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

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

REIS, L.B. Expressão heteróloga de uma nova lectina sintética baseada na lectina Banlec de musa acuminate. In: XXIII Congresso de iniciação científica da Universidade Federal de Pelotas, **Anais...**, 2014

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**, v. 19, n. 11, p. 18817–18827, 2014

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

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**, v. 36, n. 11, p. 1067–1074, 2016