

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

MÁRCIA CRISTINA CARRIEL GOMES

**TRIAGEM DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL DE
PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E DA HEMOLINFA
DE OSTRAS**

FLORIANÓPOLIS
2005

MÁRCIA CRISTINA CARRIEL GOMES

**TRIAGEM DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL DE
PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E DA HEMOLINFA
DE OSTRAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões.

**FLORIANÓPOLIS
2005**

MÁRCIA CRISTINA CARRIEL GOMES

TRIAGEM DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E DA HEMOLINFA DE OSTRAS

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração: Saúde, e aprovada em sua forma final pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 20 de maio de 2005.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Izabel Chistina de Palmer Paixão Frugulhetti
(Instituto de Biologia/UFF, Niterói/RJ)
Membro

Profa. Dra. Margherita Anna Barraco
(Departamento de Biologia e Embriologia/CCB/UFSC, Fpolis./SC)
Membro

Prof. Dr. Nelson Horácio Gabilan
(Departamento de Bioquímica/CCB/UFSC, Fpolis./SC)
Membro

Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões
(Departamento de Ciências Farmacêuticas/CCS/UFSC, Fpolis./SC - Orientadora)

Prof. Dr. Mário Steindel
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC

Gomes, Márcia Cristina Carriel
Triagem da Potencial Atividade Antiviral de Peptídeos
Antimicrobianos de Hemolinfa de Ostras/ Márcia Cristina Carriel
Gomes. – Florianópolis, UFSC, 2005.
xiii, 89 f. : il. ; 28 cm

Orientadora Cláudia Maria Oliveira Simões
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia, 2005.

Referências bibliográficas: f. 79-89

1. Antiviral. 2. HSV-1. 3. Adenovírus. 4. Rotavírus. 5. Peptídeos
Antimicrobianos. 6. Ostras. I. Simões, Cláudia Maria Oliveira. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia. III. Título.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Aplicada, coordenado pelas Professoras Dras. Cláudia Maria Oliveira Simões (Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS) e Célia Regina Monte Barardi (Departamento de Microbiologia e Parasitologia, CCB), na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.

Este trabalho recebeu apoio financeiro do CNPq / MCT, através do projeto 47.2337/2003-3 (coordenado pela orientadora desta dissertação), e também um aporte de recursos, via o projeto apoiado pela Comunidade Européia (Immunaqua – ICA4 – CT – 2001 – 10023), cuja parceria brasileira foi coordenada pela Profa. Dra. Margherita Anna Barraco.

*Ao meu filho Eduardo.
Por ele pude experimentar a emoção de assumir
a responsabilidade total por outro ser humano,
e aprender a amar e me dedicar no mais alto grau
que nos é permitido.*

AGRADECIMENTOS

À professora Cláudia Maria Oliveira Simões, pelo exemplo de dedicação, competência e profissionalismo, pela confiança e orientação.

À professora Célia Regina Monte Barardi, pelos ensinamentos e conselhos.

À professora Margherita Barraco pela valiosa orientação e por sua inestimável colaboração nesse trabalho e a Sara Löfgren pelo carinho e atenção.

À Dra. Evelyne Bachère (IFREMER, Montpellier, França), à Profa. Dra. Sirley Daffre (Departamento de Parasitologia, ICB, USP/SP) e ao Prof. Dr. Arnaldo Silva Junior (UNICAMP/Campinas, SP) pelos peptídeos gentilmente cedidos.

Ao Prof. Dr. Jaime Fernando Ferreira pelos exemplares das ostras *Crassostrea rhizophorae* provindos do cultivo experimental do Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos (LCMM) CCA/UFSC em Sambaqui, Florianópolis-SC.

Aos criadores de ostras de cultivos comerciais de Cacupé, Santo Antônio e Sambaqui pelos exemplares da ostra *Crassostrea gigas* fornecidos para a realização deste trabalho.

Aos professores Aguinaldo Pinto e Carlos Zanetti nos quais encontrei sempre todo apoio, coragem e amizade que foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

Aos professores Carlos Pinto, Edmundo Grisard, Mário Steindel e Sônia Carobrez por toda a ajuda e sugestões.

A secretaria do programa de pós-graduação em biotecnologia, especialmente Joice e Lígia por toda atenção e paciência.

Aos meus pais, Luiz Carlos e Antônia, por me darem mais esta oportunidade.

Ao Marcos por toda ajuda, carinho, companheirismo e paciência que teve comigo.

Aos meus irmãos, Homero e Isabel, ao meu cunhado, Fred, e sobrinhos, por me apoiarem em mais esta etapa.

À minha grande e inseparável amiga Kellen que não só vem me apoiando nestes longos anos de amizade, mas por todo amor e carinho que vem dando ao Eduardo.

À minha querida Fernanda, e toda a Família Justus por todo carinho e amor dados a nós dois.

As amigas, Mirian, Cristiane e Priscila, amigas de toda vida e para sempre, agradeço ao apoio que me deram em mais uma jornada.

Aos mestres e amigos Élito e Bia que confiaram em mim e me apoiaram.

Ao Marcos, Clio, Marinho, Luda, Rita, Joice, Gil, Norberto, Renata, Ivonete e Toninho pela confiança, pelo apoio e por intercederem por mim.

Ao querido amigo Murilo, que estará sempre em nossos corações.

A Carla, Jadel, Juliana, Thaís e Vanessa pela amizade, incentivo, e auxílio que foram fundamentais no desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos Alessandra, Alexandre, Aline, Cláudia, Cris, Javier, Jean, Leonardo, Luciane, Magali, Melissa e Thiago pelo apoio e inesquecível convívio.

A Larissa, Bruno, Vanessa e Luciano por todos os grandes momentos que tive oportunidade de compartilhar com vocês e pelo apoio que sempre me deram.

Ao inseparável trio Adriana, Ana Paula e Dayse pelo apoio e amizade.

A todos os de mais alunos e ex-alunos do LVA, LIA e PROTO que compartilharam das minhas angústias e alegrias.

A todas as pessoas que contribuíram no desenvolvimento desse trabalho, os quais, direta ou indiretamente, participaram da minha formação como profissional e ser humano.

E principalmente a DEUS por iluminar sempre o meu caminho e enchê-lo de anjos.

Márcia Cristina

RESUMO

Os produtos naturais constituem uma fonte inesgotável de compostos com atividades farmacológicas promissoras, incluindo ação antiviral. Os materiais protéicos são encontrados em abundância na natureza e têm atividades biológicas como antibacteriana, antifúngica, antitumoral e antiviral comprovadas. Neste trabalho, a citotoxicidade (CC_{50}) e a atividade antiviral (CE_{50}) de peptídeos antimicrobianos (PAM) e hemolinfa de ostras (*Crassostrea gigas* e *C. rhizophorae*), foram avaliadas, em células VERO, HEp-2 e MA104 e contra os vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1/KOS), adenovírus sorotipo 5 (AdV-5), rotavírus símio SA-11 (RV-SA11), pelo ensaio colorimétrico do MTT, utilizando diferentes estratégias. Para a hemolinfa das ostras também foi realizado o estudo da ação virucida. Dentre os PAM testados, a peneidina apresentou o maior índice de seletividade ($IS = CC_{50}/CE_{50}$) para o HSV-1/KOS ($IS = 64$). A hemolinfa de ostras apresentou ação virucida contra os três vírus avaliados neste estudo, também apresentando atividade anti-herpética ($IS = 19,76/C. rhizophorae$) e antiadenovírus ($IS = 5,33/C. gigas$), sem, no entanto, exibir ação antiviral contra o rotavírus. Foram observados, em alguns casos, baixos IS, associados a altas porcentagens de inibição da replicação viral, mais evidente no grupo dos PAM. Estudos adicionais devem ser realizados a fim de se confirmar a atividade antiviral e prováveis mecanismos ação.

Palavras-chaves: antiviral, peptídeos antimicrobianos, hemolinfa de ostra, vírus herpes simplex tipo 1, adenovírus, rotavírus.

ABSTRACT

Natural products are an inexhaustible source of compounds with promising pharmacological activities, including antiviral action. The proteic source is widely found in nature, showing biological confirmed activities, as antibiotic, antifungal, antitumoral and antiviral. In the present study, cytotoxicity (CC_{50}) and the potential antiviral activities (EC_{50}) of antimicrobial peptides (AMP) and oyster hemolymph (*Crassostrea gigas* e *C. rhizophorae*) were investigated using VERO, HEp-2, MA104 cells and performed against herpes simplex virus type 1 (HSV-1/KOS strain), adenovirus type 5 (AdV-5) and rotavirus SA11 (RV), measured by MTT assay, with different strategies. The virucidal action was also performed for oyster hemolymph. Penaeidin showed the higher selectivity index ($SI=CC_{50}/EC_{50}$) for HSV-1/KOS strain, ($SI=64$). Oyster hemolymph showed virucidal action against the three evaluated viruses, also showing anti-herpetic ($SI=19.76/C. rhizophorae$) and antiadenovirus ($SI=5.33/C. gigas$) activities, but with no antiviral activity against rotavirus. It was observed, in some cases, low values of SI but high percentages of replication viral inhibition, mostly in the AMP group. Additional studies are required to confirm antiviral activity and probable mechanism of actions.

Keywords: antiviral, antimicrobial peptides, oyster hemolymph, herpes simplex virus type 1, adenovirus, rotavirus.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Inibição da replicação dos diferentes vírus pelos peptídeos antimicrobianos, através do ensaio colorimétrico do MTT, quando incubados simultaneamente ou antes da infecção viral. 66
- Figura 2** – Inibição da replicação dos diferentes vírus pelos extratos de ostras, através do ensaio colorimétrico do MTT, obtidos nas diferentes estratégias de avaliação da atividade antiviral (tratamento simultâneo, pré-tratamento e pós-tratamento) e da ação virucida. 73

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Características dos vírus usados neste estudo. 28
- Quadro 2** – Características dos peptídeos usados neste estudo. 36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Títulos infecciosos dos estoques virais utilizados.	50
Tabela 2 – Citotoxicidade dos peptídeos antimicrobianos frente às diferentes linhagens celulares.	53
Tabela 3 – Citotoxicidade de hemolinfa de ostras frente às células VERO, HEp-2 e MA104.	53
Tabela 4 – Atividade anti-herpética (HSV-1 cepa KOS) dos peptídeos antimicrobianos, obtidas através do ensaio colorimétrico do MTT.	58
Tabela 5 – Inibição da replicação do HSV-1/KOS pelos peptídeos antimicrobianos, quando incubados simultaneamente ou antes da infecção viral.	60
Tabela 6 – Atividade antiadenovírus (AdV-5) dos peptídeos antimicrobianos, obtidas através do ensaio colorimétrico do MTT.	61
Tabela 7 – Inibição da replicação do AdV-5 pelos peptídeos antimicrobianos, quando incubados simultaneamente ou antes da infecção viral.	62
Tabela 8 – Atividade anti-rotavírus (RV-SA11) dos peptídeos antimicrobianos, obtidas através do ensaio colorimétrico do MTT.	63
Tabela 9 – Inibição do RV-SA11 pelos peptídeos antimicrobianos, quando incubados simultaneamente ou antes da infecção viral.	64
Tabela 10 – Atividade anti-herpética (HSV-1 cepa KOS) da hemolinfa de ostras, obtidas através do ensaio colorimétrico do MTT.	68
Tabela 11 – Inibição do HSV-1/KOS pela hemolinfa de ostras, usando diferentes estratégias de avaliação da atividade anti-herpética (tratamento simultâneo, pré-tratamento, pós-tratamento) e da ação virucida.	69
Tabela 12 – Atividade antiadenovírus (AdV-5) da hemolinfa de ostras, obtidas através do ensaio colorimétrico do MTT.	69

Tabela 13 – Inibição do AdV-5 pela hemolinfa de ostras, usando diferentes estratégias de avaliação da atividade antiadenovírus (tratamento simultâneo, pré-tratamento e pós-tratamento) e da ação virucida.

70

Tabela 14 – Inibição do RV-SA11 pela hemolinfa de ostras, usando diferentes estratégias de avaliação da atividade anti-rotavírus (tratamento simultâneo, pré-tratamento e pós-tratamento) e da ação virucida.

71

SUMÁRIO

1	<u>INTRODUÇÃO</u>	14
2	<u>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	17
2.1	<u>MATERIAIS BIOATIVOS DE ORIGEM PROTÉICA</u>	17
2.1.1	<u>Peptídeos Antimicrobianos</u>	18
2.1.1.1	<u>Gomesina</u>	22
2.1.1.2	<u>Peneidinas</u>	23
2.1.1.3	<u>Fator Anti-lipopolissacarídeo (FAL)</u>	24
2.1.1.4	<u>Fragmento C-Terminal da Hemocianina (FCTH)</u>	25
2.1.1.5	<u>Clavanina A</u>	25
2.1.1.6	<u>Magaininas</u>	25
2.1.1.7	<u>Taquiplesina</u>	26
2.1.1.8	<u>PW 2</u>	26
2.1.2	<u>Hemolinfa de ostras</u>	27
2.1.2.1	<u>Crassostrea gigas</u>	27
2.1.2.2	<u>Crassostrea rhizophorae</u>	29
2.2	<u>VÍRUS ESTUDADOS</u>	29
2.2.1	<u>Vírus Herpético Tipo 1</u>	30
2.2.2	<u>Adenovírus humano sorotipo 5</u>	31
2.2.3	<u>Rotavírus</u>	32
3	<u>OBJETIVOS</u>	35
3.1	<u>OBJETIVO GERAL</u>	35
3.2	<u>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u>	35
4	<u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	36
4.1	<u>MATERIAIS DE ESTUDO</u>	36
4.1.1	<u>Peptídeos Antimicrobianos</u>	36
4.1.1.1	<u>Gomesina</u>	36
4.1.1.2	<u>Peneidina</u>	36
4.1.1.3	<u>Fator Anti-lipopolissacarídeo² (FAL)</u>	36
4.1.1.4	<u>Fragmento C-Terminal da Hemocianina² (FCTH)</u>	36
4.1.1.5	<u>Clavanina A²</u>	36
4.1.1.6	<u>Magainina²</u>	36
4.1.1.7	<u>Taquiplesina²</u>	37
4.1.1.8	<u>PW-2</u>	37
4.1.2	<u>Ostras</u>	38
4.1.2.1	<u>Crassostrea gigas</u>	38
4.1.2.2	<u>Crassostrea rhizophorae</u>	38
4.2	<u>PREPARO DAS SOLUÇÕES-ESTOQUES DOS MATERIAIS DE ESTUDO</u>	38
4.2.1	<u>Peptídeos Antimicrobianos</u>	38
4.2.2	<u>Hemolinfa de ostras</u>	38

<u>4.3</u>	<u>CULTURAS CELULARES</u>	39
<u>4.3.1</u>	<u>Células</u>	39
<u>4.3.2</u>	<u>Meio de Cultura e Reagentes</u>	39
<u>4.4</u>	<u>VÍRUS</u>	40
<u>4.4.1</u>	<u>Origem das Cepas</u>	40
<u>4.4.2</u>	<u>Preparo das Suspensões-Estoques Virais</u>	40
<u>4.4.2.1</u>	<u>HSV-1 e AdV-5</u>	40
<u>4.4.2.2</u>	<u>RV-SA11</u>	41
<u>4.4.3</u>	<u>Determinação dos Títulos Infeciosos Virais</u>	41
<u>4.4.3.1</u>	<u>Titulação do HSV-1</u>	42
<u>4.4.3.2</u>	<u>Titulação do AdV-5</u>	43
<u>4.4.3.3</u>	<u>Titulação do RV-SA11</u>	44
<u>4.5</u>	<u>AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE</u>	45
<u>4.5.1</u>	<u>Avaliação da Viabilidade Celular Através do Ensaio Colorimétrico com Sal de Tetrazolium (MTT)</u>	45
<u>4.6</u>	<u>AVALIAÇÃO IN VITRO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL</u>	46
<u>4.6.1</u>	<u>Ensaio Colorimétrico com Sal de Tetrazolium (MTT)</u>	46
<u>4.6.1.1</u>	<u>Adição simultânea dos materiais-teste + vírus</u>	46
<u>4.6.1.2</u>	<u>Pré-tratamento das células com os materiais-testes, antes da adição dos vírus</u>	47
<u>4.6.1.3</u>	<u>Pós-tratamento das células infectadas com os materiais-testes</u>	48
<u>4.6.2</u>	<u>Avaliação da Ação Virucida</u>	49
<u>4.7</u>	<u>DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA</u>	49
<u>5</u>	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	51
<u>5.1</u>	<u>DETERMINAÇÃO DOS TÍTULOS VIRAIS</u>	51
<u>5.2</u>	<u>AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE</u>	51
<u>5.2.1</u>	<u>Peptídeos Antimicrobianos</u>	53
<u>5.2.2</u>	<u>Hemolinfa de ostras</u>	54
<u>5.3</u>	<u>ESTUDO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-HERPÉTICA, ANTIADENOVÍRUS E ANTI-ROTAVÍRUS</u>	55
<u>5.3.1</u>	<u>Peptídeos Antimicrobianos</u>	57
<u>5.3.1.1</u>	<u>Atividade antiviral dos PAMs sobre o HSV-1/KOS</u>	58
<u>5.3.1.2</u>	<u>Atividade antiviral dos PAMs sobre o AdV-5</u>	61
<u>5.3.1.3</u>	<u>Atividade antiviral dos PAMs sobre o RV-SA11</u>	63
<u>5.3.2</u>	<u>Hemolinfa de ostras</u>	68
<u>5.3.2.1</u>	<u>Atividade antiviral de hemolinfa de ostras sobre o HSV-1/KOS</u>	69
<u>5.3.2.2</u>	<u>Atividade antiviral de hemolinfa de ostras sobre o AdV-5</u>	70
<u>5.3.2.3</u>	<u>Atividade antiviral de hemolinfa de ostras sobre o RV-SA11</u>	71
<u>6</u>	<u>CONCLUSÕES</u>	75
<u>7</u>	<u>PERSPECTIVAS</u>	78
	<u>REFERÊNCIAS</u>	79

1 INTRODUÇÃO

Dentre a enorme gama de produtos naturais, encontram-se os metabólitos primários e secundários, sintetizados por uma grande diversidade de organismos, tais como plantas, fungos, bactérias, protozoários e animais, em resposta a estímulos externos como mudanças nutricionais, infecções e competição para sobrevivência. Muitos destes metabólitos produzidos já foram isolados, identificados e caracterizados biológica e/ou farmacologicamente (HARVEY, 2000; STROHL, 2000).

A busca de novos agentes farmacologicamente ativos, através da triagem de fontes naturais, tem levado à descoberta de muitos fármacos úteis clinicamente e que desempenham um importante papel no tratamento de várias doenças humanas (CRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997).

Representando uma fonte inesgotável de compostos com grande diversidade de estruturas químicas, os produtos naturais apresentam diversas atividades farmacológicas, dentre elas a antiviral, e oferecem novas opções de potenciais agentes terapêuticos (CHE, 1991; HUDSON et al., 1993; HARVEY, 1999). A partir destes produtos podem ser retiradas substâncias ativas, cuja produção na forma sintética seria muito dispendiosa, ou ainda, podem ser extraídos compostos básicos que, com modificações estruturais, tornam-se mais eficazes e menos tóxicos, ou então, podem ser utilizados como protótipos para fármacos sintéticos, que possuam atividades farmacológicas semelhantes às originais (HOUGHTON, 1996; NIELSEN, 2002).

O desenvolvimento e a utilização de fármacos antivirais a partir de produtos naturais, que sejam capazes de prevenir uma infecção ou de combatê-la, têm despertado o interesse das indústrias farmacêuticas. Entretanto, apesar das inúmeras pesquisas realizadas nos últimos 50 anos, a disponibilidade de fármacos antivirais permanece insuficiente, devido principalmente, às suas restrições de uso, dentre as quais pode-se citar o reduzido espectro de atividade, a utilidade terapêutica limitada e os vários graus de toxicidade (SIMÕES et al., 1999; FLINT et al., 2000; STROHL, 2000; FAULKNER, 2002).

Inúmeros esforços têm sido feitos para avaliar a potencial atividade antiviral de produtos naturais, a fim de isolar e caracterizar novos compostos, os quais

poderiam inibir a replicação viral ou servir como modelo de novas moléculas (HUDSON et al., 1993; VLIETINCK; DE-BRUYNE; VANDEN-BERGHE, 1997; DE CLERCQ, 2002; 2004). Além disso, a descoberta de novos compostos antivirais se faz necessária, principalmente, para o tratamento de doenças responsáveis por alta morbidade e/ou mortalidade, tais como aquelas causadas pelos vírus HIV, vírus influenza, vírus que causam hepatite, causadores de febres hemorrágicas (SCHINAZI, 1992) e HSV (VISALLI; ZEIJL, 2003).

Dentre os materiais ativos de origem natural existem os de natureza protéica. Atualmente, cerca de 750 peptídeos antimicrobianos (PAMs) já foram identificados em diversas espécies, incluindo bactérias, fungos, plantas, insetos, moluscos, crustáceos, aracnídeos, aves, anfíbios, peixes e mamíferos. Os PAMs são fundamentais na defesa imune dos invertebrados, vertebrados e plantas, diante de infecções causadas por microrganismos (DIMARCQ et al., 1998; BACHÈRE; DESTOUMIEUX; BULET, 2000; CUTHBERTSON et al., 2002; SILVA JUNIOR et al., 2002; ZASLOFF, 2002; BROGDEN et al., 2003).

Como exemplo de um PAM muito pesquisado, pode-se destacar a lactoferricina, um potente peptídeo antimicrobiano gerado pela clivagem, através da pepsina, da porção N-terminal da lactoferrina, uma glicoproteína multifuncional com importante papel na regulação da resposta imune e no mecanismo de defesa contra bactérias, fungos e vírus (VOGEL et al., 2002). Os estudos realizados com a lactoferrina demonstraram atividades antifúngica, antitumoral, antiinflamatória e imunorreguladora (VOGEL et al., 2002); efeitos bacteriostático e bactericida (HAMOSH, 1998; VOGEL et al., 2002; VALENTI et al., 2004); atividade antiviral frente ao citomegalovírus (HASEGAWA et al., 1994), ao HSV-1 (HASEGAWA et al., 1994; FUJIHARA; HAYASHI, 1995; MARCHETTI et al., 1996; ANDERSEN et al., 2004), ao rotavírus SA11 (SUPERTI et al., 1997, 2001), ao adenovírus-2 (ARNOLD et al., 2002; DI BIASE et al., 2003), ao herpes vírus canino (TANAKA et al., 2003) e ao vírus da hepatite C (NOZAKI et al., 2003).

Existem, ainda, outras proteínas que apresentam atividade antiviral. A ovotransferrina foi capaz de inibir a replicação de vírus causadores de doenças em aves (GIANSANTI et al., 2002), e a β -lactoglobulina inibiu a replicação do rotavírus (SUPERTI et al., 1997).

Um estudo realizado com extratos de tecidos de crustáceos demonstrou ação antiviral de amplo espectro, incluindo vírus de DNA e vírus de RNA, com ou sem

envelope, provavelmente através dos múltiplos inibidores contidos nos extratos (PAN et al., 2000).

Há bastante tempo atrás, Prescott e colaboradores (1966) relataram o isolamento de uma substância, denominada paolina II, a partir de extratos alcoólicos de tecidos de ostras, que apresentou atividade antiviral *in vitro* contra o herpes vírus e *in vivo* em ratos infectados com os vírus influenza-B e poliovírus.

A literatura descreve também a atividade biológica de extratos e compostos obtidos a partir de ostras. Faisal e colaboradores (1998) demonstraram que o plasma das ostras *Crassostrea gigas* e *C. virginica* possuem fatores capazes de inibir a atividade das proteases de dois patógenos de ostras (*Perkinsus marinus* e *Vibrio vulnificus*). Adicionalmente, do extrato da ostra *Crassostrea gigas* foram isolados peptídeos que inibem as proteases do vírus HIV-1 (LEE; MARUYAMA, 1998).

Com o intuito de contribuir para o avanço do conhecimento nesta área, o Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) vem desenvolvendo, de forma cooperativa com pesquisadores desta e de outras instituições, trabalhos com produtos naturais de diversas origens e, também, com substâncias sintéticas (BETTEGA, 2000; FREITAS, 2001; ANDRIGHETTI-FRÖHNER, 2003a; SAVI, 2004; SILVA, 2005).

Esta dissertação teve como objetivo avaliar a citotoxicidade de peptídeos antimicrobianos e de hemolinfa de duas diferentes espécies de ostras (*Crassostrea gigas* e *C. rhizophorae*) frente a diferentes células, e sua potencial atividade antiviral frente a diferentes vírus.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MATERIAIS BIOATIVOS DE ORIGEM PROTÉICA

As proteínas são constituintes essenciais das células e estão presentes no citoplasma como moléculas envolvidas em diversas rotas metabólicas; elas estão entre as macromoléculas biológicas mais abundantes e são extremamente versáteis do ponto de vista funcional, pois estão envolvidas em catálise enzimática, transporte molecular, nutrição, motilidade, papéis estruturais, de defesa, entre outras. Do ponto de vista químico, são cadeias polipeptídicas, que podem variar de 100 a 2.000 resíduos de aminoácidos, que determinam suas estruturas primárias, das quais dependem suas funções, que estão relacionadas, também, com suas conformações espaciais (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000).

As atividades biológicas de vários compostos de origem protéica têm sido avaliadas, sendo a proteína ligante de ferro lactoferrina o alvo preferencial de estudos recentes, conforme já citado na introdução deste trabalho. A lactoferrina é uma proteína multifuncional que possui atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral, antiinflamatória e imunorreguladora comprovadas, sendo que estas propriedades estão relacionadas com a região N-terminal que é altamente básica, rica em triptofano e arginina. Estudos foram realizados para investigar os mecanismos de atividade anti-herpética (anti-HSV) da lactoferrina e lactoferricina. Os resultados demonstraram que ambas inibem a penetração do vírus HSV em células Vero. A lactoferrina não tem efeito sobre o HSV após sua entrada nas células, enquanto a lactoferricina exerce atividade antiviral também após a ligação inicial do vírus com as células hospedeiras (VOGEL et al., 2002; ANDERSEN et al., 2004).

As bacteriocinas são proteínas antibacterianas produzidas por bactérias que matam ou inibem o crescimento de outras bactérias. Algumas bactérias ácido lácticas produzem alta diversidade de bacteriocinas, que podem ser encontradas em alimentos fermentados e não fermentados. Várias bacteriocinas já foram caracterizadas bioquímica e geneticamente, e tiveram suas estruturas e mecanismos de ação elucidados, mas muitas características destes compostos ainda são desconhecidas. As primeiras bacteriocinas isoladas foram de bactérias Gram (-), denominadas colicinas, que constituem um grupo de proteínas antibacterianas, que atuam por vários mecanismos de ação, como a inibição da síntese da parede celular

ou inibição da atividade da RNase ou da DNase. As bacteriocinas são, freqüentemente, confundidas na literatura com os antibióticos, mas suas diferenças residem na síntese, mecanismo de ação, espectro antimicrobiano, toxicidade e mecanismos de resistência. Elas são eficazes e seguras na preservação dos alimentos, porém só a nisina é utilizada comercialmente (CLEVELAND et al., 2001).

Esta revisão bibliográfica foi realizada com o intuito de apresentar, de forma organizada e sistemática, o conhecimento disponível, até o momento, na literatura consultada, sobre:

- ✓ os peptídeos antimicrobianos em geral e também os selecionados para este estudo;
- ✓ a hemolinfa das ostras *Crassostrea gigas* e *C. rhizophorae*;

2.1.1 Peptídeos Antimicrobianos

Atualmente, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) têm se destacado no desenvolvimento de fármacos, pois eles vêm demonstrando importantes atividades farmacológicas, tais como antitumoral, antimicrobiana de amplo espectro, antifúngica, antiprotozoária e antiviral (RAJ; DENTINO, 2002). Estes compostos podem apresentar uma potente atividade microbicida contra um amplo espectro de microorganismos e raramente apresentam citotoxicidade para células animais (Bulet et al., 1999). São, na sua grande maioria, pequenas moléculas anfipáticas, de caráter catiônico, que apresentam um amplo espectro de atividade contra bactérias, fungos, vírus e parasitas. Seu mecanismo de ação consiste na permeabilização da membrana da célula-alvo, resultando em um extravasamento irreversível do material celular e, conseqüentemente, morte celular, sendo que esta interação com a membrana da célula-alvo pode ocorrer pela formação de canais voltagem-dependentes e/ou de canais permeáveis a ânions, pela ruptura da bicamada lipídica da membrana, entre outros (SILVA JUNIOR et al., 2002).

Estas moléculas podem ligar-se a um receptor de membrana levando a uma perda específica de sua função, pois ao se translocarem através da membrana podem atuar intracelularmente, impedindo a síntese de metabólitos importantes para o microorganismo. Desta forma, são candidatos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos a serem usados no combate a patógenos resistentes aos fármacos convencionais (DIMARCQ et al., 1998).

Os peptídeos antimicrobianos podem ser agrupados de acordo com suas propriedades químicas e estruturais em três classes: lineares, cíclicos e rico em algum aminoácido específico (BULET et al., 2004). Outra classificação os divide em quatro famílias, de acordo com suas estruturas primárias e secundárias: lineares, que formam alfa-hélice anfipáticas, destituídos de resíduos de cisteína; ricos em cisteína com pontes dissulfeto intramoleculares, variando de 1 a 6 pontes; ricos em prolina; e ricos em glicina (DIMARCQ et al., 1998; BULET et al., 1999; BACHÈRE; DESTOUMIEUX; BULET, 2000).

Os PAMs foram inicialmente isolados da hemolinfa de insetos, sendo o primeiro, a cecropina, assim chamada por ter sido purificada da mariposa *Hyalophora cecropia* (Steiner et al., 1981). A partir desta primeira observação em insetos, foram realizados vários estudos sobre detecção, purificação e atividade antibacteriana de várias famílias de peptídeos presentes na maioria dos seres vivos, incluindo mamíferos (Bulet et al., 1999).

As defensinas são peptídeos antibacterianos, catiônicos, que possuem na porção C-terminal seis cisteínas, formando três pontes dissulfeto intramoleculares. Elas são encontradas em vários tecidos de animais e de plantas, e são importantes na sua resposta imune inata e adaptativa (BACHÈRE; DESTOUMIEUX; BULET, 2000; RAJ; DENTINO, 2002). As alfa-defensinas são ativas contra bactérias, fungos, parasitas e alguns vírus envelopados; são encontradas em grânulos de neutrófilos, macrófagos alveolares e em células intestinais. As beta-defensinas são produzidas por células fagocitárias circulantes na mucosa epitelial de mamíferos, e possuem atividade contra bactérias Gram (+) e (-). As defensinas de humanos têm demonstrado ação quimiotática para monócitos e leucócitos polimorfonucleares e para linfócitos T. As defensinas de invertebrados possuem atividade contra bactérias Gram (-) e vírus envelopados, mas não contra bactérias Gram (+). Outras moléculas semelhantes às defensinas de insetos foram caracterizadas em escorpiões (BULET et al., 1999) e em moluscos bivalves, apresentando ao invés de seis, oito cisteínas (BACHÈRE; DESTOUMIEUX; BULET, 2000).

Alguns estudos demonstraram a ocorrência, as características estruturais, expressão gênica e a regulação em condições fisio e patológicas das defensinas, bem como suas atividades antimicrobianas, antiviral e antitumoral, e suas interações com moléculas e células. As defensinas representam, possivelmente, uma nova classe de antimicrobianos naturais, que poderiam auxiliar na solução dos problemas

relacionados à resistência dos microrganismos aos fármacos e serem úteis no tratamento de infecções causadas por patógenos, para as quais não existem ainda tratamentos eficazes, bem como poderiam ser usadas como imunomoduladores em organismos suprimidos por infecções e inflamações. As dificuldades e o alto custo para sua produção em larga escala, provavelmente, poderão ser solucionados, a médio prazo, com tecnologia de DNA recombinante (RAJ; DENTINO, 2002).

O primeiro peptídeo antifúngico isolado de insetos foi a drosomicina, que é composta de 44 aminoácidos, incluindo oito cisteínas, formando quatro pontes dissulfeto, que conferem à molécula uma estrutura altamente compacta. Este peptídeo assemelha-se estruturalmente às defensinas vegetais e às gama-tioninas, que fazem parte do mecanismo de defesa das plantas. A drosomicina é um potente antifúngico, sem ação sobre bactérias nem leveduras, e também sem efeito hemolítico, mas é ativa sobre fungos patogênicos humanos e vegetais, em baixas concentrações (BULET et al., 1999).

Outro peptídeo antifúngico é a tanatina, isolada de um hemíptero (*Podisus maculiventris*), que é constituído por 21 aminoácidos, incluindo duas cisteínas formando uma ponte dissulfeto interna. A tanatina não apresenta similaridade com as defensinas de insetos, porém é muito semelhante à brevinina, que foi isolada da secreção da pele de sapo. Sua porção C-terminal é catiônica e a porção N-terminal apresenta seis resíduos hidrofóbicos. A tanatina foi o primeiro peptídeo isolado de inseto, com atividade antibacteriana de amplo espectro e apresenta também atividade contra fungos filamentosos, e sem efeito hemolítico (BULET et al., 1999).

A termicina, peptídeo isolado do inseto *Pseudacanthotermes spiniger*, rico em cisteína, semelhante às defensinas, possui atividade antifúngica, enquanto a espinigerina, peptídeo linear isolado do mesmo inseto, possui ação sobre bactérias Gram (+) e (-) e fungos (LAMBERTY et al., 2001).

Com relação à atividade antiviral de peptídeos, existem alguns relatos na literatura, descritos abaixo.

Uma estratégia antiviral que vem sendo estudada é a inibição da enzima ribonucleotídeo redutase do HSV através do uso de peptídeos sintéticos. A inibição é feita pela mimetização de uma pequena subunidade da porção C-terminal da ribonucleotídeo redutase, que é essencial na associação da subunidade da enzima e, conseqüentemente, para a sua atividade. A inibição ocorre pela ligação específica

do inibidor com a subunidade maior, evitando assim a associação desta com a subunidade menor (LIUZZI; SCOUTEN; INGEMARSON, 1992; MOSS et al. 1995).

Através de ensaios *in vitro* foi comprovada a atividade anti-herpética de um peptídeo sintético anfifílico, denominado mod-1. Tal ação foi maior do que a do aciclovir, quando o peptídeo foi colocado em contato com os vírus antes da infecção das células VERO, sugerindo que o mecanismo desta ação antiviral detectada seria uma interação do peptídeo com o envelope viral. O uso sistêmico deste peptídeo não foi recomendado por ter apresentado alta atividade hemolítica, mas poderia ser usado em tratamento tópico (ABOUDY et al., 1993).

Os dendrímeros são macromoléculas sintéticas multifuncionais, altamente ramificadas, que apresentam várias propriedades farmacológicas, dentre elas a antiviral. Estudos *in vitro* realizados com os vírus HSV-1 e HSV-2 e *in vivo* com o HSV-2 demonstraram sua eficácia profilática, pois a atividade antiviral foi demonstrada quando o composto foi colocado antes da infecção viral com o vírus, sugerindo que os dendrímeros têm um potencial microbicida (BOURNE et al., 2000).

Um estudo foi feito para avaliar a habilidade de vinte peptídeos, naturais e sintéticos, com estruturas espaciais α -hélice, β -folha ou mista, de inativar os vírus HSV-1 e HSV-2. Dois destes peptídeos apresentaram atividade anti-herpética sobre os dois tipos de vírus: a indolicidina, um peptídeo rico em triptofano, isolado de neutrófilos bovinos, e a brevinina-1, peptídeo encontrado em pele de sapo. A atividade antiviral da brevinina-1 foi mantida mesmo após terem sido realizadas algumas alterações estruturais (redução e carboxiamidometilação), procedimentos que aboliram os efeitos hemolíticos e citotóxicos do referido peptídeo. Tais modificações não foram realizadas na indolicidina, pois essa apresentou baixa citotoxicidade (YASIN et al., 2000).

Algumas dermaseptinas (peptídeos anfifílicos, catiônicos, com estrutura α -hélice) foram sintetizadas e testadas sobre cepas do HSV-1 sensíveis e resistentes ao aciclovir, através de diversas metodologias e incubadas em diferentes momentos da infecção viral. Uma delas demonstrou ser capaz de inibir a replicação viral, provavelmente por interferir na interação dos vírus com as células hospedeiras. Isto pode ser atribuído a vários fatores, tais como a distribuição de cargas e a hidrofobicidade do sítio polar do peptídeo, uma vez que outros peptídeos não tiveram a mesma ação, embora grande parte de suas seqüências era homóloga (BELAID et al., 2002).

Algumas proteínas, como soroalbumina bovina, α - e β -lactoglobulina e lisosima de aves, apresentaram propriedades antivirais, porém por sofrerem ação de enzimas proteolíticas, não conseguem atingir as células-alvo. Algumas modificações químicas ou a quebra destas proteínas em peptídeos fizeram com que houvesse um aumento da atividade anti-HSV-1, já que as moléculas resultantes quase não sofrem ação das proteases. Estes peptídeos são de interesse no desenvolvimento de novos fármacos, pois seus análogos sintéticos têm baixo custo de produção e uma reduzida antigenicidade e hipersensibilidade (OEVERMANN et al., 2003).

Conforme demonstrado acima, existem alguns estudos sobre as atividades antibacteriana, antifúngica e antiviral de peptídeos, mas pouco se sabe sobre suas atividades sobre parasitas protozoários e metazoários. Vizioli e Salzet (2002) relataram que os resultados de ensaios *in vitro* sobre vários parasitas os permitem sugerir que os peptídeos podem representar uma ferramenta importante no desenvolvimento de novos fármacos antiparasitários para o tratamento de doenças como a malária e a leishmaniose.

Dentre os vários peptídeos antimicrobianos existentes, oito foram selecionados para a realização deste trabalho, considerando-se sua disponibilidade, relatos anteriores sobre suas atividades e, também, por serem moléculas que podem ser obtidas por recombinação gênica ou síntese química. Abaixo, seguem informações sobre os peptídeos estudados nesta dissertação.

2.1.1.1 Gomesina

Quatro peptídeos foram isolados da hemolinfa da aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana*. Um deles, a gomesina, apresentou um amplo espectro contra bactérias, fungos, e o parasita causador da leishmaniose. É um octadecapeptídeo de massa molecular equivalente a 2,27 KDa, apresentando quatro resíduos de cisteína, duas pontes dissulfeto e uma estrutura cíclica com terminação aberta com o ácido piroglutâmico N-terminal e amidação C-terminal, que possivelmente protegem o peptídeo contra degradação por proteases. É altamente básico (pI calculado de 12,7), contém seis aminoácidos carregados positivamente, cinco argininas e uma lisina (SILVA JUNIOR; DAFFRE; BULET, 2000).

A gomesina apresenta uma estrutura com folhas beta pregueadas anti-paralelas, ligadas por uma volta beta, estabilizada por duas pontes dissulfeto. Ela

apresenta característica anfipática similar à das estruturas de outros peptídeos como a taquiplesina, isolada de hemócito de limulídio e a protegrina, isolada de neutrófilos de porco, cujos aminoácidos que possuem cargas positivas são responsáveis pela interação inicial eletrostática com os grupos carregados negativamente dos lipídeos das membranas dos microorganismos; posteriormente, a inserção da porção hidrofóbica dos peptídeos na membrana promove sua desestabilização (MANDARD et al., 2002).

Embora apresente uma certa atividade hemolítica, a gomesina apresenta um potencial para aplicações terapêuticas em humanos, outros animais e em plantas (SILVA JUNIOR; DAFFRE; BULET, 2000).

Foram isolados de hemócitos da *A. gomesiana* duas isoformas de um outro peptídeo antimicrobiano denominado acantoscurreina. Ele tem 23 aminoácidos, é rico em glicina, possui caráter catiônico, e não apresenta similaridades estruturais com outros peptídeos antimicrobianos da mesma classe, isolados de outros animais e de plantas. A acantoscurreina apresentou atividade sobre bactérias Gram (-) e ação antifúngica (LORENZINI et al., 2003).

2.1.1.2 Peneidinas

Três membros de uma família de peptídeos antimicrobianos foram isoladas do plasma e de hemócitos do camarão *Litopenaeus vannamei* (camarão-branco-do-pacífico): peneidina-1, -2 e -3, os quais foram os primeiros peptídeos antimicrobianos de crustáceos descritos. Com massa molecular de 5,5 (pen-1 e pen-2) e 6,6 (pen-3) KDa, diferem de outras famílias por possuírem uma região rica em prolina (a porção N-terminal), e outra com seis cisteínas (a porção C-terminal), formando três pontes dissulfeto. As peneidinas são catiônicas e compostas de 50 (pen-1 e pen-2) e 62 (pen-3) aminoácidos (DESTOUMIEUX et al., 1997, 1999). Cuthbertson e Shepard (2002) descobriram um novo membro desta família, que foi denominado peneidina 4 (pen-4), encontrada também no *Litopenaeus vannamei* e ainda no *L. setiferus* (camarão-branco-do-atlântico). Com base na análise filogenética, os autores dividiram as peneidinas em três classes distintas: a das peneidinas pen-1 e pen-2, e as das peneidinas pen-3 e pen-4, distintamente, o que difere da classificação anterior feita por Destoumieux e colaboradores (1997), que dividiam em três classes, cada uma com um tipo de peneidina (pen-1, pen-2 e pen-3). As três peneidinas inicialmente isoladas são agora denominadas de *Litvan-Pen2-2*, *Litvan-Pen-2-1* e

Litvan-Pen-3-1, respectivamente, e já foram isoladas em várias outras espécies de camarão (BACHÈRE et al., 2004).

As peneidinas possuem a habilidade de migrar para os tecidos, fazendo com que sejam transportadas pelos hemócitos para os locais infectados pelos microrganismos patogênicos (BACHÈRE; DESTOUMIEUX; BULET, 2000; DESTOUMIEUX et al., 2000a). Por serem sintetizadas nos hemócitos, e estes terem a capacidade de infiltrarem-se em todos os tecidos, acredita-se que suas propriedades antimicrobianas estejam relacionadas com a resposta imune. As peneidinas possuem atividade antibacteriana, predominantemente, sobre bactérias Gram (+), apresentando muito pouco efeito sobre as Gram (-). Elas também inibem o crescimento de muitos fungos filamentosos, incluindo o *Fusarium oxysporum*, que é um patógeno do camarão (DESTOUMIEUX et al., 1997, 1999, 2000b). Löfgren (2004) confirmou atividade da peneidina pen-3 sobre *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* e *Trypanosoma cruzi*, através de ensaios *in vitro*.

Para que as atividades biológicas das peneidinas fossem avaliadas, houve a necessidade da obtenção de moléculas recombinantes, pois não era possível o isolamento em grande escala diretamente dos animais e devido ao seu tamanho também não era possível a obtenção de moléculas sintéticas. Algumas modificações foram feitas nas moléculas recombinantes e suas atividades foram comparadas com as das peneidinas naturais, tendo sido detectadas algumas diferenças nessas atividades, como era esperado. A troca do ácido piroglutâmico pela glutamina na porção N-terminal não provocou alterações na atividade das peneidinas sobre fungos filamentosos, mas ocorreu perda da ação sobre leveduras. Quando a amida do grupamento C-terminal foi substituída por uma glicina, as propriedades antifúngicas não foram alteradas, mas a atividade antibacteriana foi reduzida em duas vezes, pois a perda da carga positiva diminuiu a eficiência da interação com a membrana bacteriana (DESTOUMIEUX et al., 1999, 2000a).

2.1.1.3 Fator Anti-lipopolissacarídeo (FAL)

É um peptídeo isolado da hemolinfa do camarão *Penaeus monodon*, de massa molecular de 13,7 KDa, com 123 aminoácidos. Até o momento, na literatura consultada, não foi encontrada publicação alguma sobre sua estrutura ou atividades biológicas.

Já está bem documentado na literatura o FAL isolado de hemócitos do limulídio *Tachypleus tridutatus* (FALL) (TANAKA et al., 1982) e também sua atividade antibacteriana (MORITA et al., 1985).

2.1.1.4 Fragmento C-Terminal da Hemocianina (FCTH)

O FCTH é um peptídeo encontrado no plasma do camarão *Litopenaeus vannamei*, derivado da clivagem da hemocianina, massa molecular de 2,7 KDa, com 24 aminoácidos, rico em histidina, com atividade antifúngica e sem atividade antibacteriana (DESTOUMIEUX-GARZON, et al., 2001; BACHÈRE et al., 2004).

2.1.1.5 Clavanina A

A clavanina é um peptídeo antimicrobiano, que foi originalmente isolado de hemócitos do tunicado *Styela clava*, com 23 aminoácidos, com porção C-terminal amidada, rico em histidina, glicina e fenilalanina (LEE et al., 1997).

A clavanina está presente no citoplasma ou nos grânulos citoplasmáticos de eosinófilos e no citoplasma dos macrófagos. Juntamente com a estielina, outro peptídeo isolado do mesmo animal. A clavanina representa de 10 a 20 % das proteínas totais dos grânulos dos eosinófilos. É dividida em cinco classes A, B, C, D e E, de acordo com o tipo de grânulo em que está presente. Esta diferença sugere uma certa especificidade de ação sobre os microorganismos (MENZEL et al., 2002).

A clavanina A possui atividade antimicrobiana, provavelmente, por interagir com a membrana bacteriana através de mecanismos dependentes de pH e salinidade. Os aminoácidos fenilalanina e glicina exercem um importante papel na afinidade da clavanina com a membrana bacteriana, no balanço de hidrofobicidade, e na sua flexibilidade conformacional (KAN et al., 2003).

No entanto, a clavanina A não demonstrou capacidade de inativar diretamente os vírus HSV-1 e HSV-2, mas quando teve as histidinas substituídas por lisinas inativou o HSV-1 (YASIN et al., 2000).

2.1.1.6 Magaininas

As magaininas foram isoladas da secreção da pele do sapo africano (*Xenopus laevis*); são peptídeos catiônicos, de conformação espacial α -hélice, de massa molecular equivalente a 2,5 KDa. A magainina-1 possui 23 aminoácidos e a

magainina-2 possui 24 aminoácidos, ricos em lisina, com atividade antibacteriana de amplo espectro, antifúngia e antiprotozoária (ZASLOFF et al., 1987).

Muitos análogos sintéticos e recombinantes vêm sendo avaliados quanto às suas propriedades farmacológicas. Por exemplo, a atividade antiviral da magainina-2 sobre os vírus HSV-1 e HSV-2 foi avaliada, e não foi constatado efeito inibitório significativo da replicação viral, nas condições experimentais testadas (ABOUDY et al., 1993; YASIN et al., 2000).

Alguns peptídeos sintéticos, da classe das magaininas, foram capazes de exercer efeito antiviral direto sobre o HSV-1, quando do pré-tratamento com estes peptídeos (EGAL, et al., 1999). Matanic e Castilla (2004) constataram que, em concentrações não citotóxicas, as magaininas-1 e 2 não apresentaram atividade virucida, porém apresentaram ação inibitória da replicação dos vírus HSV-1 e HSV-2.

2.1.1.7 Taquiplesina

A taquiplesina foi isolada de hemócitos do limulídeo *Tachypleus tridentatus*. É um peptídeo catiônico, de massa molecular equivalente a 2,26 KDa, composto por 17 aminoácidos, sendo oito deles carregados positivamente (cinco argininas, duas tirosinas e uma lisina), com amidação C-terminal, quatro resíduos de cisteína e duas pontes dissulfeto que apresenta ação sobre bactérias gram (+) e gram (-) e sobre fungos (NAKAMURA et al., 1988).

Sua ação virucida foi constatada para os vírus influenza A, vírus da estomatite vesicular (VSV) e HIV-1, mas mostrou-se ineficaz sobre HSV-1, adenovírus 1, reovírus e poliovírus (MURAKAMI et al., 1991). De acordo com os mesmos autores, as evidências sugerem a ligação da taquiplesina não somente aos lipopolissacarídeos, mas também a alguns fosfolipídios ácidos; entretanto, os mecanismos pelos quais a inativação viral ocorre ainda permanecem desconhecidos, sendo provável que este peptídeo se combine com os fosfolipídios ácidos e/ou as glicoproteínas dos envelopes virais.

2.1.1.8 PW 2

O PW-2 é um peptídeo recombinante, de massa molecular de 1,61 KDa, que foi construído a partir de uma biblioteca de peptídeos (phage display – Ph.D, New England BioLabs Cambridge, MA), através do uso de esporozoítos de *Eimeria*

acervulina. É composto de doze aminoácidos: sete hidrofóbicos e três carregados positivamente, apresentando dois triptofanos consecutivos, sendo semelhante na estrutura e na sua capacidade de permeabilização de membranas a dois peptídeos naturais, a indolicidina e a tripticina (SILVA JUNIOR et al., 2002).

O PW-2 é um peptídeo com amplo espectro de ação, agindo contra bactérias, fungos e protozoários, com baixa atividade hemolítica e baixa toxicidade para eritrócitos humanos, de coelhos e de frangos. Este peptídeo demonstrou ter alta especificidade e baixa toxicidade, quando comparado a peptídeos naturais similares, o que representa uma grande vantagem no desenvolvimento de uma terapia nele baseada (SILVA JUNIOR et al., 2002).

2.1.2 *Hemolinfa de ostras*

Os moluscos, como outros invertebrados, apresentam apenas um sistema imune inato ou natural, sendo desprovidos de um sistema de defesa adaptativo ou adquirido, que inclui a imensa variedade de anticorpos e receptores altamente específicos e células de memória, como ocorre nos vertebrados. O sistema imune dos moluscos está fundamentalmente associado ao seu sangue ou hemolinfa, que consiste de uma fração celular, representada pelas células circulantes ou hemócitos, e por uma fração plasmática, que contém os fatores humorais. Os hemócitos são os principais responsáveis pelas respostas imunes celulares, como a fagocitose de microrganismos, a formação de nódulos e cápsulas em torno de corpos estranhos e sua posterior destruição por enzimas digestivas e moléculas citotóxicas e/ou microbidas (mecanismos oxidativos e peptídeos antimicrobianos). Já a fração humoral envolve fatores de reconhecimento como as lectinas de ocorrência natural no plasma, cascatas proteolíticas como o sistema pró-fenoxidase e o sistema de coagulação. Ambas as frações, celular e humoral, integram-se funcionalmente durante os mecanismos imunológicos, garantindo a homeostase e a sobrevivência dos moluscos, quando ameaçados por organismos patógenos ou por outro tipo de injúria (VARGAS-ALBORES; BARRACCO, 2001).

2.1.2.1 *Crassostrea gigas*

Nativa do sudeste asiático, e distribuindo-se ao longo do mar do Japão, China e Coreia, a espécie *C. gigas* é popularmente conhecida como ostra-do-

pacífico ou ostra-japonesa, (IMAI, 1982; AKABOSHI; SINQUE, 1983; RUPPERT; BARNES, 1996).

O cultivo desta espécie exótica no Estado de Santa Catarina tem crescido muito devido às condições oceanográficas favoráveis, como a existência de inúmeras áreas de preservação ambiental formadas por baías, enseadas e estuários e também pela qualidade da água (LCMM, 2001). O bom desenvolvimento da espécie e sua fácil adaptação impulsionaram o interesse dos pescadores artesanais da região pelo seu cultivo (NASCIMENTO; PEREIRA; SOUZA, 1983; POLI, 1994). Desde o início da implantação do cultivo de moluscos bivalves no litoral catarinense, a produção de ostras alcançou a marca de dois milhões de dúzias no ano de 2003 (Epagri /CEDAP, 2004).

Além do fator nutricional já comprovado, alguns estudos demonstraram atividades biológicas importantes de ostras desta espécie.

Conforme citado na introdução deste trabalho, Prescott e colaboradores (1966) relataram o isolamento de uma substância, denominada paolina II, a partir de extratos alcoólicos de tecidos de ostras, que apresentou atividade antiviral *in vitro* contra o herpes vírus e *in vivo* em ratos infectados com os vírus influenza-B e poliovírus.

Achour e colaboradores (1997) compararam o efeito de extrato de ostra *C. gigas* sobre linfócitos de indivíduos portadores do vírus HIV (sintomáticos e assintomáticos); comparados à um grupo controle. Foi verificado que no grupo assintomático estes extratos mostraram melhoria da proliferação celular e da expressão de receptores de IL-2.

Um extrato de ostra *C. gigas* foi capaz de proteger as células da mucosa gástrica de ratos contra os danos causados pelo peróxido de hidrogênio, provavelmente, via uma ação antioxidante (YOSHICAWA et al., 1997).

Esta espécie é tolerante a infecções causadas pelo protozoário *Perkinsus marinus*, o que despertou interesse a respeito de seus mecanismos de defesa. Esta tolerância poderia ser atribuída à presença de fatores inibidores de proteases no plasma desta espécie (FAISAL et al., 1998). Efetivamente, substâncias inibidoras específicas de proteases do vírus HIV-1 foram obtidas a partir de um hidrolisado de extratos de ostras desta espécie (LEE; MARUYAMA, 1998).

2.1.2.2 *Crassostrea rhizophorae*

A espécie de ostra *Crassostrea rhizophorae*, popularmente conhecida como ostra-do-mangue, gureri ou ostra-gaiteira, apresenta ampla distribuição, estendendo-se desde o sul do Brasil até o Caribe (BOFFI, 1979).

Até o momento, nada foi encontrado, na literatura consultada, a respeito de atividades biológicas ou farmacológicas desta espécie. Isto, aliado ao fato dela ser nativa de Santa Catarina, fez com que se optasse por também testá-la nesta dissertação.

2.2 VÍRUS ESTUDADOS

Os vírus escolhidos para este trabalho representam, em primeiro lugar, modelos virais de diferentes genomas, e apresentam diferenças também quanto a presença ou ausência de envelope (Quadro 1). Embora existam tratamentos para infecções provocadas por alguns deles, já foram isoladas cepas resistentes aos fármacos disponíveis no mercado e, até o momento, não existem vacinas contra eles. Por serem bem adaptados ao cultivo celular, são muito estudados em todo o mundo.

Quadro 1 – Características dos vírus usados neste estudo.

Família	Gênero	Espécie	Genoma	Envoltório	Manifestações Clínicas
Herpesviridae	Herpes simplex 1	<i>Herpesvírus humano-1</i>	DNA dupla fita	(+)	Infecções cutâneo-mucosas, queratoconjuntivites, encefalites, etc.
Adenoviridae	Mastadenovírus	<i>Adenovirus humano-5</i>	DNA dupla fita	(-)	Infecções do trato respiratório
Reoviridae	Rotavírus	<i>Rotavírus símio SA11</i>	RNA dupla fita	(-)	Gastroenterites

2.2.1 Vírus Herpético Tipo 1

Os vírus herpéticos humanos fazem parte da família Herpesviridae, e são divididos em três subfamílias: α , β e γ -Herpesvirinae, de acordo com suas propriedades biológicas. Atualmente, existem cerca de 100 herpesvírus parcialmente caracterizados, sendo oito os humanos, além do herpes vírus símio, que pode também infectar o homem (ROIZMAN, 1996; SANTOS, 2000).

O *Herpes Simplex Vírus* tipo 1 (HSV-1) pertencente à subfamília α -Herpesvirinae, é composto de um cerne contendo DNA linear, de fita dupla, associado às proteínas do core, ancorado por fibrilas à um capsídeo icosaédrico de 100 nm de diâmetro, composto de 162 capsômeros e de um envelope lipoprotéico. Seu genoma é um dos maiores genomas dos herpesvírus humanos, codificando cerca de 70 a 200 proteínas (WHITE; FENNER, 1994).

Resumidamente, o ciclo de multiplicação do HSV-1 consiste nas seguintes etapas (ROIZMAN, 1996);

- ✓ Adsorção: ocorre a ligação específica dos receptores superficiais das células hospedeiras com as glicoproteínas do envelope viral;
- ✓ Penetração e desnudamento: a principal via de penetração do HSV é por fusão na membrana da superfície celular, mas também pode ocorrer por endocitose. Neste último caso, o capsídeo é digerido por enzimas lisossomais celulares, enquanto que no primeiro caso, a fusão do envelope com a membrana celular permitirá que o material genético seja liberado, iniciando a replicação viral;
- ✓ Transcrição, tradução e replicação: a transcrição e a síntese protéica prosseguem de forma coordenada, reguladas em três fases: imediata (α), precoce (β), e tardia (γ). Os produtos imediatos e precoces são algumas enzimas, que promovem a replicação do DNA viral e enzimas destruidoras, que iniciam a degradação do RNAm celular. Após a replicação, os genes tardios são transcritos e codificam proteínas estruturais do capsídeo e outras proteínas que formarão os vírions;
- ✓ Montagem e liberação dos vírions: as proteínas do capsídeo são transportadas para o núcleo, onde são reunidas em pró-capsídeos vazios ou preenchidos com DNA. Os nucleocapsídeos brotam de porções modificadas da membrana nuclear com glicoproteínas virais, e sofrem exocitose.

As manifestações clínicas primárias e recorrentes podem variar desde gengivomastites, faringotonsilites e herpes labial até querato-conjuntivites, encefalites e doença disseminada. Após a infecção primária, o indivíduo retém o DNA herpético no gânglio trigêmio por toda a vida, com no mínimo 50 % de chances de sofrer ataques recorrentes, várias vezes no decorrer da sua existência. Em pacientes imunocomprometidos, tais como os submetidos à transplantes, quimioterapia anticâncer e portadores do vírus HIV, as infecções latentes são freqüentemente reativadas (WHITE; FENNER, 1994).

2.2.2 Adenovírus humano sorotipo 5

Os adenovírus pertencem à família Adenoviridae e são subdivididos em 2 gêneros: *Mastadenovirus* e *Aviadenovirus*. No primeiro, são encontrados os agentes que acometem mamíferos e marsupiais e, no segundo, os responsáveis por algumas doenças de aves. A partícula viral apresenta um tamanho médio de 70 a 90 nm, com capsídeo de morfologia icosaédrica, constituído por 252 capsômeros sem envelope. O material genético viral é composto por DNA de filamento duplo associado a proteínas (FLINT et al., 2000).

Segundo White e Fenner (1994), o ciclo de multiplicação dos adenovírus envolve as seguintes etapas:

- ✓ Adsorção: ocorre a ligação específica dos receptores superficiais das células hospedeiras com a proteína CAR (*Coxsackievirus and Adenovirus Receptor*);
- ✓ Penetração e desnudamento: a principal via de penetração é por endocitose, que requer a ativação da enzima fosfatidilinositol-3-OH quinase;
- ✓ Transcrição, tradução e replicação: o capsídeo externo é removido e o genoma viral, ao qual estão associadas histonas, liga-se ao núcleo onde ocorre a transcrição do RNAm, a replicação do DNA e a montagem dos vírions. No núcleo, o genoma viral é transcrito pela RNA polimerase II celular, de acordo com um programa complexo que envolve as 2 fitas de DNA. Posteriormente, a replicação do DNA viral envolve a formação de proteínas estruturais, as quais são produzidas em excesso;
- ✓ Montagem e liberação dos vírions: as proteínas do capsídeo são transportadas para o núcleo, onde são reunidas em pró-capsídeos vazios ou preenchidos com DNA. Os nucleocapsídeos brotam de porções modificadas da membrana nuclear com glicoproteínas virais, e sofrem exocitose.

Os adenovírus humanos são reconhecidos como agentes etiológicos causadores de diversas doenças, tais como infecções gastrointestinais, urinárias, do trato respiratório e do globo ocular. As principais formas de infecção se dão pela via respiratória (pessoa-pessoa e ar, através da inalação de aerossóis) e pela via feco-oral (pessoa-pessoa, ingestão de água e alimentos contaminados) (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 1996; KIDD et al., 1996; ALLARD; ALBINSSONN; WADELL, 1992; ALLARD; KAJON; WADELL, 1994; AVELLÓN et al., 2001). As infecções por adenovírus ocorrem durante todo o ano, com pequena ou nenhuma variação sazonal de liberação destes vírus para o ambiente (CHAPRON et al., 2000).

Os sintomas clínicos em crianças incluem diarreia, vômitos e febre e, em comparação com as infecções causadas por rotavírus, os adenovírus entéricos causam diarreia menos severa, porém por um período mais prolongado, podendo persistir por semanas. Estudos sorológicos indicam que 50% das crianças mais velhas e adultos jovens apresentam imunidade à doença (WHITE; FENNER, 1994).

Os adenovírus entéricos e os não entéricos, responsáveis pelas infecções respiratórias e do globo ocular, podem ser isolados das fezes, sendo assim, detectados em esgotos, rios, mares e moluscos (PINA et al., 1998)

As infecções respiratórias são provocadas pelos adenovírus tipos 1 a 7, que causam faringite aguda, faringoconjuntivite, pneumonia e inflamação nas tonsilas. O adenovírus sorotipo 5 está associado ao quadro clínico de tosse (WIEDBRAUK; JOHNSTON, 1992).

2.2.3 *Rotavírus*

Os rotavírus são um gênero pertencente à família Reoviridae (MATTION; COEEN; ESTES, 1994; BISHOP, 1996). Os vírions apresentam morfologia esférica com simetria icosaédrica, não-envelopados, e possuem cerca de 72 nm de diâmetro. O genoma é constituído de RNA dupla-fita, consistindo de 11 segmentos separados, que possuem de 18 a 27 kpb no total. Cada segmento representa um gene que codifica uma proteína seja ela estrutural ou não estrutural (ESTES; GRAHAN; MASON, 1981).

As proteínas estruturais são denominadas VP e numeradas de 1 a 7, de acordo com o gene pelo qual cada uma é codificada. A VP7 (codificada pelo gene 7, 8 ou 9 dependendo da cepa viral) é glicosilada e forma o capsídeo externo, que é penetrado por mais de 60 espículas da proteína VP4 (codificada pelo gene 4), esta

proteína é hemaglutinante e responsável pelo ataque do vírus à célula (GLASS, 1996). A VP6 forma o capsídeo interno. O núcleo interno é composto pelas proteínas VP1, VP2 e VP3 (codificadas pelos genes 1, 2, 3 respectivamente) (WHITE; FENNER, 1994).

São reconhecidos sete sorogrupos de rotavírus, definidos de acordo com a antigenicidade da proteína VP6, e nomeados de A a G, mas somente três são infectantes para o homem (A, B e C). Os rotavírus do grupo A podem ainda ser subdivididos de acordo com a antigenicidade de VP6 em subgrupos I e II. Rotavírus do grupo A são freqüentemente identificados como o mais importante patógeno viral de doenças diarréicas, que requerem tratamento ou hospitalização em crianças abaixo de 2 anos de idade, e são os maiores responsáveis por diarréias severas em crianças no mundo todo (GLASS et al., 1996; KAPIKIAN; CHANOCK, 1996).

De forma resumida, as etapas do ciclo de replicação dos rotavírus podem ser descritas da seguinte forma:

- ✓ Adsorção: esta depende da presença de ácido siálico na superfície celular (CIARLET; ESTES, 1999), mas as integrinas também podem estar envolvidas no primeiro contato dos rotavírus com as células hospedeiras (GRAHAM et al., 2003);
- ✓ Penetração e desnudamento: os vírus podem entrar nas células por endocitose ou diretamente através da membrana plasmática, perdem a capa externa e a transcrição é ativada (KAPIKIAN; CHANOCK, 1996);
- ✓ Transcrição, tradução e replicação: o início da síntese dos RNAs mensageiros virais ocorre através da transcriptase viral VP1 e da guanililtransferase VP3. Estes RNAs mensageiros irão sintetizar as proteínas virais e os RNAs de dupla fita, que constituirão o genoma da progênie viral. A partir do acúmulo de uma grande quantidade de proteínas virais nas células infectadas, formam-se grandes inclusões citoplasmáticas chamadas viroplasmas, onde ocorre a montagem das partículas com dupla camada (formadas por VP2 e VP6) e a finalização da replicação do RNA viral (GALLEGOS; PATTON, 1989);
- ✓ Montagem e liberação dos vírions: uma vez formadas, as proteínas de dupla camada abandonam o viroplasma, e adquirem a capa externa, formada através da membrana do retículo endoplasmático. Finalmente, os vírus maduros são liberados mediante a lise da célula (ALTENBURG; GRAHAM; ESTES, 1980).

A via de contaminação é feco-oral e o período de incubação é cerca de 48 horas. Os sintomas são gastroenterite com vômitos, diarreia aquosa e um pouco de febre. Em pacientes imunocomprometidos e pacientes com HIV, os rotavírus podem causar várias complicações associadas às diarreias, tais como desidratação, desequilíbrios eletrolíticos, acidose, sintomas neurológicos e infecção persistente, com grande envolvimento de todo o organismo (GILGER et al., 1992).

Em adultos, os casos de gastroenterites causadas pelos rotavírus são menos frequentes e estão associadas à contaminação pelos rotavírus do grupo B (SHAW; HEMPSON, 1996), ocorrendo pelo contato com crianças infectadas (NAKATA et al., 1987) ou através da ingestão de água ou alimentos contaminados. (HUNG et al., 1984; DUBOIS et al., 1997). A resistência à infecção severa relacionada à idade pode ser devida à imunidade ativa reforçada por infecção repetida através da vida (BISHOP, 1996).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Avaliar a potencial atividade antiviral de peptídeos antimicrobianos puros de diferentes origens e da hemolinfa de ostras de duas espécies (*Crassostrea gigas* e *C rhizophorae*).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a citotoxicidade de oito peptídeos antimicrobianos e da hemolinfa de duas espécies de ostras frente às células VERO, MA104 e HEp-2, através do ensaio colorimétrico do MTT.
- ✓ Avaliar a potencial atividade antiviral destes materiais, através da inibição da replicação do vírus herpético humano do tipo 1 (HSV-1), do adenovírus humano sorotipo 5 (AdV-5) e do rotavírus símio (RV-SA11) pelo ensaio colorimétrico do MTT, usando diferentes estratégias metodológicas, e através do estudo da ação virucida.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS DE ESTUDO

4.1.1 Peptídeos Antimicrobianos

4.1.1.1 Gomesina¹

Peptídeo isolado da hemolinfa da aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana*, (SILVA JUNIOR; DAFFRE; BULET, 2000).

4.1.1.2 Peneidina²

Peptídeo isolado do camarão *Litopenaeus vannamei*. Neste trabalho foi usada uma mistura de duas peneidinas recombinantes análogas da Pen3a, que tiveram as alaninas da posição 8 substituídas por treoninas para evitar a O-glicosilação na síntese pela levedura (DESTOUMIEX et al., 1999; YANG et al., 2003).

4.1.1.3 Fator Anti-lipopolissacarídeo² (FAL)

Peptídeo isolado do camarão *Litopenaeus vannamei* (dados não publicados).

4.1.1.4 Fragmento C-Terminal da Hemocianina² (FCTH)

Peptídeo isolado da hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei* (DESTOUMIEUX-GARZON, et al., 2001).

4.1.1.5 Clavanina A²

Peptídeo isolado do tunicado *Styela clava* (LEE et al., 1997).

4.1.1.6 Magainina²

Peptídeo isolado da secreção da pele do sapo *Xenopus laevis* (ZASLOFF et al., 1987) Neste trabalho foi usado um análogo sintético denominado MSI-94.

¹ Peptídeo gentilmente cedido pela Profa. Dra. Sirley Daffre (Departamento de Parasitologia, ICB, USP/SP).

² Peptídeos gentilmente cedidos pela Dra. Evelyne Bachère (IFREMER, Montpellier, França) através da Profa. Dra. Margherita Barraco (BEG/CCB/UFSC).

4.1.1.7 Taquiplesina²

Peptídeo isolado do limúlídeo *Tachypleus tridentatus* (MURAKAMI et al., 1991).

4.1.1.8 PW-2³

Peptídeo sintético (SILVA JUNIOR et. al., 2002).

O quadro 2 apresenta um resumo das principais características dos peptídeos utilizados neste estudo e as suas origens.

Quadro 2 – Características dos peptídeos usados neste estudo.

Peptídeo	No. ^a	Estrutura	Origem	Seqüência de aminoácidos
Gomesina	18	folha pregueada	aranha	ZCRRLCYKQRCVITYCRGR ^b QGA: QVYKGGYTRPIRPPPPVVRPLPGGPIGPYNGC FVSCRGISFSQARSCCSRLGRCCHVGKGYSG
Peneidina	62	mista	camarão	pEGA: PEVYKGGYTRPIRPPPPVVRPLPLPGGPIGPY NGCFVSCRGISFQARSCCSRLGRCCHVGKGYSG MRVSVLVSLVSLVAVFAPQCQAQGWEAVAAAV ASKIVGLWRNEKTELLGHECKFTVKPYLKRQVYYK
FAL	123	np	camarão	GRMWCPGWTAIRGEASTRSQSGVAGKTAKDFVRKA FQKGLISQQEANQWLSS
FCTH	24	linear	camarão	FEDLPNFGHHIQLKVFNHGEHIIH
Clavainina	23	alfa-hélice	tunicado	VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHVF ^b
Magainina (MSI-94)	23	alfa-hélice	sapo	GIGKFLKKAKKFGKAFVKIMKK ^b
Taquiplesina	17	folha pregueada	limúlídeo	KWCFRVCYRGICYRRCR ^b
PW-2	12	linear	recombinante	HPLKQYWWRPSI

^a Número de aminoácidos; ^b amidação C-terminal; (np) dados não publicados.

² Peptídeo gentilmente cedido pela Prof^a. Dr^a. Evelyne Bachère (IFREMER, Montpellier, França) através da Prof^a Dr^a Margherita Barraco (BEG/CCB/UFSC).

³ Peptídeo cedido gentilmente Prof. Dr. Arnaldo Silva Junior, UNICAMP/Campinas, SP.

4.1.2 Ostras

4.1.2.1 *Crassostrea gigas*

Os exemplares utilizados foram gentilmente fornecidos pelos criadores de ostras de cultivos comerciais de Cacupé, Santo Antônio e Sambaqui, Florianópolis-SC.

4.1.2.2 *Crassostrea rhyzophorae*

Os exemplares utilizados foram gentilmente fornecidos pelo Prof. Dr. Jaime Fernando Ferreira, provindas do cultivo experimental do Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos (LCMM) CCA/UFSC em Sambaqui, Florianópolis-SC.

4.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES-ESTOQUES DOS MATERIAIS DE ESTUDO

4.2.1 *Peptídeos Antimicrobianos*

Foram preparadas soluções-estoques a 1 μ M dos peptídeos, solubilizados em água Milli Q autoclavada. As soluções foram aliquotadas e armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até sua utilização.

4.2.2 *Hemolinfa de ostras*

A hemolinfa foi removida por punção do músculo adutor posterior, utilizando-se uma seringa de 5 mL, através de uma pequena abertura feita entre as duas valvas. A hemolinfa foi colocada em tubos de 50 mL, em banho de gelo, que foram centrifugados por 2 min a 2000 Xg, tendo sido separado o sobrenadante, plasma (p). Os sedimentos de hemócitos foram acrescentados de PBS, sonicados (F60 Sonic Dismembrator, Fisher Scientific[®]) por 15 seg, centrifugados e os sobrenadantes, conteúdo dos hemócitos (h) separados. Portanto, de cada espécie de ostra, foram testados duas amostras [**hemócitos (h) e plasma (p)**]. Após, foram feitas as dosagens de proteínas pelo método de Bradford (1976) e as amostras foram diluídas para se obter sempre 1 mg de proteína por mL de solução. As amostras foram filtradas assepticamente (filtros Millipore 0,22 μ m), aliquotadas e armazenadas a temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até sua utilização.

4.3 CULTURAS CELULARES

4.3.1 Células

Foram utilizadas as células VERO (ATCC: CCL 81), que são culturas contínuas de fibroblastos de rins de macaco verde da África (*Cercopithecus aethiops*), adquiridas do Instituto Adolfo Lutz, SP.

A linhagem celular HEp-2, que são células de carcinoma de orofaringe humana, adquiridas do Banco de células da UFRJ/RJ.

As células MA104 são culturas contínuas de fibroblastos de rins embrionários do macaco *Rhesus*, adquiridas do ICB/USP/SP.

Estas células foram selecionadas para este trabalho, porque são permissivas aos vírus utilizados permitindo sua replicação, e apresentando efeitos citopáticos visíveis, reprodutíveis e de fácil observação ao microscópio invertido.

4.3.2 Meio de Cultura e Reagentes

O meio utilizado para o crescimento e manutenção das células foi o Meio MEM (Sigma), adicionado de bicarbonato de sódio 2,2 g/L de meio. O meio MEM contém quase todos os aminoácidos e vitaminas, vários constituintes de ácidos nucleicos, metabólitos intermediários e fatores de crescimento acessórios. O pH do meio pode variar entre 7,2 a 7,4, como o pH sanguíneo, o que condiciona o uso de uma estufa com atmosfera de 5 % de CO₂ e 95 % de O₂, já que o sistema tampão utilizado é o HCO₃/CO₂. A atmosfera umidificada da estufa previne a evaporação e o aumento da osmolaridade do meio. O meio MEM não é, isoladamente, adequado para iniciação do crescimento celular, apesar de manter a viabilidade das culturas celulares, e foi, então, suplementado com Soro Fetal Bovino – SFB – (Gibco BRL) a 10 % para promoção do crescimento e a 5 % para manutenção das linhagens celulares. As culturas celulares infectadas com vírus foram mantidas com meio MEM não suplementado com SFB, já que alguns componentes do soro sabidamente inibem o ciclo de replicação viral (FRESHNEY, 1999).

Uma solução de antibióticos + antifúngico (PSA) foi adicionada ao meio como forma de prevenção de contaminações das culturas de células por bactérias, fungos e leveduras, na proporção de 1mL de penicilina-G/estreptomicina/anfotericina B (10.000 U de penicilina-G, 10.000 µg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B – Gibco BRL) para cada 100 mL de meio.

A enzima proteolítica tripsina a 0,25 % (tripsina de pâncreas de porco preparada em uma solução de EDTA 1: 250, Sigma) foi o agente de dispersão celular utilizado para a obtenção de subculturas, para a manutenção das culturas e para a realização dos experimentos.

4.4 VÍRUS

4.4.1 Origem das Cepas

Os experimentos foram realizados com os seguintes vírus:

- ✓ Vírus com genoma de DNA:
 - Adenovírus humano sorotipo 5 (AdV-5): (ICB/USP, SP)
 - Herpes vírus simplex humano tipo I (HSV-1): cepa KOS (Universidade de Rennes, França)
- ✓ Vírus com genoma de RNA:
 - Rotavírus (RV) símio SA-11 sorotipo G3 (ICB/USP, SP).

4.4.2 Preparo das Suspensões-Estoques Virais

Os estoques virais foram preparados conforme metodologia descrita anteriormente por Simões e colaboradores (1999).

4.4.2.1 HSV-1 e AdV-5

Cada suspensão viral utilizada neste trabalho foi inoculada em um frasco de cultura de 75 cm² de área, contendo uma monocamada de células VERO ou HEp-2, que foi cultivada em meio MEM, suplementado com 5 % de SFB e 1 % de PSA, tripsinizada 24 h antes da infecção. O meio de cultura foi aspirado da garrafa e a monocamada celular lavada 3X com PBS; após, foi inoculado 1 mL da suspensão viral e a garrafa mantida por 1 h a 37 °C, em estufa de CO₂ para que o vírus fosse adsorvido. O inóculo foi aspirado e 10 mL de meio MEM foram adicionados (sem SFB para as células VERO e com 2 % para as células HEp-2). A garrafa foi mantida em estufa nas mesmas condições descritas acima.

O efeito citopático viral foi monitorado por microscópio invertido a cada ciclo de replicação (18 h – HSV-1 e 32 h – AdV-5). É importante respeitar o tempo de cada ciclo, pois quando o tapete celular é destruído, os vírions liberados no meio sofrem, e o título infeccioso cai rapidamente. Após total destruição do tapete celular

o frasco foi congelado a - 80 °C e descongelado a 37 °C por 3X, para o rompimento total das células e liberação das partículas virais. A suspensão foi centrifugada a 350 Xg, durante 10 min, a 4 °C. O sobrenadante foi aliquoteado em tubos estéreis e armazenados a - 80 °C para posterior utilização.

4.4.2.2 RV-SA11

A suspensão viral foi inoculada em um frasco de cultura de 75 cm² de área, contendo uma monocamada de células MA104, cultivadas em 10 mL de meio MEM, suplementado com 5 % de SFB e 1 % de PSA, tendo sido tripsinizadas 24 h antes da infecção. O meio de cultura MEM foi aspirado da garrafa e a monocamada celular foi lavada 3X com PBS. A suspensão viral foi previamente mantida, durante 30 min, a 37 °C, na presença de 5 µg/mL de tripsina, pois o cultivo *in vitro* do rotavírus é dependente do tratamento com tripsina, visto que o produto da clivagem da proteína VP4 em VP5 e VP8 resulta no aumento da infectividade viral (ESTES; GRAHAN; MASON, 1981). Posteriormente, foi inoculado 1 mL desta suspensão viral, e incubou-se durante 1 h, a 37 °C, em estufa de CO₂, para permitir a adsorção e penetração viral e, então, o inóculo foi aspirado e 10 mL do meio MEM sem SFB e acrescido de 5 µg/mL de tripsina. A incubação foi feita nas mesmas condições acima relatadas. O ECP foi monitorado por microscópio invertido a cada 12 h, ciclo de replicação do rotavírus. Quando o tapete celular se mostrou totalmente infectado pelo vírus, o frasco foi congelado a - 80 °C e descongelado a 37 °C por 3X, para o rompimento total das células e liberação das partículas virais. A suspensão foi centrifugada a 350 Xg, durante 10 min, a 4 °C. O sobrenadante foi aliquoteado em tubos estéreis e armazenados a - 80 °C até sua utilização.

4.4.3 Determinação dos Títulos Infeciosos Virais

Antes de se iniciar os testes da potencial atividade antiviral dos extratos e dos compostos isolados, faz-se necessário conhecer a infectividade viral dos inóculos. A infectividade dos vírus pode usualmente ser determinada utilizando-se três diferentes metodologias: com cálculo da dose infectante a 50 % do tecido celular (TCID₅₀), das unidades formadoras de placas (pfu) ou das unidades formadoras de focos (ffu), dependendo do vírus utilizado.

Alguns conceitos básicos devem ser considerados antes de se iniciar a descrição dos métodos. Segundo Burleson, Chambers e Wiedbrauk (1992):

Infectividade viral é a capacidade que uma partícula viral possui de invadir uma célula e parasitá-la para se replicar;

MOI (multiplicidade de infecção) é o número de partículas virais por célula;

Título é o número de partículas virais infecciosas por unidade de volume;

Unidade infecciosa é a menor quantidade de vírus que produz algum efeito reconhecível na célula hospedeira;

Efeito citopático (ECP) é o conjunto de todas as lesões provocadas por uma partícula viral nas células onde ela se multiplica. A maioria dos vírus provoca modificações celulares específicas e fáceis de observar ao microscópio. No caso dos vírus herpéticos, o ECP se expressa pelo aparecimento de células arredondadas, brilhantes, freqüentemente ligadas umas às outras por prolongamentos citoplasmáticos, formando os focos. Esses focos têm o aspecto característico de cachos de uva, que se estendem pelo tapete celular, desorganizando-o (GIRARD; HIRTH, 1989). O ECP do adenovírus é caracterizado pela presença de células arredondadas e agrupadas em focos, as quais, eventualmente, se descolam do frasco de cultura celular. O ECP dos rotavírus é caracterizado por células arredondadas e granulação. Eventualmente, as células se destacam, desintegrando a monocamada (WIEDBRAUK; JOHNSTON, 1992).

4.4.3.1 Titulação do HSV-1

O HSV-1 utilizado neste trabalho foi titulado segundo o método das diluições limites, com cálculo do ponto de infecção a 50 %, de acordo com a metodologia clássica de Reed e Munch (1938).

Procedimento: Preparou-se uma série de diluições 1:10, a partir de uma suspensão-estoque viral (HSV-1) de título desconhecido. Inoculou-se esta série nas células VERO (2×10^5 células/mL), cultivadas em meio MEM, com 5 % de SFB, por 24 h, e o efeito citopático viral, decorrente da replicação de até uma única partícula viral, foi observado microscopicamente. A titulação foi realizada em placas de microtitulação de 96 cavidades, na razão de 12 poços por cada diluição, cada poço contendo 50 μ L da suspensão viral. Após incubação a 37 °C, 5 % de CO₂, durante 72 h (= 4 ciclos de multiplicação do HSV-1), foi contado o número de poços onde o efeito citopático foi positivo e negativo, e foi então determinada a diluição que produz resposta positiva em 50 % das amostras (TCID₅₀ = 50 % tissue culture infectious dose = ID₅₀ = dose infectante 50 %).

4.4.3.2 Titulação do AdV-5

Foi determinado através do método de contagem das placas de lise (BURLESON; CHAMBERS; WIEDBRAUK, 1992).

Procedimento: Células HEp2, em uma densidade aproximada de 2×10^5 células/mL, foram cultivadas em placas de 24 cavidades com meio MEM, suplementado com 5 % de SFB, até atingirem confluência (= 24 h). O inóculo viral (AdV-5) foi diluído em forma seriada (razão 1:10) em meio MEM sem SFB e com antibióticos/antifúngico. O meio foi aspirado e 500 μ L das diferentes diluições foram adicionadas em cada cavidade (três réplicas para cada diluição). As placas foram incubadas a 37 °C, estufa com 5 % de CO₂, durante 1 h e, a cada 15 min, foram suavemente agitadas para uma melhor distribuição do inóculo viral. Após esse tempo, o inóculo foi removido e foi adicionado 1,0 mL da seguinte solução: meio MEM 2X + solução aquosa a 1,5 % de carboximetilcelulose, na proporção 1:1, previamente esterilizada. As placas foram, então, novamente incubadas, durante 120 h (= 4 ciclos de multiplicação AdV-5). Após este período, o meio foi retirado e as células fixadas e coradas pela adição de 500 μ L do corante preto de naftaleno (Sigma) preparado da seguinte forma: 0,1 g do corante em 100 mL de uma solução aquosa a 5 % de ácido acético (v/v), pH 2,3-2,5. Esta mistura foi filtrada através de papel de filtro e estocada a 4° C. As células foram incubadas com o corante durante 30 min, a temperatura ambiente. Após este período, o corante foi aspirado e as placas foram deixadas para secar ao ambiente e quantificadas através da visualização por microscópio estereoscópio. Para calcular o título, contaram-se os focos de infecção que se apresentaram na última diluição, que se caracterizam por áreas claras de lise celular, chamadas de placas. O título infeccioso é expresso através do número de unidades formadoras de placas/mL (pfu/mL) e, portanto, de partículas virais, já que teoricamente cada placa é iniciada pela infecção de uma única partícula viral infectante. O título viral foi calculado através da fórmula:

$\text{n}^\circ \text{ de placas formadas na última diluição} \times \text{recíproca da diluição} \times \text{recíproca do volume (mL)}$

4.4.3.3 Titulação do RV-SA11

Foi titulado por imunofluorescência indireta (BARARDI et al., 1998).

Procedimento: Células MA104 foram cultivadas na concentração de 5×10^4 células/mL em meio MEM durante 24 h, em placas de 8 cavidades, especiais para este tipo de ensaio, até a formação de um tapete confluyente. A suspensão viral (RV-SA11) foi diluída de forma seriada (razão 1:10), em meio MEM (sem SFB acrescido de 5 $\mu\text{g/mL}$ de tripsina) e distribuída nas placas. Para a infecção viral, as células contidas em cada cavidade foram semeadas com 100 μL de cada diluição viral. As placas foram incubadas durante 60 min com o RV-SA11, a 37 °C, em atmosfera de 5 % em estufa de CO_2 para que ocorresse a adsorção dos vírus às células. Após esse período, o inóculo foi removido e, em seu lugar, foram adicionados 300 μL de meio MEM. As células foram, então, incubadas durante 24 h (= 4 ciclos de multiplicação do rotavírus), sob as mesmas condições de temperatura e atmosfera acima mencionadas. Após o período de incubação, o meio foi removido das placas. Em seguida, as células foram fixadas pela adição de 300 μL de metanol a - 20 °C e mantidas, durante 5 min, a temperatura ambiente. Esta etapa foi repetida para garantir a fixação adequada das células e, posteriormente, as placas foram secas ao ar. As células foram reidratadas com 300 μL de PBS, que foi retirado após 5 min. A próxima incubação foi realizada com 300 μL da solução bloqueadora (PBS, soroalbumina bovina a 1 % e Tween 20 a 0,05 %), durante 15 min. Posteriormente, em cada cavidade foram adicionados 100 μL de sobrenadante do hibridoma contendo o anticorpo monoclonal anti-rotavírus Mab60, diluído 1:1 em solução bloqueadora para o rotavírus; as placas foram incubadas, durante 12 h, a 4 °C. Após, as células foram lavadas 3X com solução bloqueadora e, finalmente, incubadas, durante 15 min, a 37 °C, com 100 μL do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a fluoresceína (FITC, Sigma), diluído 1:100. As células foram novamente lavadas 3X com solução bloqueadora. Deixou-se secar e adicionou-se 10 μL de meio de montagem [PBS 40 %, glicerol 50 %, formalina 5 %, NaCl 5 % e DABCO (1,4-diazabicyclo-2,2,2-octano) 2,5 %; pH 8,6]. As placas foram recobertas com lamínulas para a realização da leitura em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 40), com um filtro de excitação verde (515-560 nm), 200X. O título viral foi determinado através da contagem do número de células

fluorescentes na maior diluição viral, sendo expresso em unidades formadoras de focos/mL (ffu/mL).

4.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

4.5.1 Avaliação da Viabilidade Celular Através do Ensaio Colorimétrico com Sal de Tetrazolium (MTT)

O sal de tetrazolium MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium] é um composto hidrossolúvel, que em solução apresenta coloração amarelo-pálido e é facilmente incorporado por células viáveis, que reduzem este composto em suas mitocôndrias pelas desidrogenases. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em formazana, um composto de coloração azul-escuro, não solúvel em água e fica armazenado no citoplasma celular. O ensaio colorimétrico com MTT mede a quantidade de formazana formado através de espectrofotometria e é sensível e quantitativo, já que o valor da absorbância é proporcional ao número de células viáveis.

Neste trabalho, foi utilizado o ensaio colorimétrico do MTT, conforme proposto por Takeuchi, Baba e Shigeta (1991), com algumas modificações segundo Sieuwerts e colaboradores (1995), padronizado por Freitas (2001) e com pequenas alterações propostas por Andrighetti-Fröhner e colaboradores (2003b).

Procedimento: Células VERO, HEp-2 e MA104 foram cultivadas em placas de microtitulação de 96 cavidades ($2,5 \times 10^4$ células/cavidade, 100 μ L/cavidade) até confluência (= 24 h) usando meio MEM suplementado com 5 % de SFB, a 37 °C e 5 % CO₂. O meio foi retirado por aspiração e foram adicionados 200 μ L dos materiais-teste diluídos seriadamente (razão 1:2), em meio MEM sem SFB. Foram feitos controles celulares (200 μ L meio MEM) e branco (100 μ L de DMSO). Após, as placas foram novamente incubadas, por 4, 5 e 3 dias, respectivamente, para as células VERO, HEp-2 e MA104. Posteriormente, foi aspirado todo o meio e adicionou-se 50 μ L de MTT (Sigma, 1 mg/mL), diluído em meio MEM, em todas as cavidades, e as placas foram incubadas por mais 4 h, nas mesmas condições. Após o período de incubação, foi retirado o meio + MTT de cada cavidade, cuidadosamente, sem danificar as células, e adicionou-se 100 μ L de DMSO nas cavidades para solubilizar o formazana. As placas foram agitadas levemente a temperatura ambiente, por 10 min, para que todo o formazana fosse solubilizado e

lidas a 540 nm num espectrofotômetro (Bio-Tek, El_x 800). O percentual de citotoxicidade foi calculado como $[(A-B)/A \times 100]$, onde A e B foram as absorvâncias lidas, relativas aos materiais-testes e aos controles celulares, respectivamente. Para cada material-teste, foi calculado o valor de CC₅₀, que é definido como a concentração do material que reduz a absorvância em 50 %, quando comparada com a absorvância dos controles.

4.6 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL

4.6.1 Ensaio Colorimétrico com Sal de Tetrazolium (MTT)

A avaliação da atividade antiviral foi realizada da mesma forma que para a citotoxicidade (item 4.5.1), porém com a adição das suspensões virais, usando três estratégias metodológicas diferentes.

4.6.1.1 Adição simultânea dos materiais-teste + vírus

Procedimento: Células VERO, HEp-2 e MA104 foram cultivadas em placas de microtitulação de 96 cavidades ($2,5 \times 10^4$ células/cavidade) até confluência (= 24 h) usando meio MEM suplementado com 5 % de SFB, a 37 °C e 5 % CO₂. O meio foi retirado por aspiração e foram adicionados 100 µL dos materiais-teste diluídos (razão 1:2) em meio MEM sem SFB e 100 µL da suspensão viral (HSV-1, AdV-5 ou RV-SA11), com MOI de 0,5, em cada cavidade. Foram feitos controles celulares (200 µL meio MEM), controles virais (100 µL suspensão viral + 100 µL meio), controle positivo para os testes envolvendo o HSV-1 (100 µL suspensão viral + 100 µL aciclovir 10 µg/mL) e branco (100 µL de DMSO). Após, as placas foram novamente incubadas, por 96 h, 120 h e 72 h, respectivamente, para as células VERO infectadas com HSV-1, HEp-2 infectadas com AdV-5 e MA104 infectadas com RV-SA11. Posteriormente, aspirou-se todo o meio e foram adicionados 50 µL de MTT (Sigma, 1 mg/mL) diluído em meio MEM, em todas as cavidades, e as placas foram incubadas por mais 4 h, nas mesmas condições. Após o período de incubação, foi retirado o meio + MTT de cada cavidade, cuidadosamente, sem danificar as células, e foram adicionados 100 µL de DMSO nas cavidades para solubilizar o formazana. As placas foram agitadas levemente a temperatura ambiente, por 10 min, para que todo o formazana fosse solubilizado e lidas a 540 nm num espectrofotômetro (Bio-Tek, El_x 800) (ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al., 2003b).

Para cada material-teste, foi calculado o valor de CE_{50} , que é definido como a concentração que inibe em 50 % a replicação viral, quando comparada com os controles virais. Utilizou-se a seguinte fórmula para a avaliação da atividade antiviral (% inibição):

$$(A - B) / C - B \times 100 = \% \text{ inibição}$$

A,B,C= absorbâncias dos materiais-testes, dos controles virais e dos controles celulares, respectivamente.

Quando de posse dos valores de CC_{50} e de CE_{50} , foi possível calcular o índice de seletividade ($IS = CC_{50}/CE_{50}$), que indica quão promissora é a atividade antiviral do material-teste em questão.

Ao se utilizar o ensaio do MTT para avaliar a atividade antiviral é importante obter um valor igual ou inferior a 0,2 na razão $(A)_{CV}/(A)_{CC}$. Isto significa que a garantia da sensibilidade do ensaio se deve à diferença entre os valores de absorvância (A) (entenda-se viabilidade celular) dos controles viral (CV) e celular (CC). O ideal é que, ao final do tempo de incubação da placa, o controle celular esteja viável enquanto o controle viral esteja totalmente destruído. Qualquer porcentagem de viabilidade celular detectada nos testes será conferida à ação antiviral do material em teste e o grau desta proteção poderá ser calculado para cada concentração do material testado (TAKEUCHI; BABA; SHIGETA, 1991).

4.6.1.2 Pré-tratamento das células com os materiais-testes, antes da adição dos vírus

Procedimento: Células VERO, HEP-2 e MA104 foram cultivadas em placas de microtitulação de 96 cavidades ($2,5 \times 10^4$ células/cavidade) até confluência (= 24 h) usando meio MEM suplementado com 5 % de SFB, a 37 °C e 5 % CO_2 . O meio foi retirado por aspiração e foram adicionados 100 μ L dos materiais-teste diluídos (razão 1:2), em meio MEM sem SFB, que ficaram em contato com o tapete celular por 3 h. Decorrido este período, os materiais-teste foram aspirados, e adicionou-se 100 μ L meio com 100 μ L da suspensão viral (HSV-1, AdV-5 ou RV-SA11), com MOI de 0,5, em cada cavidade. Foram feitos controles celulares (200 μ L meio MEM), controles virais (100 μ L suspensão viral + 100 μ L meio), controle positivo para os testes envolvendo o HSV-1 (100 μ L suspensão viral + 100 μ L aciclovir 10 μ g/mL) e

branco (100 μ L de DMSO). Após, as placas foram incubadas novamente por 96 h, 120 h e 72 h, respectivamente, para as células VERO infectadas com HSV-1, células HEp-2 infectadas com AdV-5 e células MA104 infectadas com RV-SA11. Posteriormente, aspirou-se todo o meio e adicionou-se 50 μ L de MTT (Sigma, 1 mg/mL), diluído em meio MEM, em todas as cavidades, e as placas foram incubadas por 4 h, nas mesmas condições. Após o período de incubação, foi retirado o meio + MTT de cada cavidade, cuidadosamente, sem danificar as células, e foram adicionados 100 μ L de DMSO nas cavidades para solubilizar o formazana. As placas foram agitadas levemente a temperatura ambiente, por 10 min, para que todo o formazana fosse solubilizado e lidas a 540 nm num espectrofotômetro (Bio-Tek, Elx 800) (BETTEGA et al., 2004 modificado).

Da mesma forma que no item anterior, foram calculadas os valores de IS (CC_{50}/CE_{50}) para cada material teste.

4.6.1.3 Pós-tratamento das células infectadas com os materiais-testes

Procedimento: Células VERO, HEp-2 e MA104 foram cultivadas em placas de microtitulação de 96 cavidades ($2,5 \times 10^5$ células/cavidade) até confluência (= 24 h) usando meio MEM suplementado com 5 % de SFB, a 37 °C e 5 % CO_2 . O meio foi retirado por aspiração e foram adicionados 100 μ L da suspensão viral dos vírus (HSV-1, AdV-5 ou RV-SA11), com MOI de 0,5, que ficaram em contato com o tapete celular por 2 h. Decorrido este período, a suspensão viral foi aspirada, e foram adicionados 100 μ L de PBS para a lavagem; retirou-se toda a suspensão viral das cavidades e logo após foram adicionados 100 μ L dos materiais-teste diluídos (razão 1:2) em meio MEM sem SFB. Foram feitos controles celulares (200 μ L meio MEM), controles virais (100 μ L suspensão viral + 100 μ L meio), controle positivo para os testes envolvendo o HSV-1 (100 μ L suspensão viral + 100 μ L aciclovir 10 μ g/mL) e branco (100 μ L de DMSO). Após, as placas foram novamente incubadas por 96 h, 120 h e 72 h, respectivamente, para as células VERO infectadas com HSV-1, células HEp-2 infectadas com AdV-5 e células MA104 infectadas com RV-SA11. Posteriormente, aspirou-se todo o meio e adicionou-se 50 μ L de MTT (Sigma, 1 mg/mL), diluído em meio MEM, em todas as cavidades, e as placas foram incubadas por 4 h, nas mesmas condições. Após o período de incubação, foi retirado o meio + MTT de cada cavidade, cuidadosamente, sem danificar as células, e adicionou-se 100 μ L de DMSO nas cavidades para solubilizar o formazana. As placas foram

agitadas levemente a temperatura ambiente, por 10 min, para que todo o formazana fosse solubilizado e lidas a 540 nm num espectrofotômetro (Bio-Tek, Elx 800) (BELAIDE et al., 2002 modificado).

Da mesma forma que no item anterior, foram calculadas os valores de IS (CC_{50}/CE_{50}) para cada material teste.

4.6.2 Avaliação da Ação Virucida

Em microtubos tipo Eppendorff foram misturados 100 μ L das suspensões-estoques dos vírus estudados com 100 μ L dos materiais-teste diluídos em meio MEM sem SFB, em concentrações iguais aos valores de suas CC_{50} , durante 2 h, a 37 °C. Após, foram determinados os títulos infecciosos, conforme já descrito no item 4.4.3.1., e a redução dos mesmos, provocada pelos materiais-teste, foi avaliada com relação aos controles virais (BETTEGA et al., 2004).

$$\% \text{ de inativação} = \frac{\text{título CV} - \text{título T} \times 100}{\text{título CV}}$$

(T= teste; CV= controle viral).

4.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Tanto na avaliação da citotoxicidade, como na avaliação da potencial atividade antiviral, foi utilizada a metodologia de blocos completamente casualizados (BCC) e um arranjo multifatorial dos tratamentos (SOKAL; ROHLF, 1995), onde cada cavidade da placa constitui uma unidade experimental e os tratamentos foram realizados com os diferentes peptídeos e hemolinfa de ostras *versus* as diferentes concentrações testadas.

Os tratamentos foram distribuídos aleatoriamente entre as cavidades da placa, tendo sido feitas três repetições, em placas diferentes e em dias diferentes. O sorteio dos tratamentos com relação às unidades experimentais aumenta a probabilidade de que possíveis fatores interferentes desconhecidos fiquem igualmente distribuídos nos blocos e faz com que a estimativa dos valores e médias dos tratamentos e do erro experimental não sejam tendenciosas. Cada bloco (placa) agrupa uma repetição de todos os tratamentos.

Realizou-se uma análise de regressão linear para calcular os valores de CC_{50} (concentração que causa citotoxicidade a 50 % das células de uma cavidade) e de CE_{50} (concentração que inibe a multiplicação viral em aproximadamente 50% das células de uma cavidade), a partir de curvas de concentração *versus* efeito.

A análise estatística dos dados obtidos foi feita através da análise de variância de cada grupo de substância, no nível de significância de 5 % ($p < 0,05$), avaliando os diferentes materiais-teste *versus* diferentes concentrações *versus* as destruições celulares causadas pelos vírus. Quando foi necessário, a separação de médias foi feita pelo teste de Tukey, e o programa estatístico utilizado foi o Statgraphics®.

O estudo de qualquer atividade farmacológica em cultura celular tem como vantagem, entre muitas outras, a homogeneidade das amostras. Um erro grave que, normalmente, é cometido quando se trata de experimentos realizados em placas de microtitulação, é acreditar que, colocando-se as mesmas concentrações de um material-teste, em duas ou três colunas na placa, se estaria fazendo uma duplicata ou triplicata. Estatisticamente, esse procedimento é considerado apenas uma réplica de um mesmo tratamento e não uma repetição, pois a variância devido a fatores externos (erro experimental) não estaria sendo levada em consideração (SOKAL; ROHLF, 1995). Por isso, foram realizados três experimentos independentes, em dias subseqüentes, o que caracteriza uma triplicata.

5 RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DOS TÍTULOS VIRAIS

Os títulos infecciosos das soluções-estoques virais foram determinados conforme as metodologias descritas no item 4.4.3. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Títulos infecciosos dos estoques virais utilizados.

Vírus	Títulos
HSV-1 cepa KOS	$5 \times 10^{6,68}$ TCID ₅₀ /mL
AdV-5	$1,6 \times 10^8$ pfu/mL
RV-SA11	$3,4 \times 10^7$ ffu/mL

5.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Os requisitos essenciais para um fármaco antiviral são sua eficácia e o mínimo de toxicidade às células hospedeiras, por isso antes da avaliação da atividade antiviral de um determinado produto é necessária a avaliação da sua citotoxicidade (VANDEN BERGHE; VLIETINCK; VAN HOOFF, 1986). A relação entre os efeitos farmacológicos e tóxicos de um composto é um requisito importante quando se está verificando sua aplicabilidade como agente terapêutico (MELO, 2000).

A citotoxicidade foi definida por Nardone (1977) como sendo o conjunto de alterações da homeostase celular que leva a uma série de modificações que interferem na capacidade adaptativa das células, bem como sua sobrevivência, multiplicação e realização de suas funções metabólicas. A intensidade da lesão celular depende de vários fatores, tais como a concentração do material testado, o tempo de exposição, o tipo de célula, a capacidade do composto em penetrar na célula, entre outras (HU; HSIUNG, 1989).

Os ensaios mais freqüentemente utilizados para a avaliação da citotoxicidade baseiam-se na alteração da permeabilidade celular, nas funções mitocondriais e nas alterações da morfologia celular e da proliferação celular. Esses ensaios já estão

estabelecidos para muitos tipos de células e avaliam diferentes aspectos das funções celulares (VLINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGHE, 1997; WILSON, 2000; EISENBRAND et al., 2002).

Um destes testes que é bastante utilizado é o ensaio colorimétrico do MTT. O sal de tetrazolium MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium] é um composto hidrossolúvel, que em solução apresenta coloração amarelo-pálido e é facilmente incorporado por células viáveis, as quais reduzem esse composto em suas mitocôndrias pelas desidrogenases. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em um composto formazana, de coloração azul-escuro, insolúvel em água, que fica armazenado no citoplasma celular. O ensaio colorimétrico com MTT mede a quantidade formada de formazana formado através de espectrofotometria, e é sensível e quantitativo, já que o valor da absorbância é proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983; DENIZOT; LANG, 1986; BARILE, 1994). Este ensaio é apropriado para uma variedade de linhagens celulares, que exibem crescimento exponencial em cultura e alto nível de atividade mitocondrial. Deve-se levar em consideração que alguns compostos afetam seletivamente a mitocôndria, resultando em uma superestimação da toxicidade, já que o MTT sofre conversão enzimática em células viáveis e outros compostos podem inibir este processo, fazendo com que o composto pareça mais tóxico do que ele realmente é (BARILE, 1994; SMEE et al., 2002).

Os testes de citotoxicidade foram realizados com células em crescimento e não em fase estacionária, pois os efeitos tóxicos dos materiais-teste podem ser subestimados, já que o metabolismo de células em fase estacionária é geralmente menor; além disso, altas densidades celulares podem influenciar a disponibilidade dos alvos (COS et al., 2001).

A avaliação da citotoxicidade dos peptídeos antimicrobianos e da hemolinfa de ostras, testados nesta dissertação, frente às células VERO, HEp-2 e MA104, foi realizada através do ensaio colorimétrico com MTT, conforme metodologia descrita no item 4.4.3. Os valores de CC_{50} , obtidos através da análise de regressão, estão apresentados nas Tabelas 2 e 3.

5.2.1 Peptídeos Antimicrobianos

A incubação nas diferentes linhagens celulares foi feita com concentrações crescentes dos peptídeos. Para o PW-2 as concentrações testadas foram de 0,98 a 125 μM , para o FCTH de 0,63 a 80 μM , e para os demais de 0,78 a 100 μM .

Os peptídeos PW-2, peneidina e FCTH não foram tóxicos para as células VERO, nas maiores concentrações testadas, assim como o PW-2 para as células MA104. Todos os PAMs testados apresentaram toxicidade para as células HEp-2 (Tabela 2).

A citotoxicidade de análogos da magainina foi demonstrada em um estudo que avaliou simultaneamente a sua potencial atividade anti-herpética, no qual todos os peptídeos avaliados, com exceção do MSI-63, não foram tóxicos para as células VERO em concentrações superiores a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ após 72 horas. O peptídeo MSI-63 exibiu um valor de CC_{50} de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (EGAL et al., 1999). Já Yasin e colaboradores (2000), mostraram que outro análogo da Magainina-1, MSI-78, na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, apresentou um percentual de toxicidade em células ME-180, de aproximadamente 37%, ou seja, não sendo tóxico para 50 % das células.

As magaininas I e II quando avaliadas quanto a sua citotoxicidade frente células VERO durante 24 horas não foi citotóxica na concentração de 100 μM (MATANIC; CASTILHA, 2004). Estes dados são discordantes dos observados neste trabalho, em que valores de CC_{50} de 39,7 μM foram encontrados para a mesma linhagem celular, entretanto num período de 96 horas (Tabela 2).

O peptídeo Clavanina A na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apresentou tóxico para 60 % das células ME-180 em estudos de citotoxicidade (YASIN et al., 2000).

A concentração citotóxica do peptídeo Taquipesina frente às células VERO foi de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ quando avaliadas por 72 horas (MURAKAMI et al., 1991).

Tabela 2 – Citotoxicidade dos peptídeos antimicrobianos frente às diferentes linhagens celulares, avaliada através do ensaio colorimétrico do MTT.

PEPTÍDEOS	CC ₅₀ VERO	CC ₅₀ HEp-2	CC ₅₀ MA104
Gomesina	78,3 ± 11	50,63 ± 1,55	24,3 ± 2,65
PW-2	> 125	84,90 ± 5,83	> 125,0
Peneidina	> 100	42,85 ± 4,85	21,0 ± 4,27
FAL	47,2 ± 11	17,13 ± 1,23	35,9 ± 6,15
FCTH	> 80,0	nt	nt
Taquiplesina	nt	nt	23,7 ± 3,96
Clavanina	nt	25,50 ± 5,57	50,2 ± 7,62
Magainina (MSI-94)	39,7 ± 0,85	37,15 ± 5,28	33,5 ± 2,38

Valores expressos em µM; CC₅₀: concentração citotóxica a 50% do tapete celular; (nt): não testado. Os valores representam a média de três experimentos independentes ± o desvio padrão da média.

5.2.2 Hemolinfa de ostras

A incubação nas diferentes linhagens celulares foi feita com os diferentes extratos de ostras em concentrações crescentes de 0,008 a 1 mg de proteína por mL.

Para as células VERO, as hemolinfas apresentaram valores de CC₅₀, que variaram de 0,34 a 0,88 mg de proteína por mL, e para as células HEp-2 de 0,19 a 0,36 mg/mL. Com exceção do extrato Crp (= plasma de *Crassostrea rhizophorae*), todos os outros extratos não foram tóxicos às células MA104, na maior concentração testada (1 mg de proteína/ mL) (Tabela 3).

Tabela 3 – Citotoxicidade dos extratos de ostras frente às células VERO, HEp-2 e MA104, realizada através do ensaio colorimétrico do MTT.

EXTRATOS	CC ₅₀ VERO	CC ₅₀ HEp-2	CC ₅₀ MA104
Crh	0,35 ± 0,06	0,34 ± 0,04	> 1
Crp	0,88 ± 0,46	0,36 ± 0,03	0,86 ± 0,15
Cgh	0,34 ± 0,06	0,19 ± 0,01	> 1
Cgp	0,55 ± 0,08	0,32 ± 0,06	> 1

Valores expressos em mg de proteína por mL; CC₅₀: Concentração citotóxica a 50% do tapete celular. Cr: *Crassostrea rhizophorae*; Cg: *C. gigas*; h: hemócitos; p: plasma. Os valores representam a média de três experimentos independentes ± o desvio padrão da média.

5.3 ESTUDO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-HERPÉTICA, ANTIADENOVÍRUS E ANTI-ROTAVÍRUS.

Vários métodos podem ser utilizados para a avaliação da atividade antiviral de qualquer material-teste. Um destes métodos é o ensaio colorimétrico do MTT, que vem sendo rotineiramente utilizado para a determinação não só da citotoxicidade, mas também para a detecção da atividade antiviral de compostos sintéticos e de origem natural (TAKEUCHI; BABA; SHIGETA, 1991; SUDO et al., 1994; KODAMA et al., 1996; KANEKO et al., 2001; BETANCUR-GALVIS et al., 2001 e 2002; ANDRIGHETTI-FRÖHNER, 2003; SAVI et al., 2005).

O ensaio colorimétrico do MTT com a adição simultânea dos vírus e das diferentes diluições dos materiais-testes às células foi escolhido para realizar a triagem deste trabalho, por apresentar como vantagens a possibilidade de testar um maior número de compostos simultaneamente e utilizar menores quantidades dos materiais-testes (YASIN et al., 2000).

Além disso, este método permite que com os mesmos materiais, equipamentos e reagentes seja possível, apenas variando o momento da infecção viral, iniciar a elucidação do mecanismo de ação do material testado comparando os seus índices de seletividade.

O ensaio de pré-tratamento foi realizado com o objetivo de identificar possíveis materiais que atuam no bloqueio da adsorção viral e na penetração do vírus à célula (CHOU; TALALAY, 1984; EGAL et al., 1999). Dessa forma, as amostras que demonstraram resultados promissores no ensaio de pré-tratamento podem ser capazes de bloquear a interação entre determinados receptores virais e os receptores situados nas membranas celulares.

O ensaio do pós-tratamento foi realizado com o objetivo de identificar possíveis materiais que atuam em uma ou mais fases da replicação viral e/ou na liberação dos vírions. Assim, os materiais que apresentaram atividade no ensaio do pós-tratamento sugerem uma provável capacidade de inibir as etapas mais tardias da replicação viral, como por exemplo, a transcrição de proteínas (BELAID et al., 2002).

O ensaio da atividade virucida objetivou avaliar a capacidade dos materiais testados de inativarem os vírus antes que eles atinjam as células-alvo (EGAL et al., 1999).

Vírus que causam infecções líticas, tais como o HSV-1, os adenovírus e os rotavírus, causam destruição das células, as quais se descolam da placa de cultura. Assim, o ensaio colorimétrico do MTT pode ser potencialmente utilizado para a quantificação desta destruição celular ou a ausência da mesma, devido à presença do agente antiviral (SMEE et al., 2002). Esta técnica apresenta vantagens como o grande número de compostos que podem ser testados, a facilidade no emprego da técnica, o fato de ser uma avaliação objetiva e a possibilidade da avaliação simultânea da citotoxicidade e da atividade antiviral, sendo o método tão sensível quanto o método de redução das placas de lise (TAKEUCHI; BABA; SHIGETA, 1991; SUDO et al., 1994; SMEE et al., 2002).

Ao utilizar o ensaio do MTT para avaliar a atividade antiviral é importante obter um valor igual ou inferior a 0,2 na razão (A)CV/(A)CC. Isto significa que a garantia da sensibilidade do ensaio se deve à diferença entre os valores de absorvância (A) (entenda-se viabilidade celular) dos controles viral e celular. O ideal é que, ao final do tempo de incubação da placa, o controle celular esteja viável, enquanto o controle viral totalmente destruído. Assim, a viabilidade celular detectada nos testes será conferida à ação antiviral do material em teste e o grau desta proteção poderá ser calculado para cada concentração do material testado (TAKEUCHI; BABA; SHIGETA, 1991).

Após o período de incubação de 96 h para o HSV-1/ KOS, 128 h para o AdV-5 e 72 h para o RV-SA11, foi possível observar, na maioria dos casos, a inibição do efeito citopático viral (ECP), através do monitoramento por microscopia ótica invertida comparando com os resultados obtidos pelo ensaio do MTT.

O uso de um controle positivo nos ensaios de detecção da atividade antiviral permite demonstrar se esses foram realizados adequadamente e num nível correto de sensibilidade, sendo considerado, ainda, um padrão com o qual a atividade do material em teste pode ser comparada. Idealmente, o fármaco controle positivo deve ser aquele usado clinicamente em um ou mais países (SIDWELL, 1986).

Paralelamente aos experimentos conduzidos com o vírus HSV-1/KOS, foram realizados controles positivos com o aciclovir, na concentração de 10 µg/mL, pois o aciclovir é o fármaco de escolha para o tratamento de várias infecções herpéticas. A proteção obtida foi acima de 99 %, de acordo com o que é referenciado na literatura e atestando a eficiência da metodologia empregada (DE JALON et al., 2003).

Apenas os sintomas das infecções causadas pelos vírus AdV-5 e o RV-SA11 são tratados e, até o presente momento, não existem fármacos que atuem sobre as etapas de adsorção, penetração ou de replicação destes vírus. Por este motivo não foram feitos controles positivos nos experimentos com estes dois vírus.

Todas as amostras avaliadas neste trabalho são de origem protéica. As proteínas vêm sendo estudadas quanto às suas atividades farmacológicas, dentre elas a antiviral. Dependendo da composição e da seqüência de seus aminoácidos, tais materiais podem apresentar frente a diferentes vírus atividades também diferentes, tais como ação virucida, ação sobre a adsorção e penetração do vírus nas células-alvo ou, ainda, sobre as etapas tardias do ciclo de replicação viral.

Algumas proteínas e peptídeos possuem atividade antiviral devido à sua capacidade de ligação a determinadas glicoproteínas existentes nas membranas celulares. Assim, quando as células ficam previamente expostas aos materiais, pode ocorrer a interação de proteínas e/ou peptídeos com a membrana glicoprotéica, impedindo a adsorção viral (HUDSON, 1990; STRATE et al., 2001; BELAID et al., 2002; ANDERSEN, 2003; MARCHETTI et al., 2004).

Os resultados da triagem da potencial atividade antiviral de materiais de origem protéica, obtidos nesta dissertação frente aos os vírus HSV-1/KOS, AdV-5 e RV-SA11 serão aqui discutidos, considerando-se tanto os valores obtidos dos índices de seletividade quanto as porcentagens de inibição da replicação viral.

5.3.1 *Peptídeos Antimicrobianos*

Foram testados oito peptídeos (Quadro 1) que diferem na origem (naturais e sintéticos), peso molecular e estruturas primárias e secundárias (lineares e cíclicos). Além disso, a estratégia de avaliação da potencial atividade antiviral também variou. Neste caso, não foi realizado o pós-tratamento, nem o estudo da ação virucida; para alguns peptídeos foram usadas as duas outras estratégias (tratamento simultâneo e pré-tratamento); e para outros somente uma, pois a quantidade de material disponível era insuficiente para realizar outros ensaios. Com base em dados encontrados na literatura que descrevem a capacidade dos peptídeos antimicrobianos, isolados de várias fontes bem como os sintéticos, de inibir a adsorção e penetração dos vírus, optou-se por estas duas estratégias (ABOUDY et al., 1993; BOURNE, et al., 2000; BELAID et al., 2002; ANDERSEN et al., 2003; OEVERMANN et al. 2003; JENSSEN et al., 2004a, b; TRYBALA et al., 2004).

A avaliação da potencial atividade antiviral dos diferentes PAMs foi realizada através do ensaio colorimétrico do MTT, em concentrações iguais e inferiores às suas concentrações citotóxicas (CC_{50}).

Quando possível, foram calculados os valores de CE_{50} e os respectivos índices de seletividade ($IS = CC_{50}/CE_{50}$). Os resultados da potencial atividade antiviral dos PAMs, obtidos quando da realização dos procedimentos dos itens 4.6.1.1 e 4.6.1.2, para os vírus HSV-1/KOS, AdV-5 e RV-SA11, estão reunidos nas Tabelas 4, 6 e 8, respectivamente.

Também foram calculados os percentuais de inibição da infecção viral na maior concentração testada, de cada peptídeo, através da fórmula citada no item 4.6.1.1, e os resultados estão sumarizados nas Tabelas 5, 7 e 9.

A Figura 1 mostra a comparação dos valores percentuais de inibição viral, obtidos com as duas estratégias de avaliação da atividade antiviral (tratamento simultâneo e pré-tratamento) frente aos vírus HSV-1/KOS, AdV-5 e RV-SA11.

5.3.1.1 Atividade antiviral dos PAMs sobre o HSV-1/KOS

No caso do HSV-1/KOS, quando a incubação dos PAMs foi feita simultaneamente à do vírus, a Peneidina apresentou o maior índice de seletividade ($IS=64$), provavelmente por atuar sobre as fases tardias da infecção viral, pois quando as células foram pré-tratadas com este peptídeo, a inibição foi inferior a 50 %, e não foi possível calcular o IS. A estrutura mista (porção N-terminal linear rica em prolina e porção C-terminal cíclica, com 3 pontes dissulfeto) pode ter influenciado na resposta apresentada, pois na literatura foi encontrado um estudo que comparou a atividade de peptídeos alfa-hélice com de folha pregueadas e de cadeia mista, sendo que os de cadeia mista apresentaram maior atividade sobre este vírus (YASIN, et al., 2000).

Ainda, quando a incubação viral foi simultânea à dos peptídeos, Gomesina ($IS = 2,36$), FAL ($IS = 3,00$) e PW-2 ($IS = 1,12$) apresentaram atividade antiviral. Quando as células foram pré-tratadas com os PAMs, antes da adição do vírus, apenas o FAL apresentou atividade ($IS = 2,26$) (Tabela 4).

A presença de aminoácidos, como arginina e lisina, conferem um caráter catiônico aos peptídeos, propiciando sua ligação ao principal receptor do HSV-1 às células hospedeiras, o sulfato de heparana, carregado negativamente, possuindo maior afinidade pelas argininas do que às lisinas (VOGEL, et al., 2002; ANDERSEN

et al, 2003; JENSSEN et al., 2004a, b; TRYBALA et al., 2004). A atividade da Gomesina pode estar relacionada com a estabilidade da molécula pela presença das cisteínas que formam duas pontes dissulfeto (MURAKAMI et al., 1991; YASIN, et al., 2000), e pelo seu caráter catiônico devido à presença de argininas. É possível que a ação deste peptídeo frente ao HSV-1 fosse maior se ele possuísse resíduos de triptofano, uma vez que já está confirmado que é necessária a presença de aminoácidos hidrofóbicos, especialmente o triptofano, para a ligação do peptídeo ao receptor celular inibindo a penetração do HSV-1 na célula hospedeira; este fato deve ter influenciado na ausência de atividade deste peptídeo no pré-tratamento (SILVA JUNIOR et al., 2002; VOGEL, et al., 2002; JENSSEN et al., 2004b; TRYBALA et al., 2004).

Ao contrário da Gomesina, o PW-2 possui dois triptofanos em sua cadeia (SILVA JUNIOR et al., 2002), o que poderia ter contribuído para a sua atividade antiviral. Porém, a presença de poucos aminoácidos carregados positivamente pode ter sido o motivo pelo qual este peptídeo tenha apresentado uma baixa atividade no tratamento simultâneo e ausência de atividade no pré-tratamento.

Tabela 4 – Atividade anti-herpética (HSV-1 cepa KOS) dos peptídeos antimicrobianos, obtidos através do ensaio colorimétrico do MTT.

PEPTÍDEOS	CC ₅₀ VERO	CE ₅₀ Simultâneo	IS Simultâneo	CE ₅₀ Pré	IS Pré
Gomesina	78,3 ± 11	33,2 ± 9,21	2,36	-	-
PW-2	> 125	111,0 ± 21,9	> 1,12	-	-
Peneidina	> 100	1,56 ± 0,18	> 64,00	-	-
FAL	47,2 ± 11	15,7 ± 9,97	3,00	20,8 ± 3,40	2,26
FCTH	> 80,0	-	-	nt	nt
Taquiplesina	nt	nt	nt	nt	nt
Clavanina A	nt	nt	nt	nt	nt
Magainina (MSI-94)	39,7 ± 0,85	-	-	-	-

Resultados expressos em μM ; CC₅₀: Concentração citotóxica a 50% do tapete celular; CE₅₀: concentração efetiva 50 %; IS: índice de seletividade (CC₅₀/ CE₅₀); (nt): não testado; (-): sem atividade na concentração máxima testada. Não foi possível calcular os valores de CE₅₀ e, conseqüentemente, os valores de IS. Os valores representam a média de três experimentos independentes \pm desvio padrão da média.

Embora tenham apresentado baixos índices de seletividade, os peptídeos FAL (45 μM), PW-2 (125 μM) e Gomesina (75 μM) exibiram altas porcentagens de inibição da replicação viral, com valores de 72; 70,9 e 59,1 %, respectivamente (Tabela 5). Estes resultados demonstram a proximidade entre as concentrações

citotóxicas e efetivas. Pequenas modificações em suas moléculas poderiam contribuir para a obtenção de índices de seletividade mais elevados (EGAL et al., 1999; YASIN, et al., 2000; OEVERMANN et al., 2003), podendo também ser utilizados, juntamente, com outras substâncias que inibam a infecção deste vírus através de outros mecanismos de ação, já que a combinação de dois ou mais fármacos antivirais pode beneficiar o tratamento de várias infecções (AMICI et al., 2001; ANDERSEN et al, 2003; JENSSEN et al., 2004b). Os peptídeos Peneidina, Gomesina e PW-2 foram mais ativos quando incubados simultaneamente ao vírus do que quando foram incubados antes da infecção viral, sendo esta diferença estatisticamente significativa. O FAL não apresentou diferença estatisticamente significativa nas duas estratégias utilizadas.

A Magainina (35 μ M) apresentou uma baixa porcentagem de inibição, tanto quando a sua incubação foi feita simultaneamente à infecção viral (24,06 %), como quando as células foram expostas aos peptídeos antes da infecção viral (23,77 %), apresentando resultados semelhantes aos encontrados na literatura (ABOUDY et al., 1994; YASIN et al., 2000, MATANIC; CASTILLA, 2004). No entanto, outro estudo demonstrou que magaininas sintéticas inibem diretamente o HSV-1 (EGAL et al., 1999) e outro relatou que a magainina-2 inibiu um vírus da família Herpesviridae que infecta peixes (CHINCHAR et al., 2004).

O FCTH foi testado apenas com incubação simultânea à infecção viral e também apresentou uma baixa porcentagem de inibição sobre este vírus (30,27 %).

A Taquiplesina não foi testada sobre o HSV-1, pois já havia estudos relatando sua baixa porcentagem de inibição na replicação deste vírus (MURAKAMI et al., 1991; YASIN et al., 2000), assim como a Clavanina A, que na sua forma natural, não havia demonstrado atividade anti-herpética; porém, a substituição das histidinas da sua cadeia por lisinas fez com que ela passasse a inativar diretamente o HSV-1 (YASIN et al., 2000).

Tabela 5 – Inibição da replicação do HSV-1/KOS pelos peptídeos antimicrobianos, obtidas através do ensaio colorimétrico do MTT, quando incubados simultaneamente ou antes da infecção viral.

PEPTÍDEOS	Concentração (µM)	Tratamento Simultâneo (%)	Pré-tratamento (%)
Gomesina	75	59,14 ± 2,46b	19,31 ± 9,64a
PW-2	125	70,91 ± 23,85b	25,08 ± 9,90a
Peneidina	100	85,17 ± 7,11b	34,26 ± 9,10a
FAL	45	72,07 ± 17,02a	58,50 ± 8,20a
FCTH	80	30,27 ± 2,03a	nt
Taquiplesina	nt	nt	nt
Clavanina A	nt	nt	nt
Magainina (MSI-94)	35	24,06 ± 13,19a	23,77 ± 5,70a

(nt): não testado. Os valores representam a média de três experimentos independentes ± desvio padrão da média. Considerando apenas as diferentes estratégias para cada peptídeo utilizou-se ANOVA e Tukey quando necessário, onde valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias.

5.3.1.2 Atividade antiviral dos PAMs sobre o AdV-5

A Tabela 6 mostra os resultados da triagem antiadenovírus.

Quando a incubação dos PAMs foi feita simultaneamente à do vírus, apenas o FAL (IS = 1,41) e a Clavanina A (IS = 1,72) apresentaram atividade.

Quando as células foram expostas aos PAMs, antes da adição do vírus, apenas a Gomesina (IS = 1,72) e a Clavanina A (IS = 1,86) apresentaram atividade.

Na literatura consultada não foram encontrados estudos relacionando estes peptídeos ao AdV-5, no entanto, um estudo demonstrou que a lactoferrina e o seu peptídeo N-terminal (lactoferricina) inibem a replicação viral quando adicionados, tanto antes como durante a fase de adsorção viral, demonstrando com isso a ação nas fases iniciais da replicação viral. (ARNOLD et al., 2002). Um outro estudo demonstrou que a lactoferrina e a lactoferricina possuem ação antiadenovírus, agindo por competição direta pelos receptores comuns de glicosaminoglicanas localizados na superfície das células hospedeiras. Estes dados evidenciam que a atividade antiadenovírus da lactoferrina é mediada essencialmente por um conjunto de alterações nas cargas positivas da extremidade N-terminal (DI BIASE et al., 2003).

Tabela 6 – Atividade antiadenovírus (AdV-5) dos peptídeos antimicrobianos, obtidos através do ensaio colorimétrico do MTT.

PEPTÍDEOS	CC ₅₀ HEp-2	CE ₅₀ Simultâneo	IS Simultâneo	CE ₅₀ Pré	IS Pré
Gomesina	50,63 ± 1,55	-	-	29,41 ± 2,51	1,72
PW-2	84,90 ± 5,83	-	-	-	-
Peneidina	42,85 ± 4,85	-	-	-	-
FAL	17,13 ± 1,23	12,16 ± 1,08	1,41	-	-
FCTH	nt	nt	nt	nt	nt
Taquiplesina	nt	nt	nt	nt	nt
Clavanina A	25,50 ± 5,57	14,82 ± 0,87	1,72	13,72 ± 1,91	1,86
Magainina (MSI-94)	37,15 ± 5,28	-	-	-	-

Resultados expressos em μM ; CC₅₀: Concentração citotóxica a 50% do tapete celular; CE₅₀: concentração efetiva 50 %; IS: índice de seletividade (CC₅₀/ CE₅₀); (nt): não testado; (-): sem atividade na concentração máxima testada. Não foi possível calcular os valores de CE₅₀ e, conseqüentemente, os valores de IS. Os valores representam a média de três experimentos independentes \pm desvio padrão da média.

A Tabela 7 apresenta os resultados da inibição do AdV-5 pelos PAMs.

A Gomesina apresentou uma inibição maior, estatisticamente significante, quando as células foram pré-tratadas com o peptídeo (52,25%) do que quando a incubação do peptídeo foi feita simultaneamente à do vírus (31,73%), sugerindo que uma ação sobre as fases iniciais da infecção causada por este vírus.

Embora os peptídeos tenham apresentado baixos índices de seletividade (1,41 a 1,86) quando testados sobre o AdV-5, o FAL (98,17 %) e a Clavanina A (94,72 %), quando incubados simultaneamente à infecção viral apresentaram altas porcentagens de inibição, estatisticamente significantes, sugerindo que estes peptídeos possuem atividade inibitória para o AdV-5, mas em concentrações muito próximas às suas CC₅₀, o que explica os baixos IS encontrados.

O FCTH não foi testado, pois a quantidade de material disponível era insuficiente para realizar este ensaio.

Novamente aqui, a Taquiplesina não foi testada, em função de que já havia sido relatado que este peptídeo não tem ação sobre o adenovírus (MURAKAMI et al., 1991).

Tabela 7 – Inibição do AdV-5 pelos peptídeos antimicrobianos, obtidas através do ensaio colorimétrico do MTT, quando incubados simultaneamente ou antes da infecção viral.

PEPTÍDEOS	Concentração (µM)	Tratamento Simultâneo (%)	Pré-tratamento (%)
Gomesina	50	31,73 ± 2,46a	52,25 ± 4,27b
PW-2	80	36,67 ± 6,61a	24,60 ± 5,70a
Peneidina	40	28,00 ± 7,51a	32,37 ± 11,79a
FAL	15	98,17 ± 4,24b	33,85 ± 7,50a
FCTH	nt	nt	nt
Taquiplesina	nt	nt	nt
Clavanina A	25	94,72 ± 5,59b	61,54 ± 13,60a
Magainina (MSI-94)	35	29,35 ± 2,74a	20,36 ± 3,88a

(nt): não testado. Os valores representam a média de três experimentos independentes ± desvio padrão da média. Considerando apenas as diferentes estratégias para cada peptídeo utilizou-se ANOVA e Tukey quando necessário, onde valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias.

5.3.1.3 Atividade antiviral dos PAMs sobre o RV-SA11

A Tabela 8 mostra os resultados da triagem anti-rotavírus.

Quando a incubação dos PAMs foi simultânea à dos vírus, apenas a Taquiplesina (IS = 1,09) e a Clavanina A (IS = 2,02) apresentaram atividade.

Quando as células foram pré-tratadas com os PAMs, apenas a Peneidina (IS = 1,33) e a Clavanina A (IS = 2,25) apresentaram atividade. Na literatura consultada não foram encontrados estudos relacionando estes peptídeos ao RV-SA11, no entanto, um estudo demonstrou que a beta-lactoglobulina, a apo-lactoferrina e a Fe³⁺-lactoferrina foram capazes de inibir a replicação do rotavírus, dependendo da concentração. A apo-lactoferrina dificulta a ligação do vírus aos receptores celulares quando adicionadas durante a fase de adsorção do vírus ou quando presente nas primeiras horas da infecção, sugerindo que esta proteína interfere com as fases iniciais da infecção do rotavírus (SUPERTI et al, 1997).

O FCTH não foi testado nas duas estratégias e a gomesina no pré-tratamento, pois a quantidade de material disponível era insuficiente para realizar estes ensaios.

Tabela 8 – Atividade anti-rotavírus (RV-SA11) dos peptídeos antimicrobianos, obtidos através do ensaio colorimétrico do MTT.

PEPTÍDEOS	CC ₅₀ MA104	CE ₅₀ Simultâneo	IS Simultâneo	CE ₅₀ Pré	IS Pré
Gomesina	24,3 ± 2,65	-	-	nt	nt
PW-2	> 125	-	-	-	-
Peneidina	21,0 ± 4,27	-	-	15,8 ± 2,31	1,33
FAL	35,9 ± 6,15	-	-	-	-
FCTH	nt	nt	nt	nt	nt
Taquiplesina	23,7 ± 3,96	22,9 ± 0,25	1,09	-	-
Clavanina A	50,2 ± 7,62	24,8 ± 6,62	2,02	22,3 ± 12,4	2,25
Magainina (MSI-94)	33,5 ± 2,38	-	-	-	-

Resultados expressos em μM ; CE₅₀: concentração efetiva 50 %; IS: índice de seletividade (CC₅₀/CE₅₀); (nt): não testado; (-): sem atividade na concentração máxima testada. Não foi possível calcular os valores de CE₅₀ e, conseqüentemente, os valores de IS. Os valores representam a média de três experimentos independentes \pm desvio padrão da média.

A Tabela 9 apresenta os resultados percentuais da inibição do RV-SA11 pelos PAMs.

A Peneidina apresentou uma porcentagem de inibição maior e estatisticamente significativa, quando as células foram pré-tratadas com o peptídeo (56,65%) do que quando a sua incubação foi feita simultaneamente a do vírus (12,75%), sugerindo ação antiviral via bloqueio da adsorção.

Quando a Clavanina A (50 μM) foi adicionadas às células antes da adição do vírus RV-SA11, a porcentagem de inibição foi de 95,46 %. Isto não diferiu estatisticamente da apresentada pelo peptídeo incubado simultaneamente à infecção viral, sugerindo que este peptídeo também parece interferir nas fases iniciais da infecção viral.

De outra forma, a Taquiplesina apresentou uma porcentagem de inibição maior e estatisticamente significativa, quando incubada simultaneamente ao vírus (51,41%) do que quando as células foram pré-tratadas com o peptídeo (32,14%).

Tabela 9 – Inibição do RV-SA11 pelos peptídeos antimicrobianos, obtidas através do ensaio colorimétrico do MTT, quando incubados simultaneamente ou antes da infecção viral.

PEPTÍDEOS	Concentração (µM)	Tratamento Simultâneo (%)	Pré-tratamento (%)
Gomesina	20	18,32 ± 9,16	nt
PW-2	125	18,66 ± 4,67a	31,69 ± 14,09a
Peneidina	20	12,75 ± 9,08a	56,65 ± 2,58b
FAL	35	9,58 ± 3,39a	27,07 ± 22,51a
FCTH	nt	nt	nt
Taquiplesina	20	51,41 ± 20,92b	32,14 ± 9,36a
Clavanina A	50	69,40 ± 13,13a	95,46 ± 34,42a
Magainina (MSI-94)	30	29,90 ± 11,18a	13,84 ± 3,18a

(nt): não testado. Os valores representam a média de três experimentos independentes ± desvio padrão da média. Considerando apenas as diferentes estratégias para cada peptídeo utilizou-se ANOVA e Tukey quando necessário, onde valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias.

A Figura 1 mostra um resumo da inibição de cada um dos vírus estudados pelos peptídeos antimicrobianos e a análise dos dados comparando os resultados obtidos com os diferentes PAMs, para cada tratamento.

Para o HSV-1, no tratamento simultâneo, Gomesina, PW-2, Peneidina e FAL apresentaram as maiores porcentagens de inibição, estatisticamente significativa, embora a porcentagem de inibição apresentada pela Gomesina não tenha diferido estatisticamente do FCTH e da Magainina. No pré-tratamento o peptídeo que apresentou a maior atividade antiviral, estatisticamente significativa, foi o do FAL. Para este vírus, de maneira geral, os peptídeos apresentaram um melhor desempenho no tratamento simultâneo.

Para o AdV-5, no tratamento simultâneo, o FAL e a Clavanina A apresentaram as maiores porcentagens de inibição, estatisticamente significativa, do que os outros peptídeos; no pré-tratamento a Clavanina A apresentou uma porcentagem de inibição, estatisticamente significativa, maior que os demais peptídeos, embora não tenha diferido estatisticamente da porcentagem de inibição apresentada pela Gomesina.

Para o RV-SA11, no tratamento simultâneo, a Clavanina A apresentou porcentagens de inibição maiores, estatisticamente significantes, que os outros peptídeos, embora não tenha diferido estatisticamente da porcentagem de inibição

apresentada a Taquiplesina; No pré-tratamento a Clavanina A novamente foi o peptídeo que apresentou a maior porcentagens de inibição, embora não tenha diferido estatisticamente da porcentagem de inibição apresentada pela a Peneidina.

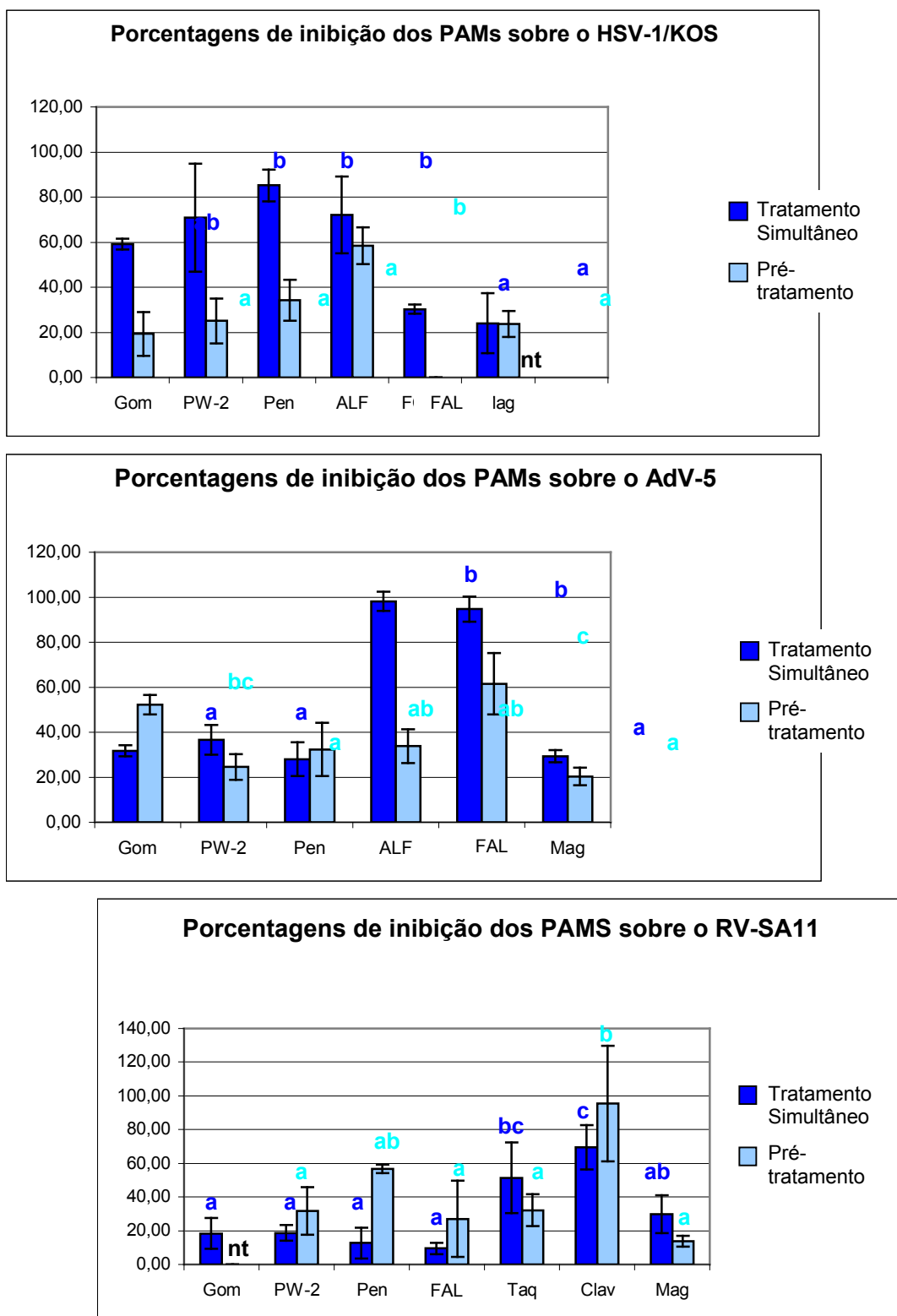


Figura 1 – Comparação das porcentagens de inibição da replicação dos diferentes vírus pelos PAMs, obtidas através do ensaio colorimétrico do MTT, quando incubados simultaneamente ou antes da infecção viral. Cada barra representa a média das porcentagens de inibição da maior concentração testada \pm desvio padrão da média de três experimentos independentes. Utilizou-se ANOVA e Tukey quando necessário, onde valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes,. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias. (nt): não testado.

5.3.2 Hemolinfa de ostras

A avaliação da potencial atividade antiviral das hemolinfas de ostras foi realizada através do ensaio colorimétrico do MTT, em concentrações iguais e inferiores às suas concentrações citotóxicas (CC_{50}).

Quando possível, foram calculados os valores de CE_{50} e os respectivos índices de seletividade ($IS = CC_{50}/CE_{50}$). Os resultados da potencial atividade antiviral dos extratos de ostras, obtidos quando da realização dos procedimentos dos itens 4.6.1.1, 4.6.1.2 e 4.6.1.3, para os vírus HSV-1/KOS e AdV-5, estão reunidos nas Tabelas 10 e 12, respectivamente. Para o RV-SA11 os extratos de ostras apresentaram proteção abaixo de 50%, não tendo sido possível calcular os valores de CE_{50} e os IS. Também foram calculados os percentuais de inibição da infecção viral, através da fórmula citada no item 4.6.1.1, e os resultados estão sumarizados nas Tabelas 11, 13 e 14. A Figura 2 mostra a comparação dos valores percentuais de inibição viral, obtidos com as diferentes estratégias de avaliação da atividade antiviral (tratamento simultâneo, pré-tratamento e pós-tratamento) e da ação virucida, frente aos vírus HSV-1/KOS, AdV-5 e RV-SA11.

Paralelamente aos experimentos conduzidos com o vírus HSV-1/KOS, foram realizados controles positivos com o aciclovir, na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. A de proteção obtida foi superior de 99 %, de acordo com o que é referenciado na literatura (DE JALON et al., 2003) e atestando a eficiência da metodologia empregada.

De maneira geral, não houve diferenças estatísticas entre os resultados obtidos com as duas espécies de ostras utilizadas neste estudo e nem entre os dois tipos de amostras (hemócitos e plasma). As diferenças estatísticas encontradas foram entre os diferentes vírus e as diferentes estratégias.

Todos os materiais testados apresentaram atividade virucida para os três tipos de vírus estudados, demonstrando que a hemolinfa das duas espécies de ostras estudadas têm capacidade de inibir o vírus antes dele atingir as células-alvo.

Os relatos encontrados na literatura sobre as propriedades antivirais de ostras são raros e constataram a existência de inibidores de proteases e estimuladores de proliferação celular (PRESCOTT, 1966; ACHOUR, et al., 1997; FAISAL, et al., 1998; LEE; MARUYAMA, 1998), que podem ter promovido as diferentes respostas observadas nesta dissertação.

Além disso, vale lembrar que os moluscos bivalves, assim como os crustáceos, possuem os genes responsáveis pela produção dos peptídeos antimicrobianos expressos constitutivamente, e os peptídeos podem ser encontrados tanto no interior dos hemócitos como livres na hemolinfa (BACHERE et al., 2004), o que poderia justificar o fato de ter sido encontradas atividades de inibição da replicação viral tanto nas amostras de plasma quanto nas amostras de lisado de hemócitos.

5.3.2.1 Atividade antiviral de hemolinfa de ostras sobre o HSV-1/KOS

Quando a incubação da hemolinfa de ostras foi feita simultaneamente e antes da infecção viral, nenhuma das amostras apresentou atividade. Quando a incubação foi feita após a infecção viral, todos os materiais testados apresentaram atividade, sugerindo que ambas as ostras estudadas possuem capacidade de inativar as fases tardias da infecção causada pelo HSV-1, sendo que a *C. rhizophorae* apresentou os melhores resultados. Os índices de seletividade variaram entre 1,41 a 17,50 (Tabela 10), sendo que para as duas espécies os valores de IS apresentados pelos lisados de hemócitos (Crh e Cgh) foram maiores do que os apresentados pelo plasma (Crp e Cgp).

Tabela 10 – Atividade anti-herpética (HSV-1 cepa KOS) da Hemolinfa de ostras, obtidos através do ensaio colorimétrico do MTT.

Material Teste	CC ₅₀ VERO	CE ₅₀ Simul	IS Simul	CE ₅₀ PRÉ	IS PRÉ	CE ₅₀ PÓS	IS PÓS
Crh	0,35 ± 0,06	-	-	-	-	0,02 ± 0,004	17,50
Crp	0,88 ± 0,46	-	-	-	-	0,12 ± 0,02	7,33
Cgh	0,34 ± 0,06	-	-	-	-	0,07 ± 0,02	4,86
Cgp	0,55 ± 0,08	-	-	-	-	0,39 ± 0,18	1,41

Resultados expressos em mg de proteína por mL; CC₅₀: Concentração citotóxica a 50% do tapete celular; CE₅₀: concentração efetiva 50 %; IS: índice de seletividade (CC₅₀/ CE₅₀); (-): proteção abaixo de 50% na concentração máxima testada, não tendo sido possível calcular os valores de CE₅₀ e, conseqüentemente, os valores de IS; Cr: *Crassostrea rhizophorae*; Cg: *C. gigas*; h: hemócitos; p: plasma. Os valores representam a média de três experimentos independentes ± desvio padrão da média

Para o Crh, as porcentagens de inibição apresentadas nas três diferentes estratégias de detecção da atividade antiviral foram significativamente diferentes entre si, sendo que a maior porcentagem de inibição foi observada no pós

tratamento. Para o Crp e Cgh as porcentagens de inibição apresentadas no pós-tratamento foram maiores, estatisticamente significante, que as outras duas estratégias que não diferiram entre si. Para o Cgp a porcentagem de inibição apresentada no pós-tratamento foi maior, embora não tenha diferido estatisticamente das outras duas estratégias.

Todas as amostras apresentaram ação virucida, sugerindo que a hemolinfa de ambas as ostras aja diretamente sobre o HSV-1 inativando-o antes que atinja as células-alvo (Tabela 11).

Tabela 11 – Inibição do HSV-1/KOS pela hemolinfa de ostras, usando diferentes estratégias de avaliação da atividade anti-herpética (tratamento simultâneo, pré-tratamento, pós-tratamento) e da ação virucida.

Material Teste	Concentração	Tratamento Simultâneo (%)	Pré-tratamento (%)	Pós-tratamento (%)	Ação Virucida (%)
Crh	0,30	18,11 ± 2,83a	31,03 ± 3,53b	75,47 ± 6,68c	96,33 ± 5,50
Crp	0,80	16,51 ± 6,04a	11,17 ± 3,76a	48,54 ± 13,19b	93,30 ± 5,72
Cgh	0,30	20,28 ± 5,68a	21,77 ± 11,35a	68,72 ± 16,10b	93,00 ± 5,20
Cgp	0,50	20,58 ± 7,05a	16,25 ± 3,82a	49,55 ± 37,73ab	90,00 ± 0,00

Concentrações expressas em mg de proteína por mL; Cr: *Crassostrea rhizophorae*; Cg: *C. gigas*; h: hemócitos; p: plasma. Os valores representam a média de três experimentos independentes ± desvio padrão da média. Considerando apenas as diferentes estratégias para cada material teste utilizou-se ANOVA e Tukey quando necessário, onde valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias.

5.3.2.2 Atividade antiviral de hemolinfa de ostras sobre o AdV-5

As hemolinfas de ostras apresentaram atividade, nas três estratégias de incubação ensaiadas, com índices de seletividade variando de 1,60 a 5,67. Os índices de seletividade para o pós-tratamento foram maiores para todas as amostras quando comparados ao tratamento simultâneo e pré-tratamento, sugerindo ação de todas as amostras nas fases tardias do ciclo de replicação do AdV-5 (Tabela 12).

Tabela 12 – Atividade antiadenovírus (AdV-5) da hemolinfa de ostras, obtidos através do ensaio colorimétrico do MTT.

Material Teste	CC ₅₀ HEp-2	CE ₅₀ SIMUL	IS SIMUL	CE ₅₀ PRÉ	IS PRÉ	CE ₅₀ PÓS	IS PÓS
Crh	0,34 ± 0,04	0,18 ± 0,01	1,89	0,16 ± 0,07	2,13	0,06 ± 0,03	5,67
Crp	0,36 ± 0,03	0,18 ± 0,03	2,00	0,15 ± 0,02	2,40	0,09 ± 0,05	4,00
Cgh	0,19 ± 0,01	0,10 ± 0,01	1,90	0,11 ± 0,01	1,73	0,05 ± 0,01	3,80
Cgp	0,32 ± 0,06	0,16 ± 0,06	2,00	0,20 ± 0,01	1,60	0,06 ± 0,02	5,33

Resultados expressos em mg de proteína por mL; CC₅₀: Concentração citotóxica a 50% do tapete celular; CE₅₀: concentração efetiva 50%; IS: índice de seletividade (CC₅₀/CE₅₀); Cr: *Crassostrea rhizophorae*; Cg: *C. gigas*; h: hemócitos; p: plasma. Os valores representam a média de três experimentos independentes ± desvio padrão da média.

Para o AdV-5 não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as porcentagens de inibição dos diferentes materiais testados, para as diferentes estratégias estudadas, o que sugere que eles tenham capacidade não só de atuar nas fases tardias da infecção causada por este vírus, mas também nas outras etapas do seu ciclo de replicação, além de ter ação direta sobre ele (virucida) (Tabela 13).

Tabela 13– Inibição do AdV-5 pela hemolinfa de ostras, usando diferentes estratégias de avaliação da atividade antiadenovírus (tratamento simultâneo, pré-tratamento e pós-tratamento) e da ação virucida.

Material Teste	Concentração	Tratamento Simultâneo (%)	Pré-tratamento (%)	Pós-tratamento (%)	Ação Virucida (%)
Crh	0,30	63,93 ± 22,33a	63,84 ± 13,57a	76,33 ± 27,72a	96,33 ± 5,50
Crp	0,30	57,31 ± 7,29a	57,52 ± 8,47a	66,97 ± 22,42a	93,30 ± 5,72
Cgh	0,20	61,51 ± 11,43a	52,02 ± 26,65a	66,74 ± 4,55a	93,00 ± 5,20
Cgp	0,30	58,69 ± 18,21a	58,29 ± 13,86a	34,02 ± 8,62a	93,00 ± 5,20

Concentrações expressas em mg de proteína por mL; Cr: *Crassostrea rhizophorae*; Cg: *C. gigas*; h: hemócitos; p: plasma. Os valores representam a média de três experimentos independentes ± desvio padrão da média. Considerando apenas as diferentes estratégias para cada material teste utilizou-se ANOVA e Tukey quando necessário, onde valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias.

5.3.2.3 Atividade antiviral de hemolinfa de ostras sobre o RV-SA11

As porcentagens de inibição de todos os materiais testados sobre o RV-SA11 foram inferiores a 50% em todas as estratégias utilizadas, não tendo sido possível calcular os valores de CE_{50} e, conseqüentemente, os valores de IS.

O Crh apresentou maior porcentagem de inibição, estatisticamente significativa, quando incubado simultaneamente (45,69%) ou antes (48,78%) da infecção viral, do que no pós-tratamento (14,68%), fato que pôde ser também observado para o Crp (tratamento simultâneo = 24,25%; pré-tratamento = 23,08%; pós-tratamento = 6,00%), e para o Cgp (tratamento simultâneo = 21,64%; pré-tratamento = 18,76%; pós-tratamento = 8,74%) (Tabela 14). Somente o Cgh não apresentou diferenças entre as três estratégias.

Tabela 14 – Inibição do RV-SA11 pela hemolinfa de ostras, usando diferentes estratégias de avaliação da atividade anti-rotavírus (tratamento simultâneo, pré-tratamento e pós-tratamento) e da ação virucida.

Material Testado	Concentração	Tratamento Simultâneo (%)	Pré-tratamento (%)	Pós-tratamento (%)	Ação Virucida (%)
Crh	1,00	45,69 ± 13,46b	48,78 ± 31,99b	14,68 ± 1,82a	93,00 ± 5,20
Crp	0,80	24,25 ± 8,33b	23,08 ± 12,71b	6,00 ± 2,01a	93,30 ± 5,72
Cgh	1,00	22,93 ± 11,70a	27,26 ± 17,93a	34,01 ± 7,32a	93,00 ± 5,20
Cgp	1,00	21,64 ± 3,10b	18,76 ± 3,09b	8,74 ± 2,48a	93,30 ± 5,72

Concentrações expressas em mg de proteína por mL; Cr: *Crassostrea rhizophorae*; Cg: *C. gigas*; h: hemócitos; p: plasma. Os valores representam a média de três experimentos independentes ± desvio padrão da média, onde valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes (*).

A Figura 2 mostra um resumo da comparação das porcentagens de inibição de cada um dos vírus estudados pelas hemolinfas de ostras e a análise estatística realizada comparando os resultados obtidos com hemolinfas de ostra, para cada tratamento.

Para o HSV-1, no tratamento simultâneo, não houve diferenças estatisticamente significantes entre as porcentagens de inibição dos diferentes materiais testados. No pré-tratamento, o Crh apresentou um melhor desempenho, estatisticamente significativo, embora não tenha diferido das demais amostras. No pós-tratamento o melhor desempenho foi do Crh, porém este não diferiu do Cgh e do Cgp, que por sua vez não diferiram do Crp. Para este vírus, de maneira geral, as amostras apresentaram um melhor desempenho no pós-tratamento e na ação virucida, sugerindo que eles atuam inativando o vírus diretamente ou nas fases tardias da replicação viral.

Para o AdV-5, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as porcentagens de inibição dos diferentes materiais testados, no tratamento simultâneo e no pré-tratamento. No pós-tratamento o Crh e o Cgh apresentaram maiores porcentagens de inibição da replicação do AdV-5, embora não tenham diferido estatisticamente do Crp, que não diferiu estatisticamente do Cgp.

As amostras tiveram atividade em todas as estratégias ensaiadas e apresentaram ação virucida, sugerindo que as hemolinfas possam atuar nas diferentes fases da replicação deste vírus, além de inativá-lo antes de atingir a célula-alvo (ação virucida).

Para o RV-SA11, a maior porcentagem de inibição, estatisticamente significativa, foi demonstrada pelo Crh no tratamento simultâneo, porém este não diferiu das outras amostras, fato também observado no pré-tratamento. No pós-tratamento, o Cgh apresentou a maior porcentagem de inibição, estatisticamente significativa, do que àquelas apresentadas pelas outras amostras.

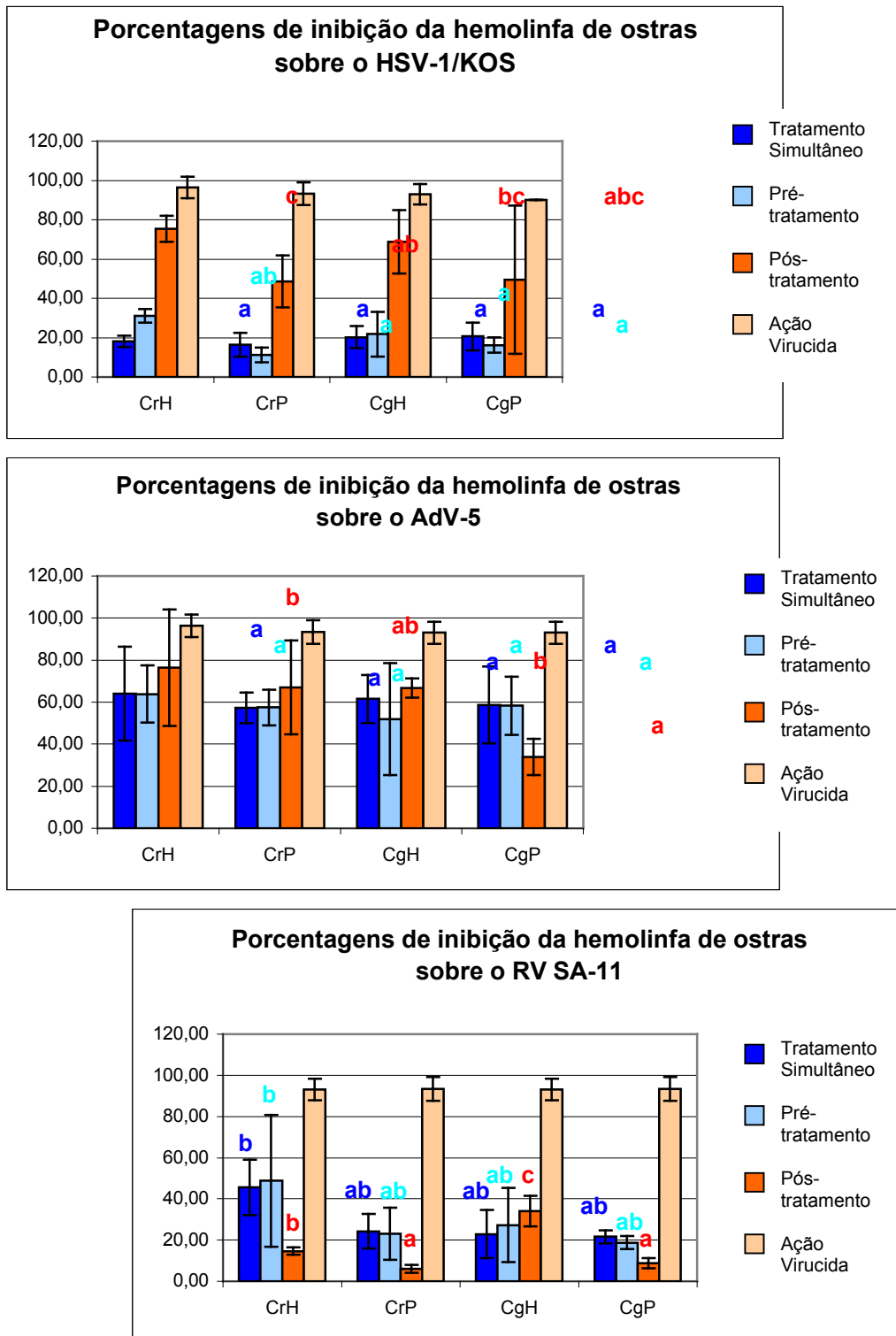


Figura 2 – Comparação das porcentagens de inibição da replicação dos diferentes vírus pela hemolinfa de ostras, obtidas através do ensaio colorimétrico do MTT, usando diferentes estratégias de avaliação da atividade antiviral (tratamento simultâneo, pré-tratamento e pós-tratamento) e da ação virucida. Cada barra representa a média das porcentagens de inibição da maior concentração testada \pm desvio padrão da média de três experimentos independentes. Utilizou-se ANOVA e Tukey quando necessário, onde valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias. Cr: *Crassostrea rhizophorae*; Cg: *C. gigas*; h: hemócitos; p: plasma.

6 CONCLUSÕES

Peptídeos Antimicrobianos (PAMs):

- As concentrações citotóxicas a 50% (CC₅₀) dos PAMs, obtidas através do ensaio do MTT, para as diferentes linhagens celulares variaram de 39,7 a 125 µM (células VERO); 17,13 a 84,9 µM (células HEp-2) e 21 a 125 µM (células MA104).
- Os PAMs apresentaram ação inibitória da replicação do HSV-1/KOS, através do ensaio do MTT, e os valores dos índices de seletividade (CC₅₀/CE₅₀) variaram de 1,12 a 64.
- No tratamento simultâneo, a Peneidina apresentou um IS (64) maior que aqueles apresentados pelos outros PAMs, sugerindo que a cadeia mista possa contribuir para esta ação antiviral detectada, já que nenhum dos outros PAMs testados apresenta este tipo de conformação.
- O FAL teve ação anti-herpética semelhante nas duas estratégias realizadas (tratamento simultâneo e pré-tratamento), sugerindo que ele possa ter ação tanto nas fases iniciais como nas fases tardias da replicação viral.
- Os peptídeos Gomesina, PW-2, Peneidina apresentaram ação sobre o HSV-1 somente no tratamento simultâneo, sugerindo que eles poderiam atuar predominantemente nas fases tardias da replicação viral.
- A inibição da replicação do HSV-1/KOS pelos PAMs, variou de 19,31 a 85,17%.
- Os peptídeos Gomesina, PW-2, Peneidina e FAL apresentaram altas porcentagens de inibição sobre o HSV-1, sugerindo uma potencial capacidade anti-herpética.
- Os PAMs apresentaram ação inibitória da replicação do AdV-5, através do ensaio do MTT, e os índices de seletividade variaram de 1,41 a 1,86.
- A Clavanina A apresentou ação antiadenovírus semelhante nas duas estratégias realizadas (tratamento simultâneo e pré-tratamento), sugerindo

que ela possa ter ação tanto nas fases iniciais como nas fases tardias da replicação viral.

- A Gomesina apresentou ação sobre o AdV-5 somente no pré-tratamento, sugerindo que este peptídeo agiria predominantemente nas fases iniciais da replicação viral.
- O FAL apresentou ação sobre o AdV-5 somente no tratamento simultâneo, sugerindo que este peptídeo poderia agir predominantemente nas fases tardias da replicação viral.
- A inibição da replicação do AdV-5 pelos PAMs variou de 20,36 a 98,17%.
- O FAL e a Clavanina A apresentaram altas porcentagens de inibição sobre o AdV-5, sugerindo uma potencial ação antiadenovírus.

- Os PAMs apresentaram ação inibitória da replicação do RV-SA11, através do ensaio do MTT, e os valores dos índices de seletividade variaram de 1,09 a 2,25.
- A Clavanina A apresentou ação anti-rotavirus semelhante nas duas estratégias realizadas (tratamento simultâneo e pré-tratamento), sugerindo que ela possa ter ação tanto nas fases iniciais como nas fases tardias da replicação viral.
- A Peneidina apresentou ação sobre o RV-SA11 somente no pré-tratamento, sugerindo que este peptídeo tenha ação predominantemente nas fases iniciais da replicação viral.
- A Taquiplesina apresentou ação sobre o RV-SA11 somente no tratamento simultâneo, sugerindo que este peptídeo poderia atuar predominantemente nas fases tardias da replicação viral.
- A inibição da replicação do RV-SA11 pelos PAMs variou de 9,58 a 95,46%.
- A Taquiplesina, a Peneidina e a Clavanina A apresentaram altas porcentagens de inibição sobre o RV-SA11, sugerindo uma potencial atividade anti-rotavírus.

Hemolinfa de ostras

- As concentrações citotóxicas a 50% (CC₅₀) da hemolinfa de ostras, obtidas através do ensaio do MTT, para as diferentes linhagens celulares variaram de

0,34 a 0,88 mg de proteína/mL (células VERO); 0,19 a 0,36 mg de proteína/mL (células HEp-2) e 0,86 a 1 mg de proteína/mL (células MA104).

- A hemolinfa de ostras apresentou ação inibitória da replicação do HSV-1/KOS, através do ensaio do MTT, e os valores dos índices de seletividade variaram de 1,41 a 17,50.
- A hemolinfa de ostras apresentou atividade apenas no pós-tratamento sobre o HSV-1, sugerindo que possa atuar sobre as fases tardias da replicação viral.
- As porcentagens de inibição da replicação do HSV-1/KOS pela hemolinfa de ostras variou de 11,17 a 75,47%.

- A hemolinfa de ostras apresentou ação inibitória da replicação do AdV-5, onde os valores dos índices de seletividade variaram de 1,60 a 5,33.
- A hemolinfa de ostras apresentou atividade nas três estratégias realizadas (tratamento simultâneo, pré-tratamento e pós-tratamento) sobre o AdV-5, sugerindo que possa atuar sobre todas as fases da replicação viral.
- A inibição da replicação do AdV-5 pela hemolinfa de ostras variaram de 34,02 a 76,33 %.

- A hemolinfa de ostras não apresentou ação inibitória da replicação do RV-SA11, nas condições realizadas.
- A inibição da replicação do RV-SA11 pela hemolinfa de ostras variaram de 6,00 a 48,78 %.

- A hemolinfa das ostras testadas apresentou ação virucida para os três vírus estudados, sugerindo que ela tenha ação direta sobre estes vírus inativando-os antes que eles atinjam as células-alvo.

7 PERSPECTIVAS

Peptídeos Antimicrobianos:

- Realizar outros ensaios para a elucidação do mecanismo de ação da peineidina sobre o HSV-1.
- Realizar a avaliação da potencial atividade virucida. Apesar dos baixos índices de seletividade de alguns peptídeos frente aos vírus testados, não se pode excluir sua potencial ação direta sobre o vírus, o que seria de grande valia, considerando-se que suas atividades sobre bactérias Gram (+) e (-) e antifúngicas já foram demonstradas.
- Diminuir o custo de obtenção dos PAMs, bem como de seus análogos recombinantes e sintéticos com o objetivo de disponibilizar maior quantidade de material para ensaios confirmatórios.
- Realizar estudos de eficácia e de relação estrutura-atividade com estes e outros análogos.
- Realizar ensaios dos PAMs juntamente com outras substâncias, que atuam em outras etapas do ciclo de replicação viral, para observar a possibilidade de sinergismo.

Extratos de hemolinfa de ostras

- Identificar os possíveis compostos responsáveis pela atividade antiviral detectada, a partir do fracionamento dos extratos.
- Isolar tais compostos e realizar ensaios antivirais confirmatórios.
- Estudar o mecanismo de ação antiviral dos compostos identificados como os responsáveis pela ação antiviral.
- Desnaturar as hemolinfas por calor (100 °C) e repetir os ensaios para observar se a atividade antiviral é mantida.

REFERÊNCIAS

- ABOUDY, Y.; MENDELSON, E.; SHALIT, I.; BESSALE, R.; FRIDKIN, M. Activity of two synthetic amphiphilic peptides and magainin-2 against herpes simplex virus type 1 and 2. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 43, p. 573-582, 1993.
- ACHOUR, A.; LACHGAR, A.; ASTGEN, A.; CHAMS, V.; BIZZINI, B.; TAPIERO, H.; ZAGURY, D. Potentialization of IL-2 effects on immune cells by oyster extract (JCOE) in normal and HIV-infected individuals. **Biomedical and Pharmacotherapy**, v. 54, p. 427-429, 1997.
- AKABOSHI, S.; SINQUE, C. Cultivo experimental de *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795) na região estuarina lagunar de Cananéia (25°05'S; 48°01'W), São Paulo, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, n. 10, p. 1-8, 1983.
- ALLARD, A.; ALBINSSONN, B.; WADELL, G. Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. **Journal of Medical Microbiology**, v. 37, p. 149-157, 1992.
- _____. KAJON, A.; WADELL, G. Simple procedure for discrimination and typing of enteric adenoviruses after detection by polymerase chain reaction. **Journal of Medical Virology**, v. 44, p. 250-257, 1994.
- ALTENBURG, B. C.; GRAHAM, D. Y.; ESTES, M. K. Ultrastructural study of rotavirus replication in cultured cells. **Journal of General Virology**, v. 46, p.75-85, 1980.
- AMICI, C.; BELARDO, G. ROSSI, A.; SANTORO, G.M. Activation of ikb kinase by herpes simples virus type 1: a novel target for anti-herpetic therapy. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, n. 31, p. 28759-28765, 2001.
- ANDERSEN, J.H.; JENSSEN, H.; SANDVIK, K; GUTTEBERG, T.J. Anti-HSV activity of lactoferrin and lactoferricin is dependent on the presence of heparan sulphate at the cell surface. **Journal of Medical Virology**, v. 74, n. 2, p. 262-271, 2004.
- ANDRIGHETTI-FRÖHNER. **Avaliação da citotoxicidade, da genotoxicidade e da potencial atividade antiviral da violaceína, produzida pela *Chromobacterium violaceum***, 2003, 135f, Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Curso de Pós-graduação em Farmácia – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.a
- _____. ANTONIO, R.V.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; BARARDI, C.R.; SIMÕES C.M.O. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 6, p. 843-848, 2003b.
- ARNOLD, D.; DI BIASE, A.M.; MARCHETTI, M.; PIETRANTONI, A.; VALENTI, P.; SEGANTI, L.; SUPERTI, F. Antiadenovirus activity of milk proteins: lactoferrin prevents viral infection. **Antiviral Research**, v. 53, n. 2, p. 153-158, 2002.
- AVELLÓN, A.; PÉREZ, P.; AGUILAR, J.C.; LEJARAZU, R.O.; ECHAVARRÍA, J.E. Rapid and sensitive diagnosis of human adenoviruses infections by generic polymerase chain reaction. **Journal of Virology Methods**, v. 92, p. 113-120, 2001.
- BACHÈRE, E.; DESTOUMIEUX, D.; BULET, P. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. **Aquaculture**, v. 191, p. 71-88, 2000.

_____. GUEGUEN, Y.; GONZALES, M.; LORGERIL, J.; GARNIER, J.; ROMESTAND, B. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and oyster *Crassostrea gigas*. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 149-168, 2004.

BARARDI, C.R.M.; EMSLIE, K.R.; VESEY, G.; WILLIAMS, K.L. Development of a rapid and sensitive quantitative assay for rotavirus based on flow cytometry. **Journal of Virological Methods**, v. 74, p. 31-37, 1998.

BARILE, F. A.; ***In vitro cytotoxicology***: mechanisms and methods. Florida: CRC, 1994. 222p.

BELAID, A.; AOUNI, M.; TRABELSI, A.; JEMMALI, M.; HANI, K. *In vitro* antiviral activity of dermaseptins against herpes simplex virus type 1. **Journal of Medical Virology**, v. 66, p. 229-234, 2002.

BETANCUR-GALVIS L.A.; MORALES G.E.; FORERO J.E.; ROLDAN J. Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the Euphorbia genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, v.4, p.541-546, 2002.

BETTEGA, J.M.R. **Avaliação da atividade antiviral de extratos nebulizados de *Achyrocline satureioides* (Lam) DC., Astereceae – Marcela**, 2000, Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Curso de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

_____. TEIXEIRA, H.; BASSANI, V.L.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O. Evaluation of the Antiherpetic Activity of Standardized Extracts of *Achyrocline satureioides*. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 819-823, 2004.

BISHOP, R.F. Natural history of human rotavirus infection. **Archives of Virology**, v. 12, p. 119-128, 1996.

BOFFI, A.V. Moluscos brasileiros de interesse médico e econômico. São Paulo: **FAPESP-HUCITEC**, p. 198, 1979.

BOURNE, N.; STANBERRY, L.R.; KERN, E.R.; HOLAN, G.; MATTHEWS, B.; BERNSTEIN, D.I. Dendrimers, a new class of candidate topical microbicides with activity against *herpes simplex virus* infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 9, p. 2471-2474, 2000.

BRADFORD, M.B. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROGDEN K.A., ACKERMANN M., McCRAY P.B.Jr., TACK B.F. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, n. 5, p 465-478, 2003.

BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J.L.; HOFFMANN, D. Antimicrobial peptides in insects: structure and function. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 23, p. 329-344, 1999.

_____. STÖCKLIN, R., MENIN L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological Reviews**. v. 198, p. 169-184, 2004.

BURLESON, F.G.; CHAMBERS, T.M.; WIEDBRAUK, D.L. **Virology**: a laboratory manual. San Diego: Academic, 1992. 250 p.

CHAPRON, C.D.; BALLESTER, N.A.; FONTAINE, J.H.; FRADES, C.N.; MARGOLIN, A.B. Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2520-2525, 2000.

CHE, C.T. Plants as a source of potential antiviral agents. In: WAGNER, H.; FARNSWORTH, N.R. (eds.) **Economic and Medicinal Plants Research**, v. 5. London: Academic, p. 167- 251, 1991.

CHINCHAR, V.G.; BRYAN, L.; SILPHADAUNG, U.; NOGA, E.; WADE, D.; ROLLINS-SMITH, L. Inactivation of viruses infecting ectothermic animals by amphibian and piscine antimicrobial peptides. **Virology**, v. 323, p. 268-275, 2004.

CHOU, T.C.; TALALAY, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 22, p. 27-55, 1984.

CIARLET, M.; ESTES, M. K. Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity. **Journal of General Virology**. v. 80, p. 943-948, 1999.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.J.; NES, I.F.; CHIKINDAS, M.L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for foods preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 1-20, 2001.

COS P.; CALOMME M.; SINDAMBIWE J.B.; DE BRUYNE T.; CIMANGA K.; PIETERS L.; VLIETINCK A.J.; VANDEN BERGHE D. Cytotoxicity and lipid peroxidation-inhibiting activity of flavonoids. **Planta Medica**, v.67, n.6, p.515-519, 2001.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 52-60, 1997.

CUTHBERTSON, B.J.; SHEPARD, E.F.; CHAPMAN, R.W.; GROSS, P.S. Diversity of the penaeidin antimicrobial peptides in two shrimp species. **Immunogenetics**, v. 54, p. 442-445, 2002.

DE CLERCQ, E. Strategies in the design of antiviral drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, p. 13-25, 2002.

_____. Antiviral drugs in current clinical use. **Journal of Clinical Virology**, v. 30, p. 115-133, 2004.

DE JALON, E.G.; BLANCO-PRIETO, M.J.; YGARTUA, P.; SANTOYO, S. Increased efficacy of acyclovir-loaded microparticles against herpes simplex virus type 1 in cell culture. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 183-187, 2003

DENIZOT, F.; LANG, R.; Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. **Journal of Immunological Methods**. v. 89. p.271-277, 1986.

DESTOUMIEUX, D.; BULET, P.; LOEW, D.; DORSSELAER, A.V.; RODRIGUEZ, J.; BACHÈRE, E. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *penaeus vannamei* (decapoda). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 45, p. 28398-28406, 1997.

_____. BULET, P.; STRUB, J. M.; DORSSELAER, A. V.; BACHÈRE, E. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. **European Journal of Biochemistry**, v. 266, p. 335-346, 1999.

_____. MUÑOZ, M.; BULET, P.; BACHÈRE, E. Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 57, p. 1260-1271, 2000a.

_____. MUÑOZ, M.; COSSEAU, C.; RODRIGUEZ, J.; BULET, P.; COMPS, M.; BACHÈRE, E. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 461-469, 2000b.

DESTOUMIEUX-GARZON, D.; SAUINIER, D.; GARNIER, J.; JOUFFREY, C.; BULET, P.; BACHÈRE, E. Crustacean immunity: antifungal peptides are generated from the C-terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 47070-47077, 2001.

DI BIASE, A.M.; PIETRANTONI, A.; TINARI, A.; SICILIANO, R.; VALENTI, P.; ANTONINI, G.; SEGANTI, L.; SUPERTI, F. Heparin-interacting sites of bovine lactoferrin are involved in anti-adenovirus activity. **Journal of Medical Virology**, v. 69, n. 4, p. 495-502, 2003.

DIMARCQ, J.L.; BULET, P.; HETRU, C.; HOFMANN, J. Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. **Biopolymers (Peptide Science)**, v. 47, p. 465-477, 1998.

DUBOIS, E., GUYADER, F.L., HAUGARREAU, L., KOPECKA, H., CORMIER, M.; POMMEPUY, M. Molecular epidemiological survey of rotaviruses in sewage by reverse transcriptase, seminested PCR and restriction fragment length polymorphism assay. **Applied and Environment Microbiology**. v. 63, p. 1794-1800, 1997.

EGAL, M.; CONRAD, M.; MACDONALD, D.L.; MALOY, W.L.; MOTLEY, M.; GENCO, C.A. Antiviral effects of synthetic membrane-active peptides on herpes simplex virus, type 1. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 13, p. 57-60, 1999.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B.J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J. C. PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v.40. p.193-236, 2002.

EPAGRI/CEDAP. Dados da Maricultura Catarinense, 2004.

ESTES, M.K.; GRAHAM, D.; MASON, B.B. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: biologic mechanisms. **Journal of Virology**, v. 39, p. 879-888, 1981.

_____. Rotaviruses and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; CHANOCK, R.M.; MELNICK, J.L.; MONATH, T.P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. ed. **Fields Virology**, 3ed. Philadelphia, Lippincott, 1996. p. 1625-1655.

FAISAL, N.; MACINTYRE, E.A.; ADHAN, M.K.G.; TALL, B.D.; KOTHARY, M.H.; LA PEYRE, J.F. Evidence for the presence of protease inhibitors in eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*Crassostrea gigas*) oysters. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 121, p.161-168, 1998.

FAULKNER, D.J. Marine Natural Products. **Natural Products Reports**, v. 18, p. 1-49, 2002.

FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. Adenoviruses. In: ____ **Virology**, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p. 2149-2171.

FLINT, S.J.; ENQUIST, L.W.; KRUG, R.M.; RACANELLO, V.R.; SKALKA, A.M. Vírus structure. In: _____ **Principles of Virology: molecular biology, pathogenesis and control.** Washington ASM Press, 2000. p. 662-714.

FREITAS, A. M. **Avaliação da citotoxicidade e da atividade antiviral de extratos de *Araucária angutifolia* (Bert.) O. Kuntze, Araucariae, 2001,** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Curso de Pós-graduação em Biotecnologia – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

FRESHNEY, R.I. **Culture of Animal Cells.** A Multimedia Guide. Wiley-Liss, 1999.

FUJIHARA, T.; HAYASHI, K. Lactoferrin inhibits herpes simplex virus type-1 (HSV-1) infection to mouse cornea. **Archives of Virology**, v. 140, n. 8, p. 1469-1472, 1995.

GALLEGOS, C. O.; PATTON, J. T. Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles. **Virology**, v. 172, p. 616-627, 1989.

GIANSANTI, F.; ROSSI, P.; MASSUCCI, M.T.; BOTTI, D.; ANTONINI, G.; VALENTI, P.; SEGANTI, L. Antiviral activity of ovotransferrin discloses an evolutionary strategy for the defensive activities of lactoferrin. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 80, n. 1, p. 125-130, 2002.

GILGER, M.A.; MATSON, D.O.; CONNER, M.E.; ROSENBLANTT, H.M.; FINEGOLD, M.J.; ESTES, M.K. Extraintestinal rotavirus infections in children with immunodeficiency. **The Journal of Pediatrics**, v. 120, n. 6, p. 912-917, 1992.

GIRARD, M.; HIRTH, L. **Virologie Moleculaire.** 2.ed. Paris: Doin, 1989. 617 p.

GLASS, R.I.; KILGORE, P.E.; HOLMAN, R.C.; JIN, S.; SMITH, J.C.; WOODS, P.A. The epidemiology of rotavirus diarrhea in the United States: surveillance and estimates of disease burden. **Journal of Infectious Diseases**, v. 174, p. 5-11, 1996.

GRAHAM, K. L.; HALASZ, P.; TAN, Y.; HEWISH, M. J.; TAKADA, Y.; MACKOW, E. R.; ROBINSON, M. K.; COULSON, B. S. Integrin-Using Rotaviruses Bind $\alpha 2\beta 1$ Integrin $\alpha 2$ I Domain via VP4 DGE Sequence and Recognize $\alpha X\beta 2$ and $\alpha V\beta 3$ by Using VP7 during Cell Entry. **Journal of Virology**, v. 77, n. 18, p. 9969–9978, 2003.

HAMOSH, M. Protective function of proteins and lipids in human milk. **Biology of the Neonate**, v. 74, n. 2, p. 163-176, 1998.

HARVEY, A.L. Medicines from nature: are natural products still relevant to drugs discovery? **Trends In Pharmacological Sciences**, v. 20, p. 196-198, 1999.

_____. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 7, p. 294-300, 2000.

HASEGAWA, K.; MOTSUCHI, W.; TANAKA, S.; DOSAKO, S.. Inhibition with lactoferrin of in vitro infection with human herpes virus. **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, v. 47, n. 2, p. 73-85, 1994.

HOUGHTON, P.J.. Medicinal Plants and the control of parasites: compounds with anti-HIV activity from plants. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, p. 601-604, 1996.

HU J.M.; HSIUNG G.D. Evaluation of new antiviral agents: I. In vitro perspectives. **Antiviral Research**, v.11, n.5-6, p.217-232, 1989.

HUDSON, J.B. **Antiviral compounds from plants**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1990. 200 p.

HUDSON, J.B.; GRAHAM, E.A.; HARRIS, L.; ASHWOOD-SMITH, M.J. The unusual UVA-dependent antiviral properties of the furoisocoumarin, coriandrin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 57, p. 491-496, 1993.

HUNG, T.; WANG, C.; FANG, Z.; CHOU, Z.; CHANG, X.; LIONG, X.Q.; CHEN, G.M.; YAO, H.L.; CHAO, T.X.; YE, W.W.; DEN, S.S.; CHANG, W.C. Waterborne outbreak of rotavirus diarrhea in adults in China caused by a novel rotavirus. **Lancet**, v. 1, p. 1139-42, 1984.

IMAI, T. Aquaculture in shallow seas: progress in shallow sea culture. Part II. Rotterdam, Balkema, p. 115-260, 1982.

JENSSEN, H.; ANDERSEN, J.H.; UHLIN-HANSEN, L.; GUTTEBERG, T.J.; REKDAL, O. Anti-HSV activity of lactoferricina analogues is only partly related to their affinity for heparin sulfate. **Antiviral Research**, v. 61, p. 101-109, 2004.

_____. ANDERSEN, J.H.; MANTZILAS, D.; GUTTEBERG, T.J. A wide range of medium-sized, highly cationic, α -helical peptides show antiviral activity against herpes simplex virus. **Antiviral Research**, v. 64, p. 119-126, 2004.

KAN, E.J.M.V.; RUDY, A.D.; BENT, A.V.; KRUIJFF, B. The role of the abundant phenylalanines in the mode of action of the antimicrobial peptide clavanin. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1615, p. 84-92, 2003.

KANEKO, H.; KEIICHIRO, K.; MORI, S.; SHIGETA, S. antiviral activity of NMSO₃ against adenovirus *in vitro*. **Antiviral Research**. V.52, p.281-288, 2001.

KAPIKIAN, A.Z.; CHANOCK, R.M. Rotaviruses. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.N.; HOWLEY, R.M.; CHANOCK, R.M.; MELNICK, J.L.; MONATH, T.P.; ROIZMAN, B.; SATRAUS, S.E. ed. **Fields Virology**, 3ed. Philadelphia, Lippincott, 1996. p. 1657-1708.

KIDD, A.H.; JONSSON, M.; GARWICZ, D.; KAJON, A.E.; WERMENBOL, A.G.; VERWEIJ, N.W.; JONG, J.C. Rapid subgenus identification of human adenovirus isolates by a general PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 662-627, 1996.

KINCHINGTON, D.; KANGRO, H.; JEFRIES, D.J. Design and testing of antiviral compounds. In: DESSELBERGER, U. **Medical Virology: a practical approach**. New York, OIRL Press, 1995. p. 153-154.

KODAMA, E.; SHIGETA, S.; SUZUKI, T.; DE CLERCQ, E. Application of a gastric cancer cell line (MKN-28) for anti-adenovirus screening using the MTT method. **Antiviral Research**, v.31. p.159-164, 1996.

LAMBERTY, M.; ZACHARY, D.; LANOT, R.; BORDEREAU, C.; ROBERT, A.; HOFMANN, J. A.; BULET, P. Insect immunity: constitutive expression of a cysteine-rich antifungal and a linear antibacterial peptide in a termite insect. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, n. 6, p. 4085-92, 2001.

LCMM, **Projeto BMLP-LCMM**. Laboratório de cultivo de moluscos marinhos. Disponível em <http://www.lcmm.ufsc.br> 07/2001.

LEE, I.H.; ZHAO, C.; CHO, Y.; HARWIG, S.S.L.; COOPER, E.L.; LEHRER, R.I. Clavanins α -helical antimicrobial peptides from tunicate hemocytes. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, p. 158-162, 1997.

LEE, T.G.; MARUYAMA, S. Isolation of HIV-1 protease-inhibiting peptides from termolysing hydrolysate of oyster proteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 253, p. 604-608, 1998.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Amino acids, peptides, and proteins. In: _____ **Principles of Biochemistry**, 3 ed., New York: Worth Publishers, 2000. p. 115-158.

LIUZZI, M.; SCOUTEN, E.; INGEMARSON, R. Inhibition of herpes simplex virus ribonucleotide reductase by synthetic nonapeptides: a potential antiviral therapy. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 312, p. 129-138, 1992.

LÖFGREN, S. E. **Atividades antimicrobiana e antiparasitária de peptídeos isolados de animais aquáticos**, 2004, Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

LORENZINI, D.M.; SILVA JUNIOR, P.I.; FOGAÇA, A.C.; BULLETT, P.; DAFFRE, S. Acanthoscurrin: a novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 27, p. 781-791, 2003.

MANDARD, N.; BULET, P.; CAILLE, A.; DAFFRE, S.; VOVELLE, F. The solution structure of gomesin, an antimicrobial cysteine-rich peptide from the spider. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 1190-1198, 2002.

MARCHETTI, M.; LONGHI, C.; CONTE, M.P.; PISANI, S.; VALENTI, P.; SEGANTI, L. Lactoferrin inhibits herpes simplex virus type 1 adsorption to Vero cells. **Antiviral Research**, v. 29, n. 2-3, p. 221-231, 1996.

_____. TRYBALA E; SUPERTI F; JOHANSSON M; BERGSTRÖM T. Inhibition of herpes simplex virus infection by lactoferrin is dependent on interference with the virus binding to glycosaminoglycans. **Virology**, v. 318, n. 1, p. 405-413, 2004.

MATANIC, V.C.A.; CASTILA, V. Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against Junin virus e herpes simplex virus. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, p. 382-389, 2004.

MATTION, N.M.; COHEN, J.; ESTES, M.K. The rotavirus proteins. In: KAPIKIAN, A.Z. **Viral Infections of the Gastrointestinal Tract**, 2 ed. New York: Marcel Dekker, 1994. p. 169-249.

MELO, P.S.; MARIA, S. S.; VIDAL, B. C.; HAUN, M.; DURAN, N. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In vitro Cellular & Developmental Biology: Animal**, v. 36, p. 639-453, 2000.

MENZEL, L.P.; LEE, Y.H.; SJOSTRAND, B.; LEHRER, R.I. Immuno localization of clavanins in *Styela clava* hemocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 26, p. 505-515, 2002.

MORITA, T.; OHTSUBO, S.; NAKAMURA, T.; TANAKA, S.; IWANAGA, S.; OHASHI, K.; NIWA, M. Isolation and biological activities of limulus anticoagulant (anti-LPS factor) which interacts with lipopolysacchride (LPS). **Journal of Biochemistry**, v. 97, n. 6, p. 1611-1620, 1985.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferation na cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. V. 65. p. 55-63, 1983.

MOSS, N.; BEAULIEU, P.; DUCEPPE, J.S.; FERLAND, J.M.; GAUTHIER, J.; GHIRO, E.; GOULET, S.; GRENIER, L.; LLINAS-BRUNET, M.; PLANTE, R.; WERNEC, D.; DÉZIEL, R. Peptidomimetic inhibitors of herpes simplex virus ribonucleotide reductase: a new class of antiviral agents. **Journal of Medical Chemotherapy**, v. 38, p. 3617-3623, 1995.

MURAKAMI, T.; NIWA, M.; TOKUNAGA, F.; MIYATA, T.; IWANAGA, S. Direct virus inactivation of tachyplestin I and its isopeptides from horseshoe crab hemocytes. **Chemotherapy**, v. 37, n. 5, p. 327-334, 1991.

NAKAMURA, T.; FURUNAKA, H.; MIYATA, T.; TOKUNAGA, F.; MUTA, T.; IWANAGA, S.; NIWA, M.; TAKAO, T.; SHIMOSHI, Y. Tachyplestin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 16709-16713, 1988.

NAKATA, ESTES, M.K.; GRAHAM, D.Y.; WANG, S.S.; GARY, G.W.; MELNICK, J.L. Detection of antibody to group B adult diarrhea rotaviruses in humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 812-818. 1987.

NARDONE, R. M. Toxicity testing *in vitro*. In: ROTBBLAT, G. H.; CRISTOFALO, V. J. (Ed). **Growth, nutrition and metabolism of cells in culture**. New York: Academic, 1977. p.471-495.

NASCIMENTO, I.A.; PEREIRA, S.A.; SOUZA, R.C. Cultivo de ostras no Brasil: problemas e perspectivas. **Ciência e Cultura**, v. 7, n. 35, p. 871-876, 1983.

NIELSEN, J. Combinatorial synthesis of natural products. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, p. 297-305, 2002.

NOZAKI, A.; IKEDA, M.; NAGANUMA, A.; NAKAMURA, T.; INUDOH, M.; TANAKA, K.; KATO, N. Identification of a lactoferrin-derived peptide possessing binding activity to hepatitis C virus E2 envelope protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 12, p. 10162-10173, 2003.

OEVERMANN, A.; ENGELS, M.; THOMAS, U.; PELLEGRINI, A. The antiviral activity of naturally occurring proteins and their peptide fragments after chemical modification. **Antiviral Research**, n. 1805, p.1-11, 2003.

PAN, J.; KUROSKY, A.; XU, B.; CHOPRA, A.K.; COPPENHAVER, D.H.; SINGH, I.P.; BARON, S. Broad antiviral activity of crustaceans. **Antiviral Research**, v. 48, p. 39-47, 2000.

PINA, S.; PUIG, M.; LUCENA, F.; JOFRE, J.; GIRRONES, R. Viral pollution in the enviroment and in shellfish: Human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. **Applied And Enviromental Microbiology**, v. 64, p. 3376-3382, 1998.

POLI, C.R. O cultivo de *Crassostrea gigas* (Thunberg,1795) no Sul do Brasil. Florianópolis (Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina), 1994.

PRESCOTT, B.; LI, C.P.; CALDES, G.; MARTINO, E.C. Chemical studs of paolin II, and antiviral substance from oysters (31514). **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicina**, v. 123, p. 460-464, 1966.

RAJ, P.A.; DENTINO, A.R. Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 206, n. 1, p. 9-18, 2002.

REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal Hygiene**, v. 27, (supl. 3), p. 493-497, 1938.

ROIZMAN, B. Herpesviridae. In: FIELDS, B. N.; KNIFE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. (eds.) **Fields Virology**, 3 ed. v. 2. Philadelphia : Lippincott-Raven, 1996. p. 2221-2341.

RUPPERT, E.E.; BARNES, R.D. Moluscos. In: _____ **Zoologia dos Invertebrados**, 6 Ed. São Pulo, Roca, p. 353-484, 1996.

SANTOS, O.L.R.; SILVA, A.G.; PEREIRA JUNIOR, A.C. **Herpes - clínica, diagnóstico e tratamento**, Rio de Janeiro: Medisi, 2000. 278 p.

SAVI, L. A. **Avaliação da genotoxicidade e das atividades anti-herpética e antioxidante de compostos fenólicos**, 2004, 128f, Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Curso de Pós-graduação em Biotecnologia – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

_____. LEAL, P.C.; VIEIRA, T.O.; ROSSO, R.; NUNES, R.J.; YUNES, R.A.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O. Evaluation of anti-herpetic and antioxidant activities, and cytotoxic and genotoxic effects of synthetic alkyl-esters of gallic acid. **Drug Research**, v. 55, n. 1, p. 66-75, 2005.

SCHINAZI, R. F. Progress in the Development of Natural Products for Human Immunodeficiency Viruses Infections. In: CHU C. K.; CUTLER, H. G. – **Natural Products as Antiviral Agents**, New York, Plenum, 1992. p. 1-29.

SHAW, R.D.; HEMPSON, S.J. Replication as a determinant of the intestinal response to rotavirus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 174, p.1328-1331, 1996.

SIDWELL, R. W. Determination of antiviral activity. **Drugs Pharmaceutical Sciences**, v. 27, p. 433-480, 1986.

SIEUWERTS, A.; KLIJN, J.G.M.; PETERS, H.A.; FOEKENS, J.A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures *in vitro* for the assessment of growth characteristics, IC₅₀ – values and cell survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 33, p. 813-823, 1995.

SILVA, A.C. **Avaliação da Citotoxicidade e Triagem da Potencial Antiviral de Produtos Marinhos: esponjas coletadas na costa brasileira e compostos de organismos marinhos**, 2005, Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Curso de Pós-graduação em Farmácia – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SILVA JUNIOR, A.; KAWAZOE, U.; FREITAS, F.F.T.; GATTI, M.S.V.; DOLDER, H.; SCHUMACHER, R.I.; JULIANO, M.A.; SILVA, M.J.; LEITE, A. Avian anticoccidial activity of a novel membrane-interactive peptide selected from phage display libraries. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, p. 53-60, 2002.

SILVA JUNIOR, P.I.; DAFFRE, S.; BULET, P. Isolation and characterization of gomesin, na 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 43, p. 33464-33470, 2000.

SIMÕES, C.M.O.; AMOROS, M.; GIRRE, L. Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 4, p. 323-328, 1999.

SMEE, D. F; MORRISON, A.C.; BARNARD, D. L.; SIDWELL, R. W. Comparison of colorimetric, fluorimetric, and visual methods for determining anti-influenza (H1N1 and H3N2) virus activities and toxicities of compounds. **Journal of Virological Methods**, v.106, p.71-79, 2002.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**, 3.ed. New York: W.H. Freeman, 1995. 850 p.

STEINER, H.; HULTMARK, D.; ENGSTRÖM, A.; BENNICHT, H.; BOMAN, H. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. **Nature**, v. 292, p. 246-248, 1981.

STRATE, B.W.A.; BELJAARS, L.; MOLEMA, G.; HARMSEN, M.C.; MEIJER, D.K.F. Antiviral activities of lactoferrin. **Antiviral Research**, v. 52, p. 225-239, 2001.

STROHL, W. R. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 2, p. 39-41, 2000.

SUDO, K.; KONNO, K.; YOKOTA, T.; SHIGETA, S. A sensitive assay system for screening antiviral compounds against herpes simplex virus type 1 and type 2. **Journal of Virological Methods**. v. 49. p.169-178, 1994.

SUPERTI, F.; AMMENDOLIA, M.G.; VALENTI, P.; SEGANTI, L.. Antiviral activity of milk proteins: lactoferrin prevents rotavirus infection in the enterocyte-like cell line HT-29. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 186, n. 2-3, p. 83-91, 1997.

_____. SICILIANO, R.; REGA, B.; GIANSAANTI, F.; VALENTI, P.; ANTONINI, G. Involvement of bovine lactoferrin metal saturation, sialic acid and protein fragments in the inhibition of rotavirus infection. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1528, n. 2-3, p. 107-115, 2001.

TAKEUCHI, H.; BABA, M.; SHIGETA, S. An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. **Journal of Virological Methods**, v. 33, p. 61-71, 1991.

TANAKA, S.; NAKAMURA, T.; MORITA, T.; IWANAGA, S. Limulus anti-LPS factor: an anticoagulant which inhibits the endotoxin mediated activation of Limulus coagulation system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 105, n. 2, p. 717-723, 1982.

TANAKA, T.; NAKATANI, S.; XUAN, X.; KUMURA, H.; IGARASHI, I.; SHIMAZAKI, K. Antiviral activity of lactoferrin against canine herpesvirus. **Antiviral Research**, v. 60, p. 193-199, 2003.

TRYBALA, E.; OLOFSSON, S.; MARDBERG, K.; SVENNERHOLM, B.; UMEMOTO, K.; GLORIOSO, J. C.; BERGSTRÖM, T. Structural and functional features of the polycationic peptide required for inhibition of herpes simplex virus invasion of cells. **Antiviral Research**, v. 62, p. 125-134, 2004.

VALENTI, P.; BERLUTTI, F.; CONTE, M.P.; LONGHI, C.; SEGANTI, L.. Lactoferrin functions: current status and perspectives. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 38, n. 6, 127-129, 2004.

VANDEN-BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A.J.; VAN-HOOF, L. Plant products as potential antiviral agents. **Bulletin de l'Institut Pasteur**. V. 84, p.101-105, 1986.

VARGAS-ALBORES, F.; BARRACCO, M. A. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos, con énfasis en pectínidos. In: MAEDA-MARTINEZ A. N. **Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura**, México: Editorial Limusa, 2001. p. 127-146.

VISALLI, R.J.; ZEIJL M.V. DNA encapsidation as a target for anti-herpesvirus drug therapy. **Antiviral Research**, v. 59, p. 73–87, 2003.

VIZIOLI, J.; SALZET, M. Antimicrobial peptides versus parasitic infections? **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 11, p. 475-476, 2002.

VLIETINCK, A.J.; DE BRUYNE, T.; VANDEN BERGUE, D. A. Plant substances as antiviral agents. **Current Organic Chemistry**, v. 1, p. 307-344, 1997.

VOGEL, H.J.; SCHIBLI, D.J.; JING, W.; LOHMEIER-VOGEL, E.M.; EPAND, R.F.; EPAND, R.M.. Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine-containing peptides. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 80, n. 1, p. 49-63, 2002.

WHITE, D.O.; FENNER, F.J. **Medical Virology**. 4.ed. San Diego: Academic, 1994. 603 p.

WIEDBRAUK, D.L.; JOHNSTON, S.L.G. **Manual of clinical virology**. New York: Rave, 1992. 275 p.

WILSON, A. P. Cytotoxicity and viability assays. In: MASTERS, J. R. W. **Animal Cell Culture**. 3rd.ed. Oxford: University, 2000. p.175-219.

YANG, Y.; PONCET, J.; GARNIER, J.; ZATYLN, C.; BACHÈRE, E; AUMELAS, A. Solution structure of the recombinant penaeidin-3, a shrimp antimicrobial peptide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 38, p. 36859-36867, 2003.

YASIN, B.; PANG, M.; TURNER, J. S.; CHO, Y.; DINH, N-N.; WARING, A. J.; LEHRER, R. I.; WAGAR E. A. Evaluation of the inactivation of infectious herpes simplex virus by host-defense peptides. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 19, n. 3, p. 187-194, 2000.

YOSHICAWA, T.; NAITO, Y.; MASUI, K.; FUJII, T.; BOKU, Y.; NAKAGAWA, N.; YOSHIDA, N.; KONDO, M. Free radical-scavenging activity of *Crassostrea gigas* extract (JCOE). **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 51, p. 328-332, 1997.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequences of a precursor. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 84, p. 5449-5453, 1987.

_____. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, p. 389-395, 2002.