

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE LECTINAS VEGETAIS CONTRA O HERPESVÍRUS BOVINO TIPO- 1

ANA CLAUDIA OLIVEIRA DE FREITAS¹; LAURA JUNQUEIRA DE CAMARGO²;
RODRIGO BOZEMBECKER DE ALMEIDA²; GEFERSON FISCHER³; LUCIANO
DA SILVA PINTO³

¹*Laboratório de Bioinformática e Proteômica, CDTec, UFPel -*
anaclaudia.olvf@outlook.com

²*Laboratório de Bioinformática e Proteômica, Biotecnologia, CDTec, UFPel -*
laurajcamargo@gmail.com

² *Laboratório de Virologia e Imunologia, Faculdade de Veterinária, UFPel -*
rodrigobozembecker@gmail.com

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

³*Laboratório de Bioinformática e Proteômica, Biotecnologia, CDTec, UFPel -*
ls_pinto@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Lectinas são um grupo de proteínas que se ligam reversivelmente a diversos tipos de carboidratos e possuem inúmeras atividades biológicas. Essas proteínas são amplamente distribuídas na natureza, fazendo-se presente em organismos de diferentes níveis de complexidade. De acordo com sua estrutura, são classificadas em 5 famílias que diferem entre si devido aos seus dobramentos de polipeptídios (SINGH, D. D. et al., 2004). Dentre as famílias, existe a chamada Lectinas Relacionadas a Jacalina (LRJs), e uma de suas proteínas representantes é a lectina extraída da *Musa acuminata*, rotineiramente chamada de banana. Essa lectina possui afinidade a manose e glicose, possui tamanho de aproximadamente 15 kDa e seu monômero de 30 kDa, sua estrutura tetramérica foi uma descoberta recente e possui 60 kDa (HOPPER et al., 2017).

Algumas das atividades já caracterizadas da lectina de banana estão relacionadas com a atividade imunomoduladora, atividade antifúngica, atividade antiproliferativa (SINGH, S.; DEVI; NG, 2014) e atividade antiviral. Tendo a última com ação comprovada sobre o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (SWANSON et al., 2010; HOPPER et al., 2017). Essa atividade foi explorada neste trabalho utilizando uma variante da lectina da banana desenvolvida após análises de sequências de LRJs, obtendo assim, a lectina rBanLec e ainda comparando sua atividade com a lectina nativa da banana a nBanLec. (REIS et al., 2014).

O herpesvírus bovino tipo- 1 (BoHV-1), é um vírus de DNA fita dupla linear que pertencente à família *Herpesviridae*, está associado a várias manifestações clínicas, sendo a rinotraqueite infecciosa principal manifestação delas. Porém, os problemas causados por esse agente infeccioso que mais gera prejuízo econômicos à pecuária de corte e leiteira é o reprodutivo. O BoHV-1 tem como característica a capacidade de entrar em latência principalmente nos gânglios trigêmio e sacral, podendo voltar a se manifestar em situações de estresse (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 contra o BoHV-1.

2. METODOLOGIA

A proteína recombinante foi produzida conforme descrito por Reis (2014). A nova versão lectina recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade ao níquel e depois foi dialisada em água destilada. Em seguida, a proteína foi liofilizada e quantificada pelo método de BCA comercial (Pierce/Thermo Sci). A proteína recombinante foi analisada por SDS-PAGE e pela técnica de Western Blot, usando uma alíquota purificada da proteína nativa para comparação. Para revelação do Western Blot utilizou-se o anticorpo anti-rBanLec produzido previamente pelo grupo de pesquisa BioPro (CAMARGO et al., 2016).

A lectina nativa é extraída diretamente da banana, através da sua Trituração e homogeneização em PBS contendo 2% de polivinilpirrolidona (PVP). Em seguida passa por centrifugação, precipitação e novamente outra centrifugação. Ao final é feita uma diálise contra água e após uma centrifugação para retirar impurezas. A purificação é feita empregando uma coluna de afinidade, composta de agarose-lactose, logo após é submetida à dialise em água destilada e liofilizada. Posteriormente a proteína nativa também foi caracterizada através das técnicas de SDS-PAGE e Western Blot.

A fim de avaliar a atividade antiviral da rBanLec, foi utilizada linhagem celular MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) por ser permissíveis ao vírus estudado (BoHV-1 cepa Los Angeles). Meio Essencial Mínimo com sais de Eagle (E-MEM) acrescido de antibióticos foi empregado para diluição das lectinas 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 do tapete celular íntegro. Foi realizado um teste prévio de citotoxicidade das proteínas em diferentes concentrações, através do ensaio de redução do MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo), segundo Mosmann (1983). A leitura foi realizada através de espectrofotometria sob comprimento de onda de 545 nm. Os testes foram realizados em duplicata e como controle foram utilizadas células com E-MEM, não expostas às proteínas.

Diferentes concentrações das proteínas, tanto nativa como recombinante foram selecionadas para os ensaios antivirais levando em consideração o ensaio prévio de citotoxicidade (180; 150; 120; 100; 50; 25; 12,5 e de 6 µg/mL em duplicata). Depois do cultivo das células MDBK em placas de 96 cavidades, por 24 horas, foi realizado dois tratamentos, antes e depois da infecção pelo vírus. No tratamento antes da infecção as células foram incubadas com as lectinas por 2 horas e depois infectadas com o vírus por 72 horas. Já depois da infecção, as células foram previamente infectadas com o vírus e depois incubadas com as lectinas por 72h. A concentração do vírus BoHV-1 utilizada foi de 0,1 MOI

(multiplicity of infection). Após a incubação por 72 horas as placas foram submetidas ao teste de MTT para avaliação da viabilidade celular.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As proteínas foram expressas e extraídas com sucesso. Ambas foram purificadas e liofilizadas e foram reconhecidas pelo mesmo anticorpo anti-rBanLec. No teste de citotoxicidade com rBanLec a concentração de 180 μ g/mL apresentou certa toxicidade, com viabilidade celular de 77,99% e assim estabelecemos valores menores para os ensaios antivirais. Já a proteína nativa, a maior concentração de 295 μ g/mL apresentou viabilidade de 62,17%, selecionamos concentrações menores para dar seguimento a pesquisa.

Nos ensaios antivirais a lectina nativa conferiu maior viabilidade celular nos tratamentos quando comparada a recombinante. A concentração de 50 μ g/mL (depois da infecção) da nBanLec foi a concentração que manteve maior viabilidade celular.

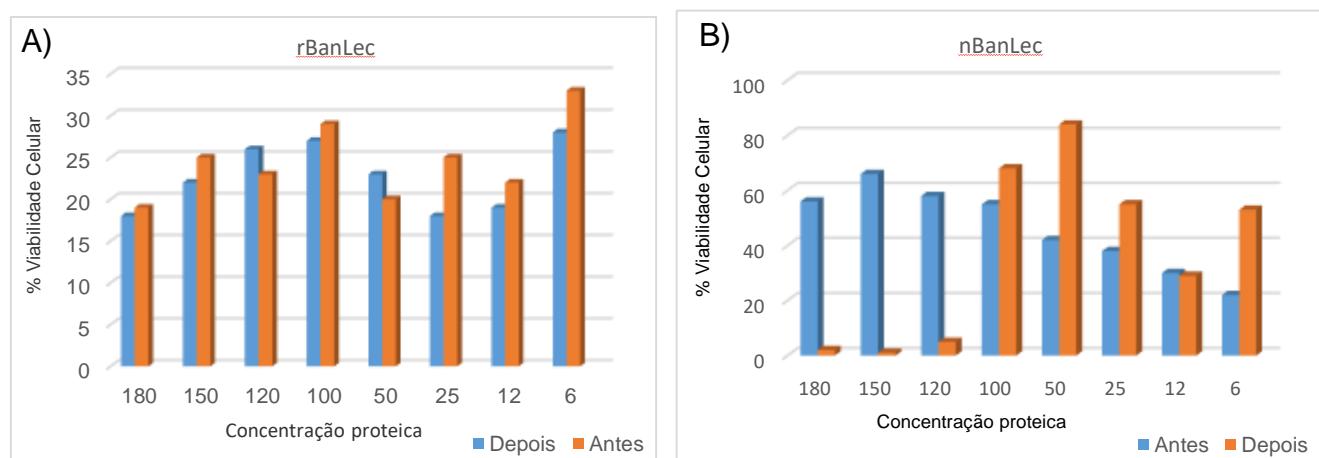


FIGURA 1: Ensaio antiviral, com as diferentes concentrações proteicas de rBanLec (A) e nBanLec (B), antes e depois da infecção com BoHV-1.

A recombinante apresentou viabilidade semelhantes antes e depois da infecção, já a nativa, mostrou uma grande mudança quando comparamos a ordem dos tratamentos, apresentando o maior valor de viabilidade após a infecção viral. As menores viabilidades foram resultantes das concentrações de 180, 150 e 120 μ g/mL da nBanLec depois da infecção, o que pode ser explicado pelo tempo maior de incubação com a proteína (72 horas) em comparação com o tratamento antes da infecção.

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados podemos concluir que a lectina nBanLec foi capaz de inibir o vírus testado, mantendo viabilidade celular relativamente alta, principalmente na concentração de 50 μ g. A rBanLec foi expressa com sucesso, porém parece ter perdido sua conformação correta durante as etapas de

purificação, ou no momento da otimização da sequência in silício, modificando aminoácidos de sítios ativos, resultando em uma atividade diferente da nativa. Por isso, novos ensaios são necessários para avaliação atividade da proteína recombinante.

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. **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.

REIS, L.B. Expressão heteróloga de uma nova lectina sintética baseada na lectina Banlec de musa accuminata. 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**, v. 60, p. 2104–2106. 2004.

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